

DANIELA RAMOS FABRI

**“A INTERAÇÃO DOS FATORES VIII E IX DA COAGULAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA”**

**CAMPINAS
2008**

DANIELA RAMOS FABRI

**“A INTERAÇÃO DOS FATORES VIII E IX DA COAGULAÇÃO NO
DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA ATEROSCLERÓTICA”**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutor em Clínica Médica.

ORIENTADORA: PROFa. DRA. JOYCE M. ANNICHINO-BIZZACCHI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. VALDER R. ARRUDA

**CAMPINAS
2008**

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

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

F114i	Fabri, Daniela Ramos “A interação dos fatores VIII e IX da coagulação no desenvolvimento da doença aterosclerótica” / Daniela Ramos Fabri. Campinas, SP : [s.n.], 2008. Orientador : Joyce Maria Annichino-Bizzachi Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Aterosclerose. 2. Hemofilia. 3. Apolipoproteína E. 4 LDLR. I. Annichino-Bizzachi, Joyce Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês : “The role of clotting factors VIII and IX in the development of atherosclerosis”

Keywords: • Atherosclerosis
• Hemophilia
• Apolipoprotein E

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:
Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzachi
Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa
Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior
Prof. Dr. Élbio Antônio D’Amico
Profa. Dra. Vânia Maris Morelli

Data da defesa: 20 - 02 - 2008

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

Orientador: Profa. Dra. Joyce M Annichino-Bizzacchi

Membros:

- 1. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**
- 2. Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior**
- 3. Prof. Dr. Élbio A. D'Amico**
- 4. Profa. Dra. Vânia Maris Morelli**
- 5. Profa. Dra. Joyce M. Annichino-Bizzachi**

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20 de fevereiro de 2008

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, tão vivos em tudo o que sou e tudo o que faço.

À minha família (pais, irmãos, cunhadas e sobrinhos) por dividirmos o que há
de mais importante na vida.

Ao Zé, com quem com amor, continuo essa história.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Joyce, pela confiança e amizade demonstrada em todas as etapas deste projeto.

Ao Valder, pela idéia do projeto, pelas discussões, e hospitalidade na Philadelphia.

À Dra. Helena de Oliveira, pela disponibilidade do seu laboratório e das matrizes dos animais, assim como pelas valiosas discussões do projeto.

Às minhas grandes amigas Margareth (Marga) e Fabíola (Birla). Pela hospitalidade, amizade e força em todas as fases.

Aos amigos Aranha e Erich, pelas discussões, idéias e por tornarem estes dias em Campinas mais agradáveis.

Aos amigos do laboratório de hemostasia, com quem convivo há tantos anos e que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho. Ucha, Andrey, Guilherme, Tânia, Andréa, Silmara, Rafa, Ana, Aline, Mariane, Grazi, Ricardão, Susan, Michelle, Eloá, Wagnão, Luis, Carol, Natália.

Agradeço especialmente à Deva, que participou ativamente em todas as etapas do projeto. Pela amizade que cultivamos neste período.

Às minhas sempre amigas Sabrina, Juliana, Thaísinha, Bilú e minha prima Paty; e às minhas famílias “adotivas”: Nunes, Cabral, Isídio, CRA. Por fazerem parte ativa e afetivamente da minha vida.

Aos amigos do Hemovida, especialmente ao Glauco, pela colaboração e compreensão nas minhas ausências.

Aos amigos do Instituto de Biologia da Unicamp, pela sempre receptiva boa vontade em ajudar: Jairo, Gabriel, Débora, Vitor, Alexandre, Luciane. Ao Dr. Francesco (Lab. Neurofisiologia) e Dra. Alba (Lab. Produtos Naturais), pela disponibilidade de seus laboratórios.

Aos amigos do CHOP, Patrícia (pela agradável convivência e hospedagem), Alex (pela paciência e aprendizado na manipulação dos animais) e Stefano.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela Fapesp (processo nº 02/11549-9)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vii
AGRADECIMENTOS.....	ix
SUMÁRIO	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxv
LISTA DE TABELAS	xxxí
LISTA DE FIGURAS.....	xxxiii
LISTA DE GRÁFICOS	xxxv
RESUMO.....	xxxviii
SUMMARY.....	xlíii
INTRODUÇÃO	47
1. INTRODUÇÃO	49
1.1 - Fisiopatologia da aterosclerose	50
1.2 - Fisiologia da Coagulação Sanguínea	52
1.3 - Efeitos celulares da trombina e da PCa.....	55
1.4 - Interação entre hemostasia e doença arterial oclusiva cardiovascular.....	56
1.4.1 - Interação entre hipocoagulabilidade e doença arterial oclusiva cardiovascular	58
1.4.2 - Evidências clínicas da associação entre hipocoagulabilidade e o desenvolvimento da aterosclerose	59
1.5 - Modelos animais para estudo de aterosclerose	60
1.5.1 – Camundongos deficientes de apolipoproteína E	61
1.5.2 – Camundongos deficientes dos receptores de lipoproteína de baixa densidade	63
1.6 - Modelos animais de coagulação	64
1.6.1 – Camundongos com hemofilia A.....	65
1.6.2 – Camundongos com hemofilia B.....	66
1.5.3 – Camundongos com hiper-expressão de Fator IX.....	66

1.7 - Importância de estudos <i>in vivo</i> para a avaliação do papel de proteínas da coagulação na aterogênese	67
1.8 - Resultados de estudos em modelos animais sobre o papel da hemostasia na aterogênese.....	67
OBJETIVOS.....	71
2 – OBJETIVOS.....	73
2.1 – Objetivo geral.....	73
2.2 – Objetivos específicos	73
MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	77
3.1 - Modelos animais.....	77
3.2 - Dieta	78
3.3 - Controles	78
3.4 – Genótipo dos animais	79
3.4.1 - Genotipagem para os alelos do gene do FVIII.....	79
3.4.2 - Genotipagem para os alelos do gene do FIX	80
3.4.3 - Genotipagem para os alelos do gene da apolipoproteína E	82
3.4.4 - Genotipagem para os alelos do receptor da LDL (LDLR)	82
3.5 - Sacrifício.....	84
3.6 - Análise das lesões ateroscleróticas.....	84
3.6.1 - Análise quantitativa e padrão de distribuições das lesões ateroscleróticas	84
3.6.1 a) Aorta inteira:	85
3.6.1 b) Seio aórtico:.....	85
3.6.2 - Análise qualitativa das lesões ateroscleróticas	86
3.7 - Perfil lipídico	87
3.8 - Análise estatística.....	87
RESULTADOS.....	89
4 - RESULTADOS	91

4.1 - Efeito do fator VIII no desenvolvimento da doença aterosclerótica.	91
4.1.1 - Resultados do efeito da deficiência do FVIII no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de apoE:.....	91
4.1.1 a) Camundongos com hemofilia A apresentam níveis elevados de colesterol plasmático no modelo ApoE:	91
4.1.1 b) Deficiência do FVIII reduz a área da doença aterosclerótica na aorta do modelo deficiente em apoE:	92
4.1.1 c) A deficiência do FVIII protege o desenvolvimento das lesões vasculares no seio aórtico:.....	94
4.1.1 d) A deficiência do FVIII reduz a calcificação das lesões ateroscleróticas no modelo deficiente de apoE:	96
4.1.2 - Resultados da deficiência do FVIII no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de receptor de LDL (LDLR):	97
4.1.2 a) A deficiência do FVIII não altera os níveis de colesterol do modelo deficiente de LDLR:	97
4.1.2 b) Deficiência do FVIII não influencia a extensão da doença aterosclerótica na aorta dos animais deficientes de LDLR:	98
4.1.2 c) A deficiência do FVIII não influencia o desenvolvimento das lesões no seio aórtico dos animais deficientes de LDLR:	99
4.1.2 d) A deficiência do FVIII não altera as características da lesão aterosclerótica no modelo deficiente de LDLR.....	99
4.2 - Efeito do fator IX no desenvolvimento da doença aterosclerótica	100
4.2.1 - Resultados da deficiência do FIX no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de apoE:	100
4.2.1 a) A deficiência do FIX não influencia os níveis de colesterol dos animais deficientes de apoE.....	100
4.2.1 b) Elevada mortalidade dos animais hemofílicos B deficientes de apoE	101

4.2.1 c) A deficiência do FIX não protege contra o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas mas agrava a doença vascular no modelo deficiente de apoE	102
4.2.1 d) Efeito heterogêneo da deficiência do FIX no desenvolvimento das lesões no seio aórtico do modelo deficiente de apoE	103
4.2.1 e) Maior densidade de fibras colágenas nas lesões dos animais deficientes de FIX.....	104
4.2.2 - Resultados da deficiência do FIX no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de receptores de LDL:.....	106
4.2.2 a) A deficiência do FIX elevou os níveis de colesterol do modelo deficiente de LDLR após longo período de dieta hipercolesterolêmica.....	106
4.2.2 b) A deficiência do FIX agrava a aterosclerose na aorta do modelo deficiente de LDLR	106
4.2.2 c) Animais deficientes de FIX apresentam mais lesões no seio aórtico após 37 semanas de dieta no modelo deficiente de LDLR	107
4.2.2 d) A deficiência do FIX não influencia as características das lesões ateroscleróticas no modelo deficiente de LDLR	108
4.3.1 – Resultados dos elevados níveis de FIX no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de apoE	109
4.3.1 a) Níveis elevados de FIX não piora a aterosclerose na aorta dos animais deficientes de apoE	109
4.3.1 b) Níveis elevados de FIX não piora a evolução das lesões ateroscleróticas no seio aórtico dos animais deficientes de apoE.....	110
4.3.1 c) Elevados níveis de FIX aumenta a incidência de trombose venosa nos animais deficientes de apoE.....	111
DISCUSSÃO.....	113
5- DISCUSSÃO.....	115

5.1 – Desenvolvimento da doença aterosclerótica nos animais deficientes de FVIII:	116
5.2 – Desenvolvimento da doença aterosclerótica nos animais com diferentes níveis de FIX:	119
CONCLUSÕES	123
6 – Conclusões	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

LISTA DE ABREVIATURAS

AAV	Adenovirus associado
AIN	“American Institute of Nutrition”; Instituto Americano de Nutrição
APOA	Apolipoproteína A
APOB	Apolipoproteína B
APOE	Apolipoproteína E
AT	Antitrombina
CA	California
Ca⁺²	Íons Cálcio
CEMIB	Centro multidisciplinar de investigação biológica
CETP	Proteína transportadora de colesterol-éster
DAB	3-3’diaminobenzidina
dL	Decilitros
DNA	Ácido desoxirribonucleotídeo
dNTP	Desoxi-ribonucleotídeos fosfatados
EUA	Estados Unidos da América
EPCR	“endotelial protein C receptor”; Receptor endotelial de proteína C
FvW	Fator de von Willebrand
FVIII	Fator VIII
FIX	Fator IX
FT	Fator tecidual
FVa	Fator V ativado
FVIIa	Fator VII ativado

FVII:C	Fator VII
FXa	Fator X ativado
FXIa	Fator XI ativado
FXIIIa	Fator XIII ativado
HA	Hemofilia A
HB	Hemofilia B
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	“Human immunodeficiency vírus”; vírus da imunodeficiência humana
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
ITAL	Instituto Tecnológico de Alimentos
Kb	Kilobases
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
ME	Maine
mg	Miligramas
MgCl₂	Cloreto de magnésio
NL	Normal
NJ	New Jersey
OCT	"Optimum cutting temperature"
OH	Ohio

PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio 1
PAR-1	“protease-activated receptor1”; receptor de protease ativada 1
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tecidual 1
PC	Proteína C
PCa	Proteína C ativada
PCR	"Polymerase chain reaction"; reação em cadeia da polimerase
PB	Pares de base
PDGF	“Platelet-derived growth factor”; fator de crescimento derivado de plaquetas
PS	Proteína S
RNA	Ácido ribonucleico
SP	São Paulo
TFPI	“Tissue factor pathway inhibitor”; inibidor da via do fator tecidual
Tg	Transgênico
TGFβ	“Tumor growth factor” ; fator de crescimento tumoral β
TM	Trombomodulina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
U	Unidades
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos de modelos animais com hipocoagulabilidade sanguínea e aterosclerose	69
Tabela 2: Níveis de colesterol plasmático nos animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-) e nos hemofílicos A deficientes de apoE (HA/APOE-/-) submetidos a dieta com 0,15% de colesterol.....	92
Tabela 3: Níveis de colesterol plasmático nos animais deficientes de receptor de LDL (NL/LDLR) e nos hemofílicos A deficientes LDLR (HA/LDLR) submetidos a dieta rica em colesterol.....	97
Tabela 4: Colesterol plasmático nos animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-) e nos hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE-/-) submetidos a dieta com 1,25% de colesterol..	101
Tabela 5: Comparação de mortalidade entre os grupos de animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-), hemofílicos B (HB/APOE-/-) ou hemofílicos A (HA/APOE-/-).	101
Tabela 6: Colesterol plasmático nos animais deficientes de receptor de LDL (NL/LDLR) e nos hemofílicos B deficientes LDLR (HB/LDLR) submetidos a dieta rica em colesterol..	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases do desenvolvimento da placa aterosclerótica	52
Figura 2: Esquema das vias de ativação e inativação da coagulação	54
Figura 3: Esquema de ativação da PCa	55
Figura 4: Representação da genotipagem dos animais hemofílicos A	80
Figura 5: Representação da genotipagem dos animais hemofílicos B	81
Figura 6: Representação da genotipagem dos animais deficientes de apolipoproteína E (apoE)	82
Figura 7: Representação da genotipagem dos animais deficientes de LDLR	83
Figura 8: Análise in vivo de lesão aterosclerótica.....	85
Figura 9: Aortas inteiras coradas com Sudan IV, de animais sob dieta aterogênica por 37 semanas.....	93
Figura 10: Lesões vasculares no seio aórtico de animais deficientes de apoE.....	95
Figura 11: Aorta de animal deficiente de apoE e hemofílico B (HB/APOE-/-) submetido a 37 semanas de dieta com 1,25% de colesterol.....	103
Figura 12: Infiltração de macrófagos nos animais hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE-/-)..	105

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Quantificação da área da aorta afetada por lesões ateroscleróticas de animais deficientes de apo E (NL/APOE-/-) e dos animais deficientes de apoE e hemofílicos A (HA/APOE-/-), sob dieta aterogênica por 22 e 37 semanas.	94
Gráfico 2: Quantificação de extensão da doença aterosclerótica no seio aórtico entre os grupos de deficientes de apo E (NL/APOE-/-), e dos hemofílicos A deficientes de apo E (HA/APOE-/-)	96
Gráfico 3: Quantificação da área da aorta afetada por lesões ateroscleróticas nos animais deficientes de LDL (NL/LDLR) e dos animais hemofílicos A deficientes de receptor de LDL (HA/LDLR).	98
Gráfico 4: Quantificação da doença aterosclerótica no seio aórtico dos animais deficientes de receptor de LDL (NL/LDLR-/-) e dos animais hemofílicos A deficientes de LDLR (HA/LDLR-/-).....	99
Gráfico 5: Quantificação da doença aterosclerótica nos animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-) e dos hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE-/-)	102
Gráfico 6: Quantificação da doença aterosclerótica sob dieta aterôgenica (Western) no seio aórtico dos animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-) e dos animais hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE).....	104
Gráfico 7: Quantificação da doença aterosclerótica sob dieta aterogênica nos animais deficientes de LDLR (NL/LDLR-/-) e nos animais hemofílicos B deficientes de LDLR (HB/LDLR-/-)	107
Gráfico 8: Quantificação da doença aterosclerótica sob dieta aterogênica nos animais deficientes de LDLR (NL/LDLR-/-) e dos animais hemofílicos B deficientes de LDLR (HB/LDLR-/-).	108

Gráfico 9: Evolução da doença aterosclerótica na aorta dos animais apoE ^{-/-} (Tg ⁻ /APOE ^{-/-}) e dos animais apoE ^{-/-} com níveis elevados de FIX (Tg ⁺ /APOE ^{-/-}).....	110
---	-----

Gráfico 10: Quantificação da doença aterosclerótica no seio aórtico dos animais apoE ^{-/-} (Tg ⁻ /APOE ^{-/-}) e dos animais deficientes de apoE com níveis elevados de FIX (Tg ⁺ /APOE ^{-/-}).....	111
--	-----

Resumo

RESUMO

As complicações associadas à aterosclerose são as causas mais comuns de morte na população ocidental. O entendimento da aterosclerose como uma doença inflamatória e a associação da coagulação com fenômenos inflamatórios e complicações da doença arterial oferecem novas oportunidades de prevenção e tratamento.

Estudos populacionais demonstraram que o risco de infarto agudo do miocárdio está reduzido em 80% em homens hemofílicos A (HA) se comparados com controles pareados em idade e sexo. No entanto, lesões ateroscleróticas iniciais foram identificadas em pequenos grupos de pacientes com coagulopatias por estudo ultrassonográfico de artérias carótida e femural de forma semelhante aos controles pareados.

O objetivo deste estudo é determinar o papel dos fatores VIII e IX da coagulação no desenvolvimento da doença aterosclerótica em dois diferentes modelos animais de dilipidemia. Comparamos grupos de animais deficientes de FVIII (HA) ou animais deficientes de FIX (HB) deficientes apoliproteína E (APOE^{-/-}) ou deficientes de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLR^{-/-}) com animais hemostaticamente normais deficientes apenas de apoE (APOE^{-/-}) ou de LDLR (LDLR^{-/-}). Todos os animais da linhagem C57Bl/6, pareados em sexo e idade.

Nossos resultados sugerem que o FVIII tem um papel protetor e tempo dependente no desenvolvimento da aterosclerose nos animais deficientes de apoE, independente dos seus elevados níveis de colesterol. No entanto, essa proteção não foi evidente nos animais LDLR^{-/-}.

A deficiência severa do FIX (<1%) não protegeu contra o desenvolvimento da aterosclerose. Surpreendentemente, estes animais apresentaram significativamente mais lesões nos períodos mais tardios nos dois modelos de doença aterosclerótica utilizados. Os animais HB/APOE^{-/-} apresentaram altos índices de mortalidade a partir de 20 semanas do período de dieta. Os elevados níveis de FIX não influenciou o desenvolvimento da doença arterial nos modelos apoE, mas mostrou-se como fator de risco para trombose venosa.

Este estudo demonstra que o FVIII e o FIX têm papéis heterogêneos na evolução da aterosclerose, sugerindo participação em mecanismos independentes ao da coagulação no desenvolvimento da doença arterial, e novos estudos devem ser realizados visando novas possibilidades terapêuticas também para os pacientes hemofílicos de idade mais avançada com risco de doença cardiovasculares.

SUMMARY

Complications of atherosclerosis are the most common causes of death in Western societies. The knowledge that atherosclerosis is an inflammatory disease and coagulation affects the disease's complications offers new opportunities for prevention and treatment. Population studies demonstrated that the risk for myocardial infarction is reduced by 80% among hemophilia A (HA) men compared to age and gender-matched controls. However, early atherosclerotic lesions were readily identified in small cohorts of adults HA and hemophilia B (HB) by ultrasonography of carotid and femoral arteries in a similar fashion to an age-control male group.

Here we sought to determine the role of FVIII and FIX on the development of atherosclerosis in two different mouse models. We compared a group of FVIII (HA) or FIX deficient mice (HB) lacking the low-density lipoprotein receptor (LDLR^{-/-}) or apolipoprotein E (APOE^{-/-}) with hemostatically normal littermate controls lacking either LDLR (LDLR^{-/-}) or apoE (APOE^{-/-}). All mice were on C57Bl/6 background and all groups were matched for gender and age.

Our results suggest that FVIII has a protective and time dependent effect on development of atherosclerosis in apoE deficient mice, independently of higher cholesterol levels. Notably, FVIII deficiency did not influence the vascular disease of LDLR^{-/-} mice.

Severe FIX deficiency (<1% of normal) did not protect against the development of atherosclerosis. Unexpectedly, the rates of lesions were higher at late time points in the APOE^{-/-} model. In addition, high levels of FIX did not influence the vascular disease in APOE^{-/-} whereas venous thrombosis was documented in 3/6 mice. Moreover, in the HB/APOE^{-/-} model, the rates of atherosclerosis were higher at week 22 and beyond this age these mice presented high rates of mortality than controls.

These data demonstrate that FVIII and FIX play a rather heterogeneous role in the development of atherosclerosis which suggest that there are coagulation independent mechanisms in the development of vascular diseases.

Further studies in hemophilia B subjects and carriers are warranted to define the FIX effect on the onset and progression of occlusive vascular disease which may raises concerns on the onset cardiovascular risks on an aging hemophilia population.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença vascular crônica, cujas lesões iniciais podem ser detectadas ainda no período fetal (Napoli *et al*, 1997). A patogênese da aterosclerose é decorrente de reações celulares e moleculares específicas que são melhores descritas, em conjunto, como uma doença inflamatória. A doença ocorre principalmente nas artérias grandes e médias, e a oclusão desses vasos pode resultar no infarto do miocárdio, isquemia vascular cerebral ou periférica.

A evolução da doença é heterogênea e resulta da interação entre fatores hereditários e adquiridos. O controle dos níveis de colesterol plasmático e mudanças no estilo de vida possibilitaram melhoras significativas na evolução e profilaxia das complicações da aterosclerose, mas a doença continua sendo a principal causa de morte em países desenvolvidos.

No Brasil, as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte entre indivíduos acima de 60 anos de idade (47%), sendo que 28% são devido à doença cardiovascular isquêmica. Entre 1930 e 1980 a mortalidade associada a doenças cardiovasculares cresceu de 12% para 31%, provavelmente refletindo o aumento da sobrevida média da população que repercute atualmente no envelhecimento progressivo da população brasileira. Duncan e colaboradores (Duncan *et al*, 1992) demonstraram que as doenças vasculares estão associadas à elevada morbi-mortalidade mesmo entre indivíduos jovens, ou seja, a população economicamente ativa. Assim, as doenças cardiovasculares associadas ao envelhecimento progressivo da população e à inatividade precoce da população economicamente ativa são fatores que interferem no desenvolvimento econômico do país.

O tratamento das complicações vasculares decorrentes da aterosclerose consiste basicamente na remoção da obstrução vascular por catéteres ou cirurgias, na implantação de *bypass* biológicos ou metálicos e, na terapia antiplaquetária e/ou anticoagulante. Dessa forma, o acesso ao tratamento especializado é limitado em virtude do alto custo e da complexidade dos

procedimentos e, dessa forma, amplia as consequências desfavoráveis das doenças vasculares oclusivas.

O reconhecimento de fatores de risco para o desenvolvimento de doença oclusiva arterial visando tanto o tratamento como a orientação para programas de prevenção são fundamentais no controle dessa patologia. Nesse sentido, a identificação do tabagismo (como risco) e o uso da aspirina (como prevenção) são exemplos do benefício de tal investigação. Entretanto a complexidade dessa patologia pode ser apreciada pela heterogeneidade de fatores de risco identificados em estudos clínico epidemiológicos. Os fatores identificados em programas de seguimento de três décadas foram: idade, sexo masculino, história familiar de doença arterial oclusiva, dislipidemia, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus*, sedentarismo e a obesidade (Kannel *et al*, 1976).

O evento isquêmico agudo do miocárdio, cerebral ou periférico é resultante de dois processos. Inicialmente o desenvolvimento crônico e lento da placa aterosclerótica, sobre a qual a formação de trombo oclusivo origina a isquemia tecidual. Enquanto é freqüente relacionar a hipercoagulabilidade crônica sanguínea ao desenvolvimento do trombo sobre a placa aterosclerótica como o evento final para oclusão arterial aguda, esse estudo focaliza o efeito da hipocoagulabilidade crônica no desenvolvimento da aterosclerose.

1.1 - Fisiopatologia da aterosclerose

Do ponto de vista clínico-patológico, a aterosclerose compreende basicamente 4 etapas: 1) inicia-se com uma disfunção endotelial, caracterizada pela perda da integridade vascular, levando a adesão e aumento da permeabilidade e migração para a parede vascular, de lipoproteínas e células. A partir dessa alteração da função endotelial, há evolução para a 2) lesão inicial, denominada *fatty streak*, caracterizada pela presença de macrófagos ricos em lipídeos e linfócitos T na camada íntima da parede arterial; 3) lesão intermediária, composta de camadas de células de músculo liso e macrófagos; e, finalmente, 4)

a evolução para estágio avançado, denominado placa fibrótica, composta por tecido conectivo denso, células musculares lisas e um composto de lipídios e tecido necrótico (Ross, 1998).

Na fase inicial da aterosclerose ocorre lesão funcional do endotélio, até então intacto. Posteriormente, há aumento da permeabilidade e ativação endotelial com efluxo de macromoléculas plasmáticas para a íntima e recrutamento de monócitos. Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são depositadas na íntima, oxidadas (oxLDL) e endocitadas por macrófagos, dando origem às chamadas células espumosas (*foam cells*). Simultânea ou subsequente há proliferação das células de músculo liso da camada íntima e secreção de matriz abundante em colágeno, formando uma lesão elevada na íntima, que é a placa aterosclerótica madura. Nesta fase formam-se na íntima áreas lipídicas desnudas, acelulares, secundárias à necrose de células espumosas que infiltraram a placa, que serão cobertas por uma capa fibrosa, contendo células musculares lisas e colágeno.

Num estágio final, na superfície da placa madura há evidências de formação de trombo, com deposição de fibrina e plaquetas. A incorporação de microtrombos e os fatores de crescimento derivados do trombo ou das plaquetas parecem ter um papel significativo na progressão do componente esclerótico da placa relacionado às células musculares lisas.

Monócitos e macrófagos são capazes de degradar a matriz extracelular por fagocitose ou por secreção de enzimas proteolíticas, como ativadores do plasminogênio e metaloproteinases, que podem afilar a capa fibrosa da placa aterosclerótica, predispondo-a à ruptura. As placas rotas contêm menos colágeno que as placas intactas e sua resistência tênsil é menor. Os principais determinantes da desestabilização e do risco de ruptura da placa parecem ser seu tamanho, sua espessura e a densidade de macrófagos (Davies *et al*, 1993; Moreno *et al*, 1994), e processos inflamatórios locais, com ativação de macrófagos que também participam desse processo (van der Wal *et al*, 1994).

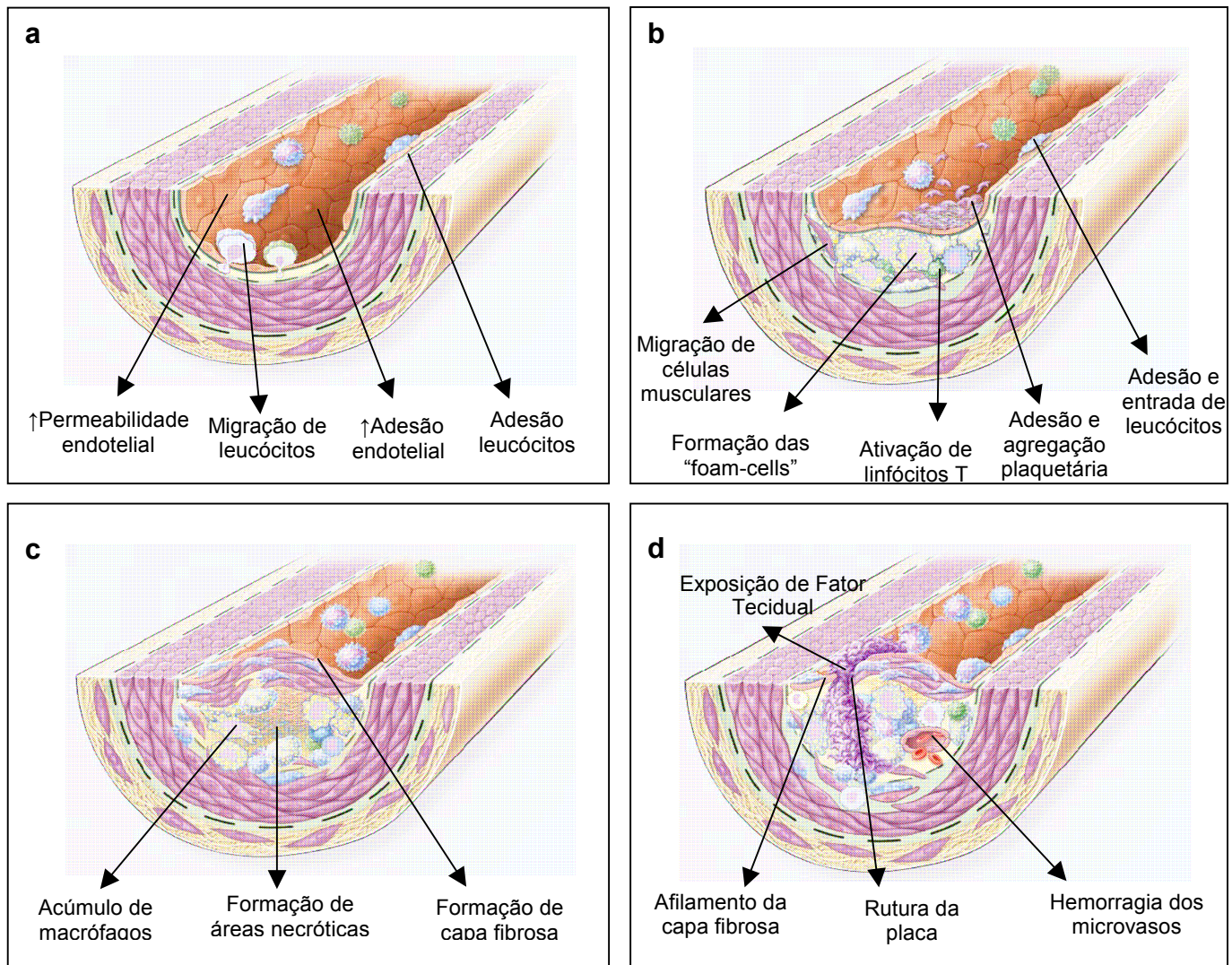


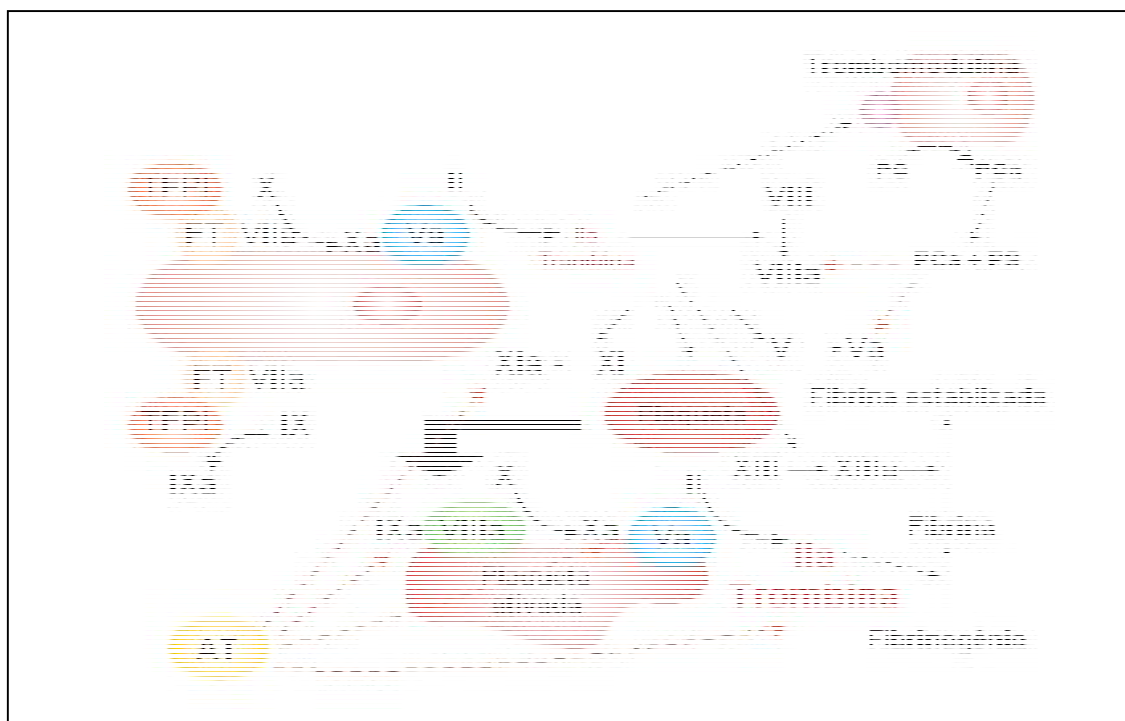
Figura 1: Fases do desenvolvimento da placa aterosclerótica. a) Disfunção endotelial; b) Lesão inicial ("fatty streak"); c) Lesão avançada; d) Placa instável (Ross R. NEJM; 1998)

1.2 - Fisiologia da Coagulação Sanguínea

O ponto central na hemostasia sangüínea é o controle da geração de trombina, uma protease essencial que ativa as plaquetas e cliva o fibrinogênio para a formação do coágulo sangüíneo (função pró-coagulante). A geração de trombina, didaticamente dividida em vias intrínseca e extrínseca, é desencadeada pela exposição do fator tecidual (FT), após injúria vascular, exposição de

superfícies celulares ou micropartículas, e sua ligação com o fator VII ativado (FVIIa). O complexo FT/FVIIa ativa o fator X (FX), que na presença do fator V ativado (FVa), do íon Ca^{2+} e de fosfolípídeo, formam o complexo protrombinase, cujo substrato é a protrombina. Além disso, o complexo FT/FVIIa também ativa o fator IX. A decorrência direta da ação do complexo protrombinase é a geração de trombina. Esse conjunto de reações constitui a fase de iniciação da coagulação, em que pequenas quantidades de trombina são geradas. Em seguida essa trombina, ainda em concentrações menores do que aquelas necessárias para a formação de um coágulo, atua sobre outros substratos, amplificando sua própria geração. Esse conjunto de reações inclui: (1) ativação do fator XI; (2) ativação dos co-fatores V e VIII; (3) ativação de plaquetas; (4) ativação do fibrinogênio em fibrina, e é conhecido como fase de amplificação. Em decorrência das reações da fase de amplificação, ocorre um aumento rápido da quantidade de trombina gerada no sistema, levando à formação e propagação do coágulo. Nessa fase a fibrina é estabilizada pela ação do FXIIIa, cuja ativação também é dependente da trombina.

Assim, os fatores VIII e IX são fundamentais para que quantidades ideais de trombina sejam geradas para a formação de coágulos estáveis. O complexo FVIIIa/FIXa liga-se à superfície plaquetária e faz-se essencial para sua ativação e geração de trombina. Essa importância é ilustrada pelo fenótipo característico das hemofilias A e B. As deficiências isoladas dos fatores VIII (hemofilia A) ou IX (hemofilia B) levam a redução de trombina na ordem de 50.000 a 100.000 vezes do normal. Esses indivíduos apresentam sangramentos espontâneos em cavidades, tecidos moles e intra-articulares, quando a atividade residual dos fatores VIII ou IX é inferior a 1% daquela determinada no plasma normal.

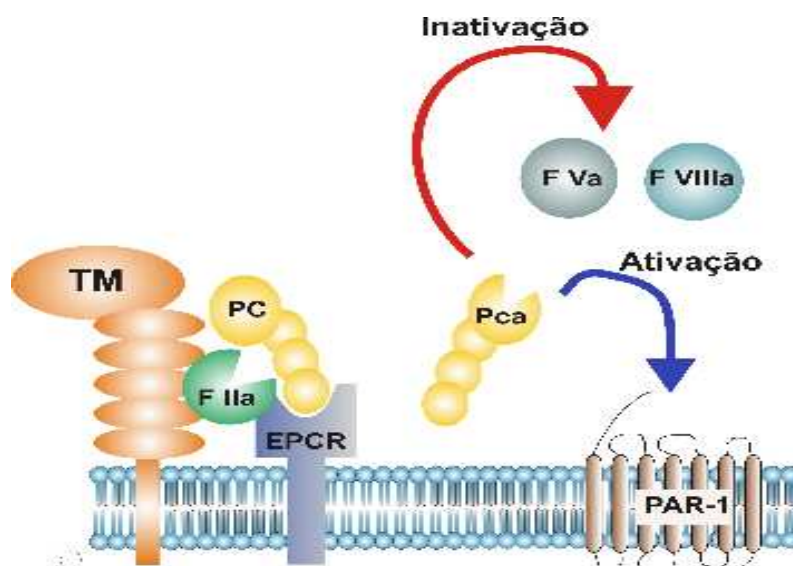


FT: Fator tecidual; TFPI: Inibidor da via do Fator Tecidual; PC: Proteína C, PCa: Proteína C ativada; PS: proteína S;

Figura 2: Esquema das vias de ativação e inativação da coagulação

Em paralelo a essas reações, três sistemas anticoagulantes são ativados. O primeiro deles é o inibidor da via do FT (TFPI ou *tissue factor pathway inhibitor*) que forma um complexo inibitório quando há formação do FT/FVIIa/FXa ainda na fase de iniciação (Lu *et al*, 2004). Outro é o da antitrombina (AT), que é um inibidor primário da trombina, mas também atua inibindo outras proteínas da coagulação como o FIXa, Xa e XIa. Destaca-se, finalmente, o sistema da proteína C ativada (PCa), cuja ativação é desencadeada pela interação da trombina com a trombomodulina, seu receptor, localizado nas células endoteliais. A ativação da proteína C é feita pelo complexo trombina-trombomodulina e depende da presença de proteína C na superfície endotelial, através de sua ligação com o receptor endotelial para proteína C (EPCR) conforme ilustra a figura 3. A ação anticoagulante da Proteína C ativada (PCa) é baseada em sua ação proteolítica, com a clivagem em sítios específicos dos fatores Va e VIIIa, inativando-os. Sua

ação depende ainda da presença de seus co-fatores, lípides e proteínas, como a Proteína S (PS), fator V, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e fosfolípides aniônicos.



TM: trombomodulina; PC: proteína C; Pca: proteína C ativada, FIIa: trombina; EPCR: receptor endotelial da proteína C; PAR-1: receptor de protease ativada 1; FVa: fator V ativado; FVIIIa: fator VIII ativado.

Figura 3: Esquema de ativação da Pca, através de seus receptores EPCR e TM e PAR-1

1.3 - Efeitos celulares da trombina e da Pca

Nos últimos anos foram demonstradas importantes ações de elementos da coagulação em outros processos orgânicos que não a hemostasia, com destaque para a trombina. Essas ações, coletivamente referidas como efeitos celulares da trombina, são mediadas por sua ligação com receptores ativados por protease (PAR) presentes em células endoteliais, cuja ativação desencadeia uma série de

efeitos independentes da coagulação, tais como indução de angiogênese e ativação de vias pró-inflamatórias.

A PCa também apresenta efeitos celulares independentes da coagulação, mediados em parte pela ligação a receptores PAR-1. Através dessas vias, a PCa exerce múltiplos efeitos citoprotetores, como ações anti-inflamatórias, atividade anti-apoptótica, controle de expressão gênica e proteção da função endotelial de barreira (Mosnier *et al*, 2007).

Inicialmente presumiu-se que o benefício anti-inflamatório conferido pela PCa era decorrente de sua ação na regulação da geração da trombina. No entanto, esse efeito é ilustrado pelo fato da PCa ter sido o único anticoagulante natural a apresentar efeito benéfico sobre a mortalidade de pacientes com sepse grave (Bernard *et al*, 2001; Warren *et al*, 2003; Warren *et al*, 2001). Outros estudos em murinos também evidenciaram essa ação anti-inflamatória da PCa independente da sua ação anticoagulante, com ações neuro-protetoras (Cheng *et al*, 2003), e proteção em processos infecciosos graves (sepse) com redução de mortalidade (Kerschen *et al*, 2005 e 2006; Mosnier *et al*, 2004). O estudo PROWESS (*Protein C Evaluation in Severe Sepsis*) foi o primeiro trabalho a demonstrar uma significativa redução da mortalidade associada a sepse com uso da PCa, o que não foi obtido quando utilizados outros anticoagulantes como o TFPI e a AT. Mais recentemente, estudos utilizando variantes da proteína C modificadas geneticamente, sem o domínio anticoagulante, reforçaram a segregação desses efeitos (Mosnier *et al*, 2004).

1.4 - Interação entre hemostasia e doença arterial oclusiva cardiovascular

A interação entre hemostasia e doença arterial oclusiva já foi testada pela avaliação dos níveis plasmáticos das proteínas da coagulação e sua relação com a doença arterial oclusiva. Dentre os marcadores de risco para doença arterial associados à coagulação, o fibrinogênio parece ser o mais importante, como

ilustrado pelos dados do estudo Framingham (Stec *et al*, 2000). Os níveis de fibrinogênio estão diretamente relacionados a outros fatores de risco para doença cardiovascular, como idade, índice de massa corporal, *diabetes mellitus*, colesterol, triglicérides e tabagismo. Essa correlação com os fenômenos oclusivos arteriais pode estar associada a sua ação na produção de fibrina, na agregação plaquetária e também porque é um marcador de fase aguda, que se eleva nos estados inflamatórios.

Outro marcador de coagulação frequentemente associado aos fenômenos arteriais agudos são os fragmentos D-dímeros de fibrina, relacionados tanto com a gravidade como com o risco de recorrência das complicações oclusivas (Lee *et al*, 1995; Danesh *et al*, 2001). Sua dosagem tem sido utilizada como um marcador independente da doença cardiovascular, assim como a proteína C reativa (Lowe *et al*, 2004).

Em geral, os estudos realizados para a correlação entre hipercoagulabilidade e o desenvolvimento de doença aterosclerótica relacionam a hipercoagulabilidade ao evento isquêmico final, ou seja, ao infarto agudo do miocárdio e à isquemia cerebral ou periférica, sendo raros os estudos que correlacionam a hipercoagulabilidade com a gravidade das lesões ateroscleróticas. Um fator limitante desse tipo de estudo é a heterogeneidade das populações estudadas quanto à presença de outros fatores de risco para doença aterosclerótica, além do fato de hábitos e estilo de vida ser constantemente modificados ao longo do período de observação. Assim, mesmo estudos prospectivos de longo período de observação, como o estudo Framingham, apresentam limitações para avaliação do efeito isolado de fatores da coagulação na progressão da aterosclerose.

Uma outra estratégia para avaliação da interação entre coagulação e aterogênese é o estudo do efeito de polimorfismos associados a hipercoagulabilidade sobre o risco da doença arterial oclusiva. Embora a descoberta desses polimorfismos tenha gerado grande entusiasmo na investigação de pacientes com tromboembolismo venoso, o mesmo não ocorreu no estudo da doença arterial oclusiva (Lane *et al*, 2000).

Dentre os estudos epidemiológicos, alguns foram realizados associando a elevação dos níveis de fatores pró-coagulantes às doenças arteriais oclusivas, como o FVIII (Gorog *et al*, 1998; Rosendal *et al*, 1992 e Pan *et al*, 1997), IX e XI (Minnema *et al*, 2000) ou XII (Cooper *et al*, 2000). Outros estudos associam ainda a diminuição da atividade fibrinolítica ao desenvolvimento da doença arterial, como a elevação da atividade do inibidor do ativador do plaminogênio (PAI-1) (Yamada *et al*, 2002)

Em resumo, o aumento da atividade coagulante e sua relação com a doença arterial oclusiva ainda permanece controverso, sendo indefinido se as alterações detectadas em estudos epidemiológicos devem ser consideradas causas ou meramente indicadores de risco.

1.4.1 - Interação entre hipocoagulabilidade e doença arterial oclusiva cardiovascular

Duas situações clínicas associadas à hipocoagulabilidade sanguínea devem ser consideradas na análise da influência da coagulação no desenvolvimento da doença arterial oclusiva: (1) o impacto benéfico do uso de anticoagulantes sobre a mortalidade aguda e tardia do infarto do miocárdio, e (2) a baixa incidência de doença arterial oclusiva em pacientes com deficiências hereditárias dos fatores de coagulação.

A hemofilia é a coagulopatia hereditária mais freqüente em homens e, dessa forma, possibilita determinar o papel dos fatores VIII (hemofilia A) e IX (hemofilia B) no desenvolvimento das complicações vasculares da aterosclerose, justamente no grupo de indivíduos de maior risco.

Em estudo publicado em 1989 sobre mortalidade e causas de óbito em hemofílicos na Holanda, Rosendaal e colaboradores, sugeriram que a mortalidade por doença isquêmica coronariana em hemofílicos é menor que na população em geral (Rosendaal *et al*, 1989). Posteriormente, esta hipótese foi confirmada com

um estudo comparativo de fatores de risco para doença coronariana isquêmica entre hemofílicos e a população geral (Rosendaal *et al*, 1990). Em estudo mais recente, em que foram avaliadas a mortalidade e a expectativa de vida dos hemofílicos não infectados por HIV no Reino Unido (Darby *et al*, 2007), novamente evidenciou-se a redução do número de mortes por isquemia coronária nesse grupo de pacientes (38%) em comparação com a população geral (62%). É interessante que a proteção encontrada nos portadores de hemofilia (36%) foi semelhante a dos pacientes hemofílicos (Srámek *et al*, 2003).

No estudo publicado por Rosendaal (Rosendaal *et al*, 1990), é interessante lembrar que a redução da doença coronariana nos pacientes hemofílicos não foi atribuída a diferenças nos fatores de risco, como colesterol ou pressão arterial, sugerindo que essa proteção estivesse de alguma forma associada a algum aspecto específico da hemofilia.

Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar essa baixa incidência, entre elas (1) a menor sobrevivência desses pacientes, o que limitaria a ocorrência de eventos arteriais oclusivos; (2) a menor capacidade de geração de trombina, limitando a formação de trombos sobre a placa; ou (3) mecanismos ainda desconhecidos que protegeriam esses pacientes do desenvolvimento da doença aterosclerótica.

1.4.2 - Evidências clínicas da associação entre hipocoagulabilidade e o desenvolvimento da aterosclerose

Conforme mencionado anteriormente, poucos estudos correlacionaram o desenvolvimento da aterosclerose (e não a complicação trombótica) aos fatores da coagulação. Analisando um grupo limitado de pacientes com hemofilia A juntamente com pacientes portadores de outras coagulopatias, Smárek e colaboradores (Smárek *et al*, 2001) demonstraram que a deficiência de fator VIII não influenciou o desenvolvimento do espessamento da parede vascular arterial

carotídea ou femoral. Embora interessante, o estudo apresenta limitações significativas quanto à seleção de pacientes, métodos indiretos de avaliação da doença vascular (ultrassonográficos), heterogeneidade nos níveis residuais de FVIII e representação limitada de hemofílicos (n=8). Outro estudo (Birola *et al*, 2006), utilizando a mesma metodologia, mas avaliando os troncos das artérias carótida e femoral, artéria braquial e aorta abdominal, e com um número maior de pacientes somente com diagnóstico de hemofilia A (n=50) encontrou resultados diferentes. Nesse estudo demonstrou-se que a espessura da média/intima dessas artérias estava significativamente menor em hemofílicos A do que no grupo controle pareado. Os autores concluíram que a hemofilia A protege contra o desenvolvimento da aterosclerose assintomática. É interessante ressaltar que estudos sistemáticos de avaliação de doença arterial, em separado para Hemofilia B, ainda não foram publicados até o momento.

1.5 - Modelos animais para estudo de aterosclerose

Alguns modelos animais são utilizados no estudo da doença aterosclerótica, como primatas, suínos, coelhos, hamsters e pombos. O modelo murino é o mais utilizado para o estudo fisiopatogênico da aterosclerose, pois (1) tem alta reprodutividade com gestação de apenas 21 dias, possibilitando a realização de estudos que necessitam de grande número de animais; (2) existem modelos animais desenvolvidos pela técnica de *knockout* gênico.

Em meados dos anos 80, foi introduzida a utilização de animais geneticamente modificados como modelos para reprodução da doença aterosclerótica, na tentativa de compreender seus mecanismos de iniciação e progressão (Paigen *et al*, 1987; Armstrong *et al*, 1990; Breslow, 1993). Esses animais mostram-se úteis não só no estudo das influências do meio, hormônios ou drogas no desenvolvimento da doença aterosclerótica, como também permitem o estudo de eventos moleculares, assim como, de fatores relacionados a hemostasia, permitindo de maneira mais satisfatória o estudo *in vivo* das

interações entre os diferentes mecanismos (celulares e plasmáticos) envolvidos na aterogênese.

1.5.1 – Camundongos deficientes de apolipoproteína E

A apolipoproteína E (apoE) é uma das dez apolipoproteínas que mediam o metabolismo das partículas lipoproteicas. É sintetizada principalmente no fígado, mas também em outros tecidos, como no cérebro (principal sítio de expressão, depois do fígado) e em menores níveis, na adrenal, testículos e ovários.

Em humanos, é uma glicoproteína de 34kd presente no plasma com concentração entre 3 a 5 mg/dl. A apoE e suas isoformas assim como seus defeitos genéticos são relacionados a dislipidemias e doença arterial.

A apoE age como um ligante para o receptor das lipoproteínas de baixa densidade (LPR) e é crucial tanto para a remoção direta das lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), como para sua conversão em partículas lipoprotéicas menores (LDL).

Além do transporte e *clearance* das lipoproteínas, a apoE também tem mostrado importante papel no transporte reverso do colesterol, distribuição de colesterol entre os tecidos, imunorregulação, proliferação e diferenciação celular (Mahley *et al*, 1988).

Em humanos, a deficiência da apoE gera acúmulo de IDL e quilomícrons, levando a um quadro de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, com acúmulo das β -VLDL, que são aterogênicas, numa condição conhecida como disbetalipoproteinemia (ou hiperlipoproteinemia tipo III), caracterizada por desenvolvimento precoce de doença aterosclerótica e aparecimento de xantomas planares (Ghiselli *et al*; 1981).

Em 1992, camundongos da linhagem C57BL/6, deficientes em apolipoproteína E (APOE-/-) e gerados por recombinação homóloga de células

primordiais embrionárias, mostraram desenvolver hipercolesterolemia grave e lesões ateroscleróticas precocemente, com características e distribuição semelhantes às encontradas em humanos (Plump *et al*, 1992; Zhang *et al*, 1992, Nakashima *et al*, 1994). Esses animais desenvolveram não apenas lesões de gordura, mas também placas de fibrose em sítios vasculares tipicamente afetados em humanos, como na base da aorta, na curvatura da aorta torácica, nas carótidas e suas ramificações, nas artérias intercostais, mesentéricas, renais, ilíacas e ainda coronárias, femorais, subclávias e braquiocefálicas. Essas lesões mostraram ter início no animal com 5 a 6 semanas de idade, com a adesão de monócitos ao endotélio nas lesões elevadas e migração transendotelial. Com 10 semanas iniciam-se as lesões com deposição de gordura e com 15 semanas aparecem lesões intermediárias, com células espumosas e de músculo liso. As placas fibrosas aparecem depois de 20 semanas e consistem em uma área necrótica coberta por uma capa fibrosa e células musculares lisas, circundadas por fibras elásticas e colágeno, e, nos animais mais velhos, há progressão das placas fibrosas. Em algumas lesões avançadas ocorre destruição de algumas células mediais, com formação de aneurismas e, em outras, pode ocorrer calcificações no tecido fibrótico. Pode haver ainda intensa fibro-proliferação com obstrução do lúmen e oclusão de vasos. Surpreendentemente raramente são encontradas nesses animais lesões caracterizadas por trombose (Calara *et al*, 2001).

Quando mantidos sob dieta padrão (baixos níveis de gordura), os níveis de colesterol plasmático variaram em torno de 494 ± 95 mg/dl, comparado com níveis de 60 ± 20 mg/dl dos animais controle mantidos sob mesma dieta. Entretanto, os níveis de triglicerídeos apresentaram apenas discreta elevação em relação aos controles (110mg/dl versus 64mg/dl dos controles). Quando submetidos a uma dieta mais similar à dieta humana (tipo Western, com 21% de gordura e 0,15% de colesterol), os níveis de colesterol elevaram-se ainda mais, variando de 1831 ± 395 mg/dl, comparado com 132 ± 18 mg/dl dos controles submetidos à mesma dieta, mantendo, ainda, apenas um discreto aumento de triglicerídeos (107 ± 24 mg/dl versus 80 ± 29 mg/dl dos controles). Através de estudo cromatográfico foi

identificado que esse aumento de colesterol se dava principalmente pelas frações de VLDL e IDL. É interessante ressaltar que esses resultados foram obtidos com animais homozigotos para a deficiência, sendo que os animais heterozigotos, em contrapartida, não apresentaram diferenças significativas nos níveis de lípidos ou lipoproteínas, mesmo quando submetidos à dieta tipo Western (Plump *et al*, 1992).

Além da elevação acentuada dos níveis de colesterol, esses animais, quando submetidos à dieta Western, desenvolvem lesões pelo menos 3 vezes mais extensas do que quando mantidos em dieta padrão (Zhang *et al*, 1992).

Assim, os animais deficientes em apoE mostraram-se um bom modelo para representar a doença aterosclerótica humana, tanto pela localização como pelas características das lesões e têm sido amplamente utilizados em estudos experimentais para doença aterosclerótica.

1.5.2 – Camundongos deficientes dos receptores de lipoproteína de baixa densidade

Os receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), assim como os LDLR-proteína relacionada (LRP), são membros da mesma “família” de receptores endocíticos. Os LDLR têm papel fundamental no metabolismo de colesterol, através da endocitose de lipoproteínas. Esse processo é dependente da alta afinidade entre os LDLR e suas proteínas ligantes, a apolipoproteína E e a apoB-100, ambas presentes nas superfícies das partículas de lipoproteínas plasmáticas (Brown *et al*, 1986; Willnow *et al*, 1999). Alterações no gene *LDLR* estão associadas ao diagnóstico da hipercolesterolemia familiar, doença caracterizada pela elevação da concentração do colesterol plasmático (principalmente da fração LDL) e elevado risco de aterosclerose e doença coronariana (Francke *et al*, 1984).

Em 1994, Ishibashi e colaboradores, através de recombinação homóloga de células primordiais embrionárias, desenvolveram camundongos da linhagem C57BL/6, deficientes de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR^{-/-}),

que manifestam com diminuição do *clearance* de VLDL, lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) do plasma (Ishibashi *et al*, 1994). Como resultado, os níveis de colesterol plasmático total de 108mg/dl nos animais sem a deficiência elevam-se para 236mg/dl nos animais deficientes dos receptores, com aumento de sete a nove vezes nos níveis de IDL e LDL. No entanto, os animais adultos deficientes não exibem xantomatose como se observa em humanos com hipercolesterolemia familiar e a extensão da doença aterosclerótica na aorta é pequena.

Porém, esses animais, quando submetidos a uma dieta aterogênica (contendo 1,25% de colesterol), desenvolveram hipercolesterolemia (principalmente por acúmulo de LDL e IDL) e doença aterosclerótica. E, por um período mais prolongado sob a dieta, desenvolvem lesões avançadas com presença de fibrose e calcificação, como encontrado em humanos (Breslow *et al*, 1993).

Esses animais mostraram-se, então, quando submetidos à dieta aterogênica, um bom modelo para estudos da doença aterosclerótica humana, sendo também freqüentemente utilizados nos trabalhos com esses objetivos.

1.6 - Modelos animais de coagulação

Para utilização em estudos experimentais, apenas cachorros apresentam mutações espontâneas relacionadas à hemofilia. O desenvolvimento de camundongos deficientes em FVIII ou FIX por *knockout* gênico permite a investigação *in vivo* das funções desses fatores. De maneira geral, esses animais mimetizam a doença hemorrágica em humanos, apresentam herança ligada ao cromossomo X e reproduzem-se normalmente. Talvez a grande diferença, que oferece vantagens sobre a doença em humanos, é que as fêmeas homozigotas para o gene deficiente não apresentam maior sangramento vaginal ou uterino durante o parto. Existe mortalidade maior entre os fetos do sexo masculino do que

do feminino, no entanto, nenhuma anormalidade do desenvolvimento foi observada. O desenvolvimento de hemartroses, sangramentos intracavitários, ou sangramentos pós procedimentos cirúrgicos são exemplos da semelhança com a doença em humanos. Os reagentes laboratoriais disponíveis para a análise do plasma humano podem ser facilmente adaptados para amostras murinas e, assim, oferecer confirmação diagnóstica correta, além da avaliação molecular do genótipo.

Habitualmente esses animais apresentam sangramentos espontâneos intra-articulares ou subcutâneos, entretanto a sobrevida é longa (~18 a 24 meses), o suficiente para realização de experimentos que necessitam de longos períodos de observação. Esses animais têm sido amplamente utilizados em estudos experimentais de hemofilia, especialmente em terapia gênica.

1.6.1 – Camundongos com hemofilia A

Para a hemofilia A, dois modelos murinos foram criados através de deleções isoladas dos exóons 16 ou 17 do gene do FVIII. Em 1995, Bi e colaboradores desenvolveram modelos murinos deficientes em fator VIII (fator VIII *knockout*), por inserção de um *neo* gene na porção 3' terminal do exon 16 e exon 17 do gene do fator VIII (Bi *et al*, 1995). Esses animais comprovadamente não têm atividade plasmática de FVIII, mas têm boa reprodutividade, não apresentam sangramentos espontâneos, além de terem boa sobrevida.

Até o momento, não há disponibilidade de animais com deleção ou inversão total do gene do FVIII (o que representaria mais fidedignamente a mutação mais comum em humanos).

1.6.2 – Camundongos com hemofilia B

Por outro lado, três modelos de grandes deleções do gene do FIX foram gerados, por laboratórios distintos e com semelhanças quanto ao fenótipo e características reprodutivas (Lin *et al*, 1997; Huig-Feng *et al* 1997; Kung *et al*, 1998).

Em 1997, utilizando-se de método “*plug-socket*” de manipulação de genes, Lin e colaboradores desenvolveram um modelo murino deficiente de FIX (fator IX “*knockout*”), substituindo o promotor do exon 3 do gene do fator IX pelo neo Δ HPRT, que é um gene funcional mais o minigene parcialmente deletado da hipoxixantina fosforibosil transferase. Em estudo posterior, Kung e colaboradores demonstraram sucesso na utilização de camundongos da linhagem C57Bl/6 deficientes em FIX em seus experimentos, com correção do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) e dos sintomas hemorrágicos, utilizando fator IX purificado de plasma humano (Kung *et al*, 1998).

Tanto os animais FVIII *knockout*, como os FIX *knockout*, não mostraram atividade coagulante residual do fator deficiente, demonstradas pelo TTPa.

1.5.3 – Camundongos com hiper-expressão de Fator IX

Em 2004, Sabatino e colaboradores (Sabatino *et al*, 2004) publicaram um artigo no qual descreveram novos modelos murinos para hemofilia B, com diferentes mutações no gene do FIX, refletindo os diferentes tipos de mutações que causam a doença em humanos. Eles desenvolveram camundongos transgênicos expressando tanto fator IX humano (hFIX), como variantes do FIX. Esses animais abriram uma nova opção para estudos experimentais em busca de novas abordagens terapêuticas para hemofilia.

Assim, estudos em qualquer um desses modelos são representativos da doença em humanos. Embora modelos para deficiências de outros fatores da coagulação tenham sido desenvolvidos, a maioria deles apresenta elevada

mortalidade intra-útero ou neonatal, o que inviabiliza o estudo *in vivo* em homozigotos (Sun *et al*, 1998).

1.7 - Importância de estudos *in vivo* para a avaliação do papel de proteínas da coagulação na aterogênese

Estudos utilizando modelos animais, em que genes críticos para a coagulação sanguínea normal ou metabolismo lipídico foram inativados por técnicas de DNA recombinante, oferecem uma oportunidade de investigação fisiopatológica *in vivo* do papel de proteínas da coagulação na fisiopatogênese das doenças arteriais oclusivas. Enquanto a caracterização funcional de várias proteínas animais normais ou mutantes pode ser facilmente explorada por métodos *in vitro*, a interação de proteínas em sistemas complexos como a coagulação e o sistema vascular não são adequadamente avaliados em métodos *ex vivo*. Além disso, a natureza crônica da doença aterosclerótica só pode ser mimetizada em animais nos quais a modulação de fatores pró e contra o processo vascular degenerativo possa ser adequadamente avaliada.

1.8 - Resultados de estudos em modelos animais sobre o papel da hemostasia na aterogênese

Vários cruzamentos entre modelos animais de aterosclerose com modelos animais de alterações da hemostasia já foram publicados, como os citados na tabela 1. Observamos que em diferentes modelos, a coagulação parece interferir no processo de aterosclerose. Em modelos de hipocoagulidade (como, por exemplo, deficientes de fator de von Willebrand ou deficientes de PAI-1), esses animais mostraram redução das lesões, principalmente nos pontos onde a coagulação parece mais ativada (bifurcações e turbilhonamentos), com influência não só na presença das lesões, mas ainda no tempo para seu aparecimento e nas

suas características. Em estudo realizado com animais com hipercoagulabilidade (deficientes em plasminogênio ou com presença do fator V de Leiden) alterações na evolução das lesões também foram observadas, com aumento das lesões na íntima.

Esses estudos têm demonstrado, de forma cada vez mais clara, a existência de interações entre diversos mecanismos para o desenvolvimento da doença aterosclerótica. E são fundamentais tanto para o entendimento dos seus diferentes mecanismos como para a elaboração de novas frentes terapêuticas.

Tabela 1: Estudos de modelos animais com hipocoagulabilidade sanguínea e aterosclerose

Genótipo	Fenótipo	Modelo doença arterial	Linhagem Animal	Dieta	Evolução	Referência
FvW (-/-)	sangramento	Defic LDL-R	C57Bl/6	Aterogênica (Colesterol 1,25%)	↓ das lesões <i>fatty streak</i> ↓ lesões fibrosas precoces sem alterações no tamanho das lesões	Methia, 2001
FvW (-/-)	sangramento	Defic apoE	C57Bl/6	Normal (padrão)	↓ lesões fibrogordurosas precoces ↓ lesões em pontos de bifurcações (fluxo alterado)	Methia, 2001
Fibrinogênio (-/-)	sangramento	Defic apoE	C57Bl/6	Normal (padrão)	Sem diferenças no tamanho e complexidade das lesões	Xiao, 1998
Fibrinogênio (-/-)	sangramento	Defic de apoA	C57BL/6 – 6SJL	Dieta aterogênica (colesterol 1,25%)	↓ apoA nas lesões ↓ lesões (tipo <i>fatty streak</i>)	Lou, 1998
PAI-1 (-/-)	sangramento	Defic apoE	C57BL/6	Normal (padrão) e Western	Proteção contra aterosclerose em bifurcação de carótidas (fluxo com turbulência)	Eitzman, 2000
Plasminogênio (-/-)	trombose	Defic apoE	Híbrido (129/NIH Black Swiss/C57 BL/6)	Normal (padrão)	Aceleração das lesões em íntima	Xiao, 1997
Fator V de Leiden (-/- e +/-)	trombose	Defic apoE	C57BL/6	Normal (padrão) e Western	↑ das lesões na dieta normal. Inalterado com a dieta Western	Eitzman, 2005

FvW: Fator de von Willebrand; **LDLR:** receptor de lipoproteínas de baixa densidade;

apoE: **aPOLIPOPROTEÍNA E**; PAI-1: **INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO-1**

Objetivos

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo determinar a participação dos fatores VIII e IX da coagulação na iniciação e progressão da doença aterosclerótica, através do uso de modelos animais com diferentes níveis destas proteínas e de dois modelos distintos de doença aterosclerótica (deficientes de apoE ou de LDLR).

2.2 – Objetivos específicos

- a)** Implantar e padronizar técnicas de manipulação de modelos animais no laboratório de hemostasia do Hemocentro/Unicamp;
- b)** Formação de colônias de camundongos da linhagem C57Bl/6 hemofílicos A ou B, deficientes de apoE ou de LDLR com confirmação molecular do genótipo;
- c)** Avaliar o impacto da deficiência dos fatores VIII e IX da coagulação no metabolismo do colesterol dos modelos animais de doença arterial, quando submetidos à dieta hipercolesterolêmica;
- d)** Avaliar o impacto da deficiência dos fatores VIII e IX na evolução da doença aterosclerótica de animais deficientes de apoE ou LDLR, por quantificação de lesões em dois sítios distintos;
- e)** Caracterizar histologicamente as lesões ateroscleróticas por imunohistoquímica e colorações específicas;
- f)** Avaliar a influência da hiper expressão do FIX na aterogênese do modelo deficiente de apoE

Materiais e Métodos

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Modelos animais

Nossas matrizes dos modelos de aterosclerose foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. Helena de Oliveira, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biologia da Unicamp (animais deficientes de LDLR) e pelo Prof. Dr. Éder Quintão, do Laboratório de Lípidos do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo (deficientes de apoE). Esses animais são disponíveis comercialmente e as colônias destes laboratórios são provenientes do Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME; EUA).

Os animais com hipocoagulabilidade são camundongos da mesma linhagem C57Bl/6 caracterizados anteriormente como modelos para hemofilia A e B. Os animais com deficiência de FVIII ou IX foram doados pelo Dr. Haig Kazazian, da Universidade da Pennsylvania e pela Dra. Katherine High do The Children's Hospital of Philadelphia (CHOP), respectivamente, seguindo as normas e regras do comitê de cuidados animais da instituição. O terceiro modelo de coagulação utilizado, com hiper-expressão de FIX, foram mantidos e analisados no CHOP.

Os cruzamentos entre os diversos modelos foram realizados de acordo com as técnicas e normas do biotério central da UNICAMP (CEMIB), com aprovação do CEEA (Comissão de ética na experimentação animal) do Instituto de Biologia da Unicamp, sob número 1393-1.

Foram obtidos através de cruzamento entre os animais dos diferentes genótipos iniciais, os seguintes grupos:

- Controles deficientes de apoliproteína E (NL/APOE^{-/-});
- Hemofílicos A, deficientes de apolipoproteína E (HA/APOE^{-/-});
- Hemofílicos B, deficientes de apolipoproteína E (HB/APOE^{-/-});
- Controles deficientes de receptores de lipoproteína de baixa densidade (NL/LDLR^{-/-});

- Hemofílicos A, deficientes de receptores de lipoproteína de baixa densidade (HA/LDLR-/-);
- Hemofílicos B, deficientes de receptores de lipoproteína de baixa densidade (HB/LDLR-/-).
- Transgênicos, com elevados níveis de FIX e deficientes de apoE (Tg+/APOE-/-)

Os animais foram mantidos em gaiolas dentro de estantes ventiladas (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil) com troca de ar constante, controle de temperatura ambiente (entre 22-24°C) e de luz (ciclos de 12 horas claro-escuro). Água e comida foram oferecidas sem nenhuma restrição.

3.2 - Dieta

Os animais foram mantidos em dieta normal até a idade de 8 semanas, a partir de quando os animais deficientes em apoE foram submetidos a dieta do tipo Western (com 21% de gordura e 0,15% de colesterol), e os deficientes de LDLR receberam dieta com 1,25% de colesterol.

As dietas foram elaboradas e fornecidas pelo ITAL (Instituto Tecnológico de Alimentos) de Campinas, com base na AIN-93 (Reeves *et al*, 1993)

3.3 - Controles

Foram utilizados como controles, animais pareados de acordo com sexo e idade deficientes apenas de apoE ou LDLR, mantendo a mesma linhagem, dieta e condições de alojamento. A linhagem dos animais (C57Bl/6) foi confirmada em todos os grupos estudados por avaliação de 150 polimorfismos característicos, realizados pelo Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EUA).

3.4 – Genótipo dos animais

De todos os animais gerados foram coletadas amostras de sangue por coleta caudal, extraído DNA genômico por kit (GFX Genomic Blood DNA Purification Kit – Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, EUA) e realizada a genotipagem por técnica de PCR (*polymerase chain reaction*).

3.4.1 - Genotipagem para os alelos do gene do FVIII (Bi et al, 1995)

Em nosso laboratório a reação foi padronizada de acordo com os reagentes habitualmente usados (para cada reação: água: 19,3µl, Buffer: 2,5µl, MgCl₂: 0,8µl, dNTP(10mM): 0,5µl), com sucesso. A identificação do gene do FVIII murino normal ou mutante é realizada a partir de 1,5µl do DNA genômico, utilizando-se os primers:

- MC-19: 5'TgCAAggCCTgggCTTATTT3'extremidade 5'do exon 16 (sense)
- NEO: 5'TgTgTCCCgCCCCTTCCTTT 3' *neo* exon 17 (sense).
- MC-18: 5'gAgCAAATTCCTgTACTgAC 3' exon 17 (antisense)

Usando a combinação dos produtos destes PCRs (MC-18 e MC-19 e MC-18 e NEO), é feita a distinção entre os genótipos. O fragmento de 680 pb representa o cromossomo X normal, e o fragmento com 420 pb representa a amplificação dos exons 16 e 17 contendo a *neo* sequência utilizada nos animais deficientes de FVIII. Os produtos de PCRs foram submetidos em paralelo a corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídeo, visualizados sob luz ultravioleta. (figura 4).

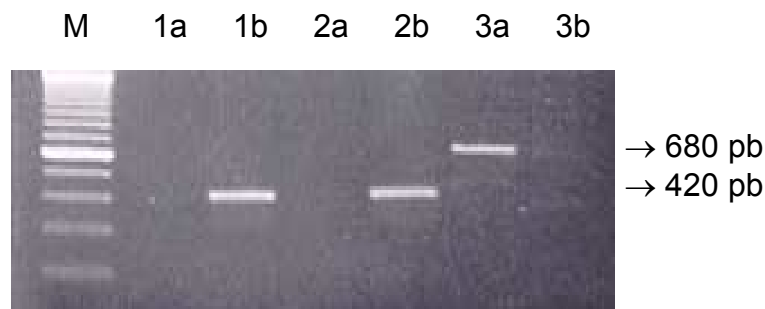


Figura 4: Representação da genotipagem dos animais hemofílicos A (eletroforese em gel de agarose 1,5%). Nas linhas 1a, 2a, 3a estão os produtos de PCRs utilizando *primers* referentes ao alelo normal (MC-18 e MC-19). Nas linhas 1b, 2b, 3b, estão os produtos de PCR utilizando *primers* da *neo* seqüência (MC-18 e NEO). As reações 1 e 2 são de animais hemofílicos A, que não têm amplificação de fragmento na primeira linha (1a e 2a), apenas o fragmento de 420pb na segunda linha (1b e 2b), relativo ao *neo* gene inserido. A reação 3, é de um animal hemofílico B, utilizado como controle, que só amplifica o fragmento com 680pb (3a), do cromossomo X normal. M: marcador (100pb DNA Ladder, Gibco BRL)

3.4.2 - Genotipagem para os alelos do gene do FIX (Kung et al, 1998)

Novamente adaptamos aos reagentes disponíveis em nosso laboratório (para cada reação: água: 19,3µl, Buffer: 2,5µl, MgCl₂: 0,8µl, dNTP 10mM: 0,5µl). A identificação do gene do FIX murino normal ou mutante é realizada á partir de 1,5µl do DNA genômico, utilizando-se os *primers*:

- WTMFIX-R: 5'-AACAgggATAgTAAgATTgTTCC-3' gene do fator IX normal (sense).
- WTMFIX-F: 5'-AgCTATggAATTACATgAAC-3' gene do fator IX normal (antisense)

- MF9-F: 5'-ATATACAgTTACCAAATTCAgA-3' gene do fator IX mutante (sense)
- MF-9-R: 5'-CAgTAATgTTgACTgTATTTTCCAA-3' gene do fator IX mutante (antisense)

O gene do FIX mutante contém uma seqüência adicional (identificado pelo uso dos primers MF9-F e MF9-R), resultando em um fragmento de 1.4 kb. O produto do PCR correspondente à cópia normal do FIX é identificado por um fragmento de 1 kb, utilizando os primers WTMFIX-F e WTMFIX-R (figura 5).

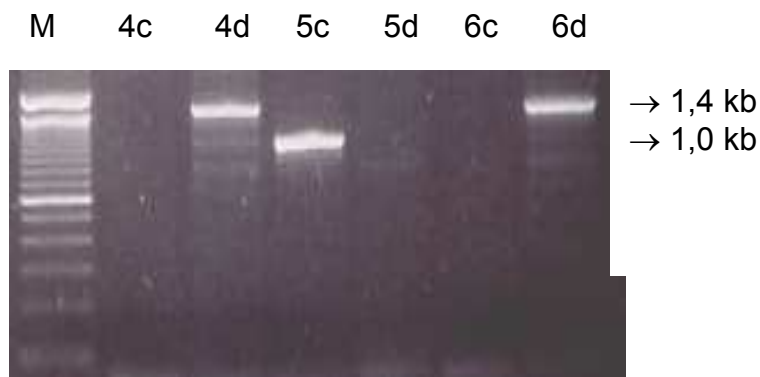


Figura 5: Representação da genotipagem dos animais hemofílicos B (Eletroforese em gel de agarose 1,5%) Nas linhas 4c, 5c, 6c estão os produtos de PCRs utilizando *primers* referentes ao alelo normal (P4 e P6). Nas linhas 4d, 5d, 6d, estão os produtos de PCR utilizando *primers* do gene mutante (P6 e P7). As reações 4 e 6 são de animais hemofílicos B, que não têm amplificação de fragmento na primeira linha (4c e 6c), apenas o fragmento de 1,4 kb na segunda linha (4d e 6d), relativo ao gene mutante. A reação 5, é de um animal hemofílico A, utilizado como controle, que só amplifica o fragmento com 1,0 kb (5c), do cromossomo X normal. M: marcador (100pb DNA Ladder, Gibco BRL)

3.4.3 - Genotipagem para os alelos do gene da apoliproteína E

Realizado PCR conforme protocolo do Jackson Laboratory (www.jax.org), utilizando 2µl de DNA genômico por reação com a utilização simultânea dos primers: oIMR0180 (5'-gCCTAgCCgAgggAgAgCCg-3'), oIMR0181 (5'-TgTgACTTgggAgCTCTgCAgC-3') e oIMR0182 (5'-gCCgCCCCgATgCATCT-3'). O produto do PCR para o alelo normal deverá apresentar fragmento de 125 pb e o alelo mutante fragmento de 245 pb (figura 6).



Figura 6: Representação da genotipagem dos animais deficientes de apolipoproteína E (*apoE*) (Eletroforese em gel de agarose 1,5%). As linhas E1 a E4 representam a genotipagem de animais em homozigose para a deficiência da *apoE*, que amplificaram apenas o fragmento com 245 pb. As letras C representam animais normais, utilizados como controle que amplificaram apenas o fragmento de 125 pb. A última banda que aparece abaixo de 100pb são dos *primers* dos fragmentos que não amplificaram. M: marcador (100pb DNA Ladder, Gibco BRL).

3.4.4 - Genotipagem para os alelos do receptor da LDL (LDLR)

Conforme protocolo do Jackson Laboratory são necessárias duas reações de PCR, utilizando-se 2µl de DNA genômico cada. Na primeira reação, que visa

amplificar o alelo normal, utilizamos os primers oIMR0046 (5'-ACCCCAAgACgTgCTCCCAggATg-3') e oIMR059 (5'-CgCAgTgCTCCTCATCTgACTTgT-3'). Na segunda reação, para identificar o gene inserido, são utilizados os primers oIMR0046 e oIMR014 (5'-AggTgAgATgACAggAgATC-3'). Animais normais são representados por fragmentos com 400pb; os heterozigotos com fragmentos de 400bp e 800pb e os homozigotos para a deficiência de LDLR fragmento único de 800pb (figura 7).

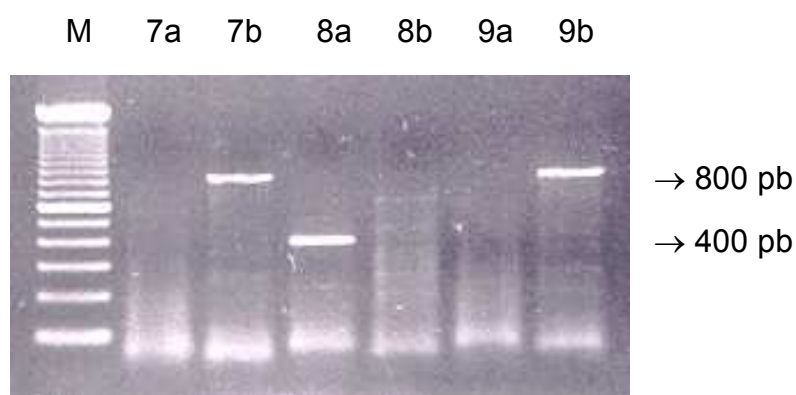


Figura 7: Representação da genotipagem dos animais deficientes de LDLR (Elektroforese em gel de agarose 1,5%). Nas linhas 7a, 8a, 9a estão os produtos de PCR utilizando *primers* referentes ao alelo normal (oIMR046 e oIMR056). Nas linhas 7b, 8b, 9b, estão os produtos de PCR utilizando *primers* da *neo* seqüência (oIMR046 e oIMR014). As reações 7 e 9 são de animais homozigotos para deficiência de receptores de LDL (LDLR), que não têm amplificação de fragmento na primeira linha (7a e 9a), apenas o fragmento de 800pb na segunda linha (7b e 9b), relativo ao *neo* gene inserido. A reação 8, é de um animal normal, utilizado como controle, que só amplifica o fragmento com 400pb (8a), do cromossomo normal. M: marcador (100pb DNA Ladder, Gibco BRL)

3.5 - Sacrifício

Foram programados sacrifícios dos animais após 8, 22 ou 37 semanas em dieta. Os sacrifícios obedeceram padrão de horário, e no momento do sacrifício foi coletado sangue caudal e retro-orbital em tubo heparinizado, sob anestesia inalatória e após aprofundamento anestésico, confirmado o óbito com deslocamento cervical.

Após o sacrifício, o animal foi aberto longitudinalmente e perfundido lentamente por punção em ventrículo esquerdo com 10ml de PBS gelado. Então foi realizada a dissecação e retirada da aorta que foi mantida em formalina tamponada 10% para posterior análise. O coração foi retirado e embebido em meio OCT ("*Optimum cutting temperature*" - Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), congelado em gelo seco ou nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C para posterior realização dos cortes histológicos.

3.6 - Análise das lesões ateroscleróticas

Foram realizadas duas análises distintas das lesões ateroscleróticas, consistindo: (1) da determinação quantitativa, utilizando dois parâmetros distintos (aorta inteira e seio aórtico) e por outro lado a (2) caracterização qualitativa das lesões observadas, por estudo imunohistoquímico ou coloração específica (Tricrômio de Masson).

3.6.1 - Análise quantitativa e padrão de distribuições das lesões ateroscleróticas

Para avaliação quantitativa da aterosclerose, utilizamos dois sítios distintos: quantificamos as lesões no seio aórtico, assim como na aorta inteira (Paigen *et al*, 1987; Tangirala *et al*, 1995; Jonhson *et al*, 1997):

3.6.1 a) Aorta inteira:

No momento do sacrifício, após perfusão com PBS gelado, a aorta foi retirada da saída do coração até a bifurcação das ilíacas, e mantida em formalina a 10%, para posterior coloração com Sudan IV, sendo após a coloração, aberta longitudinalmente e presa em superfície de cera preta, coberta com água. O procedimento foi realizado com auxílio de um estereoscópio Nikon SMZ-800, e foram capturadas imagens com câmera digital Nikon Coolpix, acoplada ao estereoscópio.

As imagens foram analisadas em computador, com auxílio do programa *Image J*®, e os resultados foram obtidos contabilizando-se a porcentagem das áreas coradas sobre a área total da aorta.

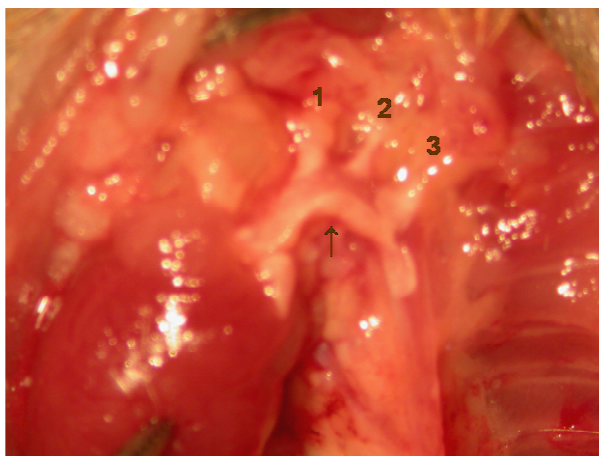


Figura 8: *Análise in vivo de lesão aterosclerótica.* A figura mostra na saída do coração murino, o arco aórtico com saída do Tronco Braquiocefálico (1), a. Carótida esquerda (2) e a. Subclávia esquerda (3). A área clara no interior das artérias é de placa de ateroma.

3.6.1 b) Seio aórtico:

Os corações congelados em OCT conforme exposto acima, posteriormente foram cortados em criostado, com cortes de 8 µm de espessura, a partir do aparecimento dos folhetos do seio aórtico. Para cada animal foram analisados 8

cortes, distantes 64 µm entre si, somando-se uma distância total de 448 µm entre eles. As lâminas posteriormente foram corados com Oil Red-O e hematoxilina, e as imagens capturadas por uma câmera digital Leica DC300F, acoplada a um microscópio por um sistema Leica DMLB, com transmissão direta da imagem para um computador. As imagens captadas foram avaliadas com auxílio do programa Image J® e contabilizados em mm².

3.6.2 - Análise qualitativa das lesões ateroscleróticas

Para caracterização das lesões ateroscleróticas, utilizamos a coloração de *Tricrômio de Masson*, para identificação das fibras colágenas nos estágios mais avançado da doença. Essa coloração foi realizada com o apoio técnico do Laboratório de Anatomia Patológica (LAP) do Hospital das Clínicas da Unicamp. Realizamos ainda com o material obtido de seio aórtico, reações de imunohistoquímica, utilizando os seguintes anticorpos:

Anti-Mac-1 (CD11b): marcador de macrófagos, para identificação do processo inflamatório inicial, quando há migração destas células para formação das lesões iniciais (*fatty streak*). As lâminas foram fixadas em acetona gelada por 5 minutos e bloqueadas com a solução avidina/biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 30 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos e então o material foi encubado por 4 horas em temperatura ambiente em câmara úmida, com o anticorpo biotinilado anti-Mac-1 (nº01712, diluição 1:5; BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA). Após, foram encubados com o kit ABC Vectorstain® (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) por 30 minutos. A visualização foi revelada com diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA) e os cortes contra-corados com hematoxilina. Foram realizados controles negativos, submetidos ao mesmo procedimento descrito, omitindo-se o anticorpo.

Anti α actina: marcador de células musculares lisas, para identificação das lesões em progressão, tendo em vista que estas células se proliferam nas lesões

mais maduras e estágios mais avançados da doença aterosclerótica. Cortes histológicos foram submetidos à secagem em temperatura ambiente e encubados com anticorpos monoclonais anti α -actina de músculo liso (clone 1A4, Dako Co., Carpinteria, CA, EUA) conjugados com peroxidase (diluição 1:1). A reação foi revelada pela adição de DAB e os cortes foram contra-corados com hematoxilina. Os controles negativos foram submetidos ao mesmo procedimento, sem encubação com o anticorpo.

Para cada coloração, foram realizadas lâminas de 3 a 5 animais de cada grupo, com imagem captada pelo sistema Leica DMLB e analisada posteriormente pelo programa *Image J*® por um observador cego para o genótipo de cada animal. Para a coloração com o anticorpo anti-Mac-1 utilizamos cortes de seio aórtico de animais após 8 semanas de dieta e para o anticorpo anti- α actina utilizamos cortes de animais submetidos a 37 semanas de dieta.

Com os mesmos cortes utilizados para quantificação das lesões ateroscleróticas, avaliamos também a presença de *calcificação* das lesões. Essas lesões são facilmente observadas através da coloração de hematoxilina, e caracterizam-se por áreas de cor púrpura que destacam-se na lesão.

3.7 - Perfil lipíco

No momento do sacrifício, foram coletadas amostras de sangue retro-orbital com capilar heparinizado, e com o plasma, dosado colesterol por método enzimático com kit específico (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha).

3.8 - Análise estatística

Os resultados obtidos nos experimentos são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. A significância estatística das diferenças entre as medianas foi

avaliada pelo teste de Mann-Whitney para variáveis não-paramétricas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor do P foi $\leq 0,05$.

Resultados

4 - RESULTADOS

4.1 - Efeito do fator VIII no desenvolvimento da doença aterosclerótica.

Para avaliarmos a influência do FVIII no desenvolvimento da doença aterosclerótica, cruzamos animais hemofílicos A (HA) com dois modelos distintos de dislipidemia: deficientes de apoE (APOE^{-/-}) e deficientes de LDLR (LDLR^{-/-}).

4.1.1 - Resultados do efeito da deficiência do FVIII no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de apoE:

4.1.1 a) Camundongos com hemofilia A apresentam níveis elevados de colesterol plasmático no modelo ApoE:

Na dosagem do colesterol plasmático dos animais hemofílicos A deficientes de apoE (HA/APOE^{-/-}) e dos controles deficientes de apoE (NL/APOE^{-/-}), o primeiro grupo apresentou níveis significativamente mais elevados que os controles (vide tabela 2).

Tempo de dieta (semanas)	Genótipo	Colesterol (mg/dL)	n	p
8	HA/APOE-/-	1391 ± 341	10	0,001
	NL/APOE-/-	884 ± 243	10	
22	HA/APOE-/-	1229 ± 389	11	0,028
	NL/APOE-/-	919 ± 326	11	
37	HA/APOE-/-	1406 ± 347	11	0,007
	NL/APOE-/-	848 ± 349	11	

Tabela 2: Níveis de colesterol plasmático nos animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-) e nos hemofílicos A deficientes de apoE (HA/APOE-/-) submetidos a dieta com 0,15% de colesterol. Os valores representam a média ± desvio padrão.

4.1.1 b) Deficiência do FVIII reduz a área da doença aterosclerótica na aorta do modelo deficiente em apoE:

Após 22 semanas sob dieta colesterolêmica, foram avaliados 13 animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-) e 12 animais hemofílicos A e deficientes de apoE (HA/APOE-/-). Os animais deficientes de FVIII neste modelo apresentaram redução das lesões em comparação àqueles com níveis normais de FVIII (3,87% vs 6,92%; p=0,018). O efeito protetor do FVIII foi ainda mais evidente quando os animais permaneceram sob dieta aterogênica por mais tempo. Após 37 semanas de dieta, foram avaliados 11 animais hemofílicos A (HA/APOE) e 13 animais deficientes de apoE (NL/APOE). Neste período, os animais NL/APOE-/- apresentaram cerca de 2 vezes mais lesões que os hemofílicos A (22,6% e 11,5% respectivamente; p=0,0009). Amostras ilustrativas da evolução da doença arterial entre os animais com FVIII normal e os hemofílicos A estão representadas na figura 9, e a análise quantitativa das lesões vasculares da aorta destes dois grupos estão no gráfico 1.

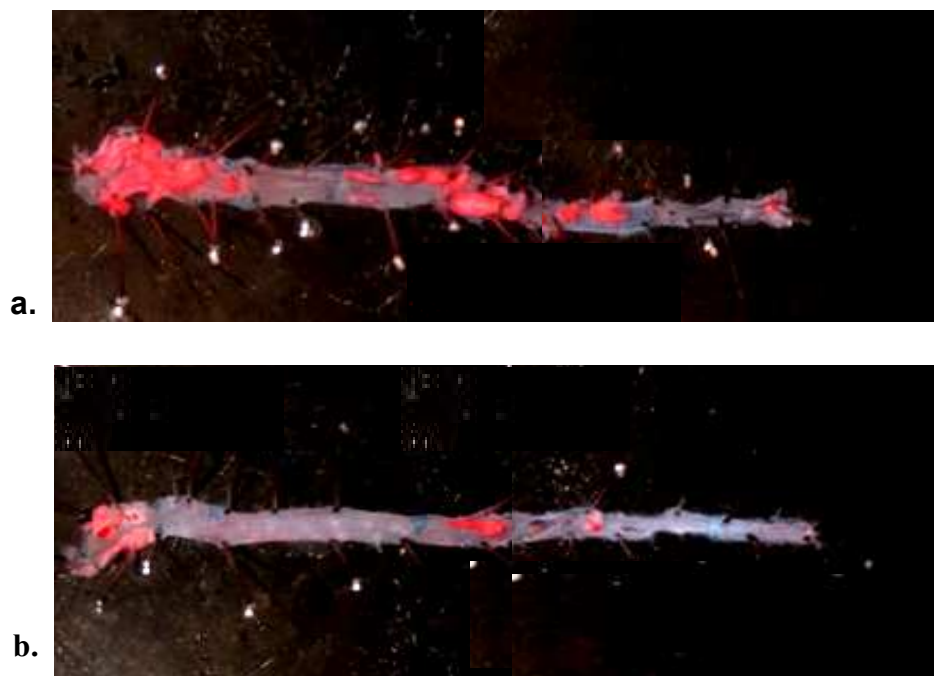


Figura 9: *Aortas inteiras coradas com Sudan IV, de animais sob dieta aterogênica por 37 semanas. A fotografia “a” representa a aorta de um animal deficiente de apoE (NL/APOE) e a fotografia (b) de um animal hemofílico A e deficiente de apoE (HA/APOE).*

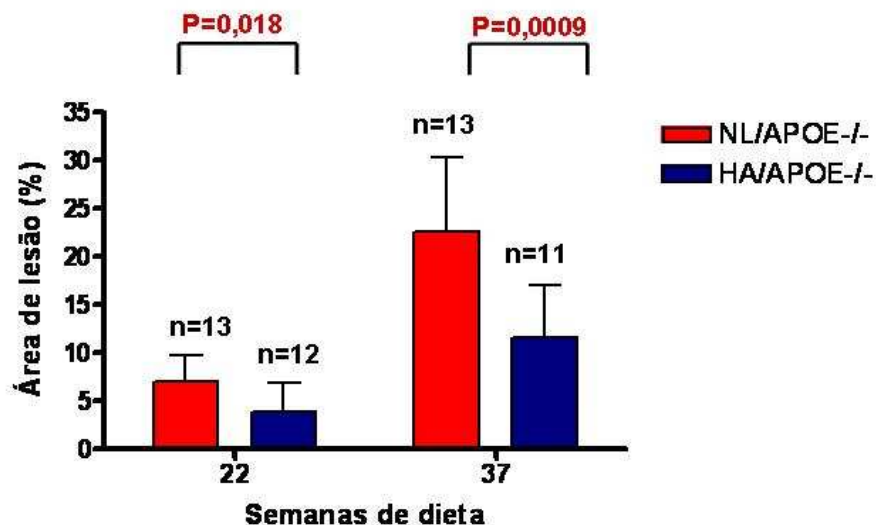


Gráfico 1: Quantificação da área da aorta afetada por lesões ateroscleróticas de animais deficientes de apo E (em vermelho) e dos animais deficientes de apoE e hemofílicos A (em azul), sob dieta aterogênica por 22 ou 37 semanas.

4.1.1 c) A deficiência do FVIII protege o desenvolvimento das lesões vasculares no seio aórtico:

Ainda que com 8 semanas de dieta, não foi observada diferença de lesões entre os grupos NL/APOE-/- e HA/APOE-/- ($0,0577$ e $0,0507\text{mm}^2$ respectivamente, $p=0,16$), a deficiência do FVIII protegeu o desenvolvimento da doença vascular após 22 semanas de dieta ($0,423$ e $0,328\mu\text{m}^2$ nos animais NL/APOE-/- e HA/APOE-/- respectivamente; $p=0,015$). Essa diferença persistiu evidente após 37 semanas de dieta ($0,6497\mu\text{m}^2$ nos animais NL/APOE-/- e $0,446\mu\text{m}^2$ nos animais HA/APOE-/-; $p=0,0062$). A representação da doença no seio aórtico nestes dois grupos está demonstrada na figura 10, e a quantificação das lesões vasculares demonstrada no gráfico 2.

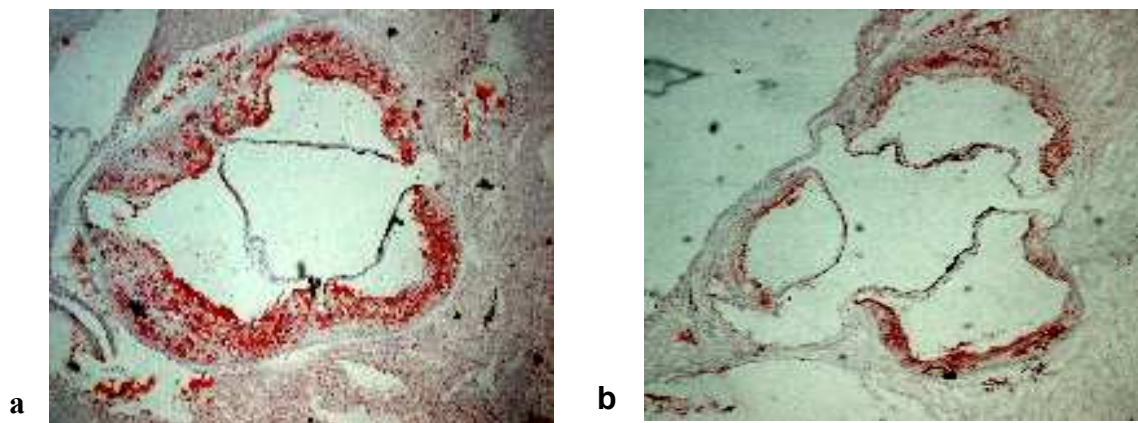


Figura 10: *Lesões vasculares no seio aórtico de animais deficientes de apoE.* Cortes corados com Oil Red O e hematoxilina de animais deficientes de apoE após 37 semanas de dieta rica em colesterol (Western). A figura a está representa o seio aórtico de um animal deficiente de apo E (NL/APOE) e a figura b um animal hemofílico A, deficiente de apo E (HA/APOE).

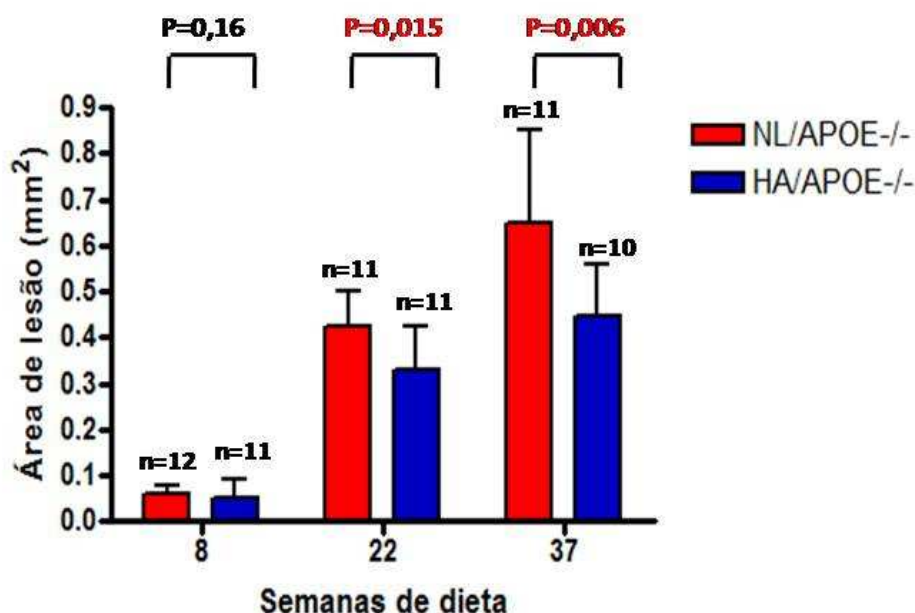


Gráfico 2: Quantificação de extensão da doença aterosclerótica no seio aórtico entre os grupos de deficientes de apo E (NL/APOE-/-) em vermelho, e dos hemofílicos A deficientes de apo E (HA/APOE-/-), em azul.

4.1.1 d) A deficiência do FVIII reduz a calcificação das lesões ateroscleróticas no modelo deficiente de apoE:

Nas avaliações qualitativas das lesões no seio aórtico, não encontramos diferenças significativas entre grupos NL/APOE-/- e HA/APOE-/-, tanto quantificação da positividade da α -actina (músculo liso) (6,99% nos animais NL/APOE-/- e 13,27% nos animais HA/APOE -/-; $p=0,2$), assim como com anti Mac-1 (macrófagos) (47,18% vs 44,84% respectivamente; $p=0,7$). Também foi semelhante a densidade de fibras colágenas entre os grupos NL/APOE-/- e HA/APOE-/- (12,34% e 14,28% respectivamente, $p=0,85$).

Os controles deficientes de apoE (NL/APOE-/-), apresentaram duas vezes mais calcificações no seio aórtico que os hemofílicos A deficientes de apoE-/- (HA/APOE-/-). Isso foi observado tanto após 22 semanas (calcificações foram observadas em 6 dos 11 animais NL/APOE-/- e em apenas em 2 dos 11 animais

HA/APOE-/-), como após 37 semanas de dieta (observado em 8 dos 11 animais NL/APOE-/- e em 4 dos 10 animais HA/APOE-/-).

4.1.2 - Resultados da deficiência do FVIII no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de receptor de LDL (LDLR):

4.1.2 a) A deficiência do FVIII não altera os níveis de colesterol do modelo deficiente de LDLR:

Na monitorização dos níveis de colesterol e triglicérides dos grupos deficientes de LDLR (NL/LDLR-/-) e hemofílicos A deficientes de LDLR (HA/LDLR-/-), não houve diferença significativa entre os dois grupos. Estes resultados estão demonstrados na tabela 3.

Tempo de dieta (semanas)	Genótipo	Colesterol (mg/dL)	n	p
8	HA/LDLR-/-	1351±103	07	0,384
	NL/LDLR-/-	1239±355	12	
22	HA/LDLR-/-	1343±155	11	0,067
	NL/LDLR-/-	1574±332	09	
37	HA/LDLR-/-	1235±219	12	0,059
	NL/LDLR-/-	1001±325	10	

Tabela 3: Níveis de colesterol plasmático nos animais deficientes de receptor de LDL (NL/LDLR) e nos hemofílicos A deficientes LDLR (HA/LDLR) submetidos a dieta rica em colesterol. Os valores representam a média ± o desvio padrão.

4.1.2 b) Deficiência do FVIII não influencia a extensão da doença aterosclerótica na aorta dos animais deficientes de LDLR:

Na avaliação da aorta, não encontramos diferenças significativas na evolução da doença aterosclerótica entre estes dois grupos após 22 (10,8% nos animais NL/LDLR^{-/-} e 10,05% nos animais HA/LDLR^{-/-}, $p=0,58$; $n=12$), ou após 37 semanas de dieta (23,4% e 20,1% respectivamente, $p=0,29$; $n=12$). Estes resultados demonstram que no modelo deficiente de LDLR, o FVIII não exerce função protetora significativa. Estes dados estão demonstrados no gráfico 3.

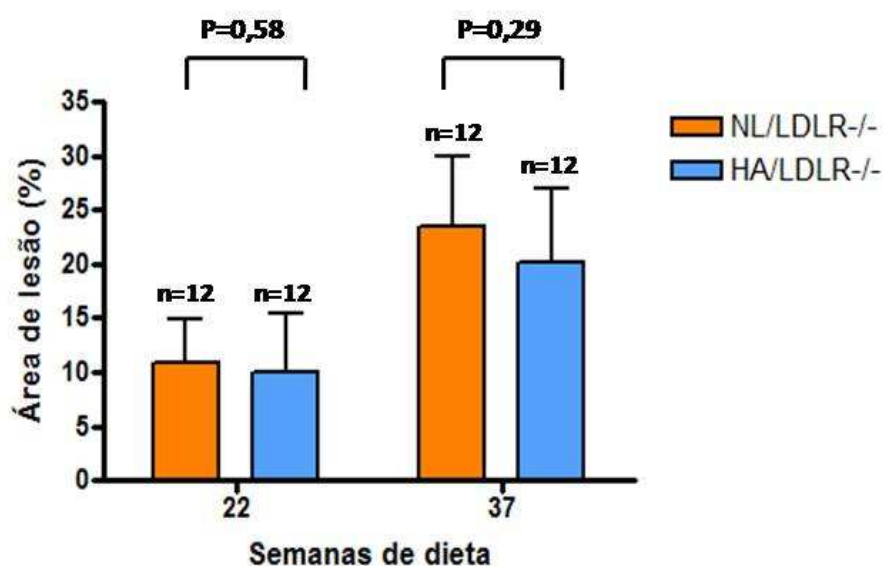


Gráfico 3: Quantificação da área da aorta afetada por lesões ateroscleróticas nos animais deficientes de LDL (NL/LDLR), em laranja, e dos animais hemofílicos A deficientes de receptor de LDL (HA/LDLR), em azul.

4.1.2 c) A deficiência do FVIII não influencia o desenvolvimento das lesões no seio aórtico dos animais deficientes de LDLR:

Na avaliação do seio aórtico não houve diferenças significativas na quantificação da doença aterosclerótica entre os dois grupos após 8 semanas ($0,080\text{mm}^2$ nos animais NL/APOE $^{-/-}$ e $0,05\text{mm}^2$ nos animais HA/APOE $^{-/-}$; $p=0,17$), 22 semanas ($0,498$ e $0,380\text{mm}^2$ respectivamente; $p=0,06$) ou 37 semanas de dieta ($0,685\text{mm}^2$ e $0,608\text{mm}^2$ respectivamente; $p=0,08$). Estes dados estão demonstrados no gráfico 4.

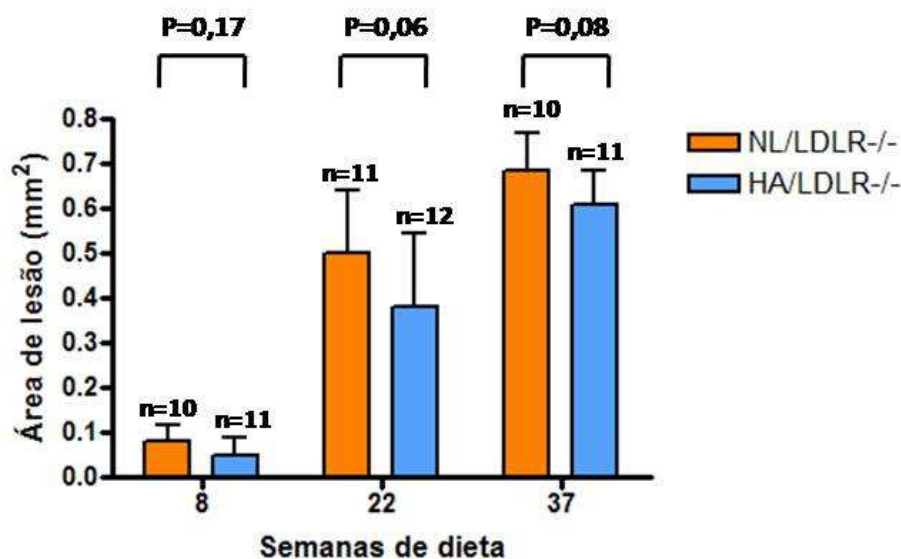


Gráfico 4: Quantificação da doença aterosclerótica no seio aórtico dos animais deficientes de receptor de LDL (NL/LDLR $^{-/-}$), em laranja, e dos animais hemofílicos A deficientes de LDLR (HA/LDLR $^{-/-}$), em azul.

4.1.2 d) A deficiência do FVIII não altera as características da lesão aterosclerótica no modelo deficiente de LDLR

Os padrões de positividade entre os dois grupos (NL/LDLR $^{-/-}$ e HA/LDLR $^{-/-}$), tanto na avaliação da α -actina (músculo liso) (5,17% e 9,96% respectivamente $p=0,1$), como do anti Mac-1 (macrófagos) (97,74% e 60,61% respectivamente;

p=0,2) e na coloração de Masson (colágeno) (15,05% e 17,26% respectivamente, p=0,8) não apresentaram diferenças significativas.

Quanto à presença de calcificações no seio aórtico, os animais deficientes de LDLR (NL/LDLR) apresentaram padrão semelhante aos hemofílicos A (HA/LDLR), tanto após 22 semanas (calcificação foi identificada em 1 dos 11 animais NL/LDLR^{-/-} e em nenhum dos 12 animais HA/LDLR^{-/-}) como após 37 semanas de dieta (identificada em 7 dos 10 animais NL/LDLR^{-/-} e 4 dos 11 animais HA/LDLR^{-/-}).

4.2 - Efeito do fator IX no desenvolvimento da doença aterosclerótica

4.2.1 - Resultados da deficiência do FIX no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de apoE:

Para avaliarmos a influência do FIX no desenvolvimento da doença aterosclerótica, cruzamos animais hemofílicos B (HB) com dois modelos distintos de dislipidemia: deficientes de apoE (APOE^{-/-}) e deficientes de LDLR (LDLR^{-/-}). Avaliamos ainda animais com hiper-expressão de FIX nos modelos deficientes de apoE.

4.2.1 a) A deficiência do FIX não influencia os níveis de colesterol dos animais deficientes de apoE

Os animais hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE^{-/-}), não apresentaram diferenças nos níveis de colesterol quando comparados com os controles deficientes de apoE (NL/APOE^{-/-}). (Vide tabela 4).

Tempo de dieta (semanas)	Genótipo	Colesterol (mg/dL)	n	p
8	HB/APOE-/-	898±194	6	0,66
	NL/APOE-/-	865±264	11	
22	HB/APOE-/-	954 ± 292	10	0,92
	NL/APOE-/-	990 ± 398	12	
37	HB/APOE-/-	988 ± 267	11	0,38
	NL/APOE-/-	901 ± 314	10	

Tabela 4: Colesterol plasmático nos animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-) e nos hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE-/-) submetidos a dieta com 1,25% de colesterol. Os valores representam a média ± o desvio padrão.

4.2.1 b) Elevada mortalidade dos animais hemofílicos B deficientes de apoE

Na evolução das colônias dos animais hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE-/-), nos chamou a atenção a alta mortalidade destes animais. Dos 60 animais colocados em dieta, apenas 29 sobreviveram até o período previsto para o sacrifício. Na tabela 5, estão os dados de mortalidade deste grupo, comparados aos outros grupos deficientes de apoE. É interessante ressaltar que estes óbitos não tiveram relação aparente com eventos hemorrágicos nem com processos infecciosos.

	8 semanas (dieta Western)	22 semanas (dieta Western)	37 semanas (dieta Western)	Total óbitos/ nº animais
HB/APOE-/-	3/12	12/22	16/26	29/60
NL/APOE-/-	0/12	1/14	2/15	3/41
HÁ/APOE-/-	0/11	0/12	1/12	1/35

Tabela 5: Comparação de mortalidade entre os grupos de animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-), hemofílicos B (HB/APOE-/-) ou hemofílicos A (HA/APOE-/-).

4.2.1 c) A deficiência do FIX não protege contra o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas mas agrava a doença vascular no modelo deficiente de apoE

Os animais com deficiência do FIX (HB/APOE^{-/-}) apresentaram lesões ateroscleróticas mais extensas que os controles deficientes de apoE (NL/APOE^{-/-}) após 22 semanas (13,0% e 6,9% respectivamente, $p=0,04$) e 37 semanas de dieta (35,0% e 22,6% respectivamente, $p=0,01$). Os dados estão representados no gráfico 5 e a figura 11 ilustra a gravidade da doença arterial dos animais HB/APOE^{-/-}.

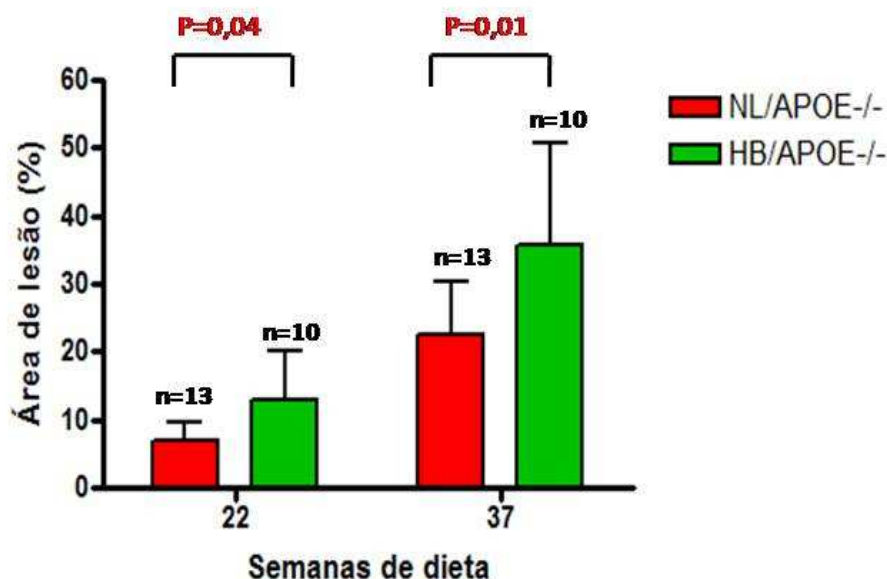


Gráfico 5: Quantificação da doença aterosclerótica nos animais sob dieta com 1,25% de colesterol dos deficientes de apoE (NL/APOE^{-/-}), em vermelho, e dos hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE^{-/-}), em verde.



Figura 11: *Aorta de animal deficiente de apoE e hemofílico B (HB/APOE-/-) submetido a 37 semanas de dieta com 1,25% de colesterol, corada com Sudan IV. As áreas avermelhadas representam as extensas placas ateroscleróticas.*

4.2.1 d) Efeito heterogêneo da deficiência do FIX no desenvolvimento das lesões no seio aórtico do modelo deficiente de apoE

Na avaliação do seio aórtico após 8 semanas, não encontramos diferença significativa entre os grupos NL/APOE-/- ou HB/APOE-/- ($0,057$ e $0,094 \text{ mm}^2$ respectivamente, $p=0,16$). Com 22 semanas, o grupo HB/APOE-/- ($n=10$) apresentou maior gravidade da doença arterial que o grupo controle NL/APOE-/- ($n=11$) ($0,476$ e $0,423 \text{ mm}^2$ respectivamente, $p=0,03$). No entanto, após 37 semanas de dieta esta diferença se inverteu, e os controles NL/APOE-/- passaram a apresentar mais lesões que os HB/APOE-/- ($0,704$ e $0,496 \text{ mm}^2$, $p<0,005$). É possível que apenas os animais HB/APOE-/- com doença mais branda do seio aórtico tenham sobrevivido até 37 semanas, e os casos mais graves tenham falecido (ver tabela 5). Estes resultados estão demonstrados no gráfico 6.

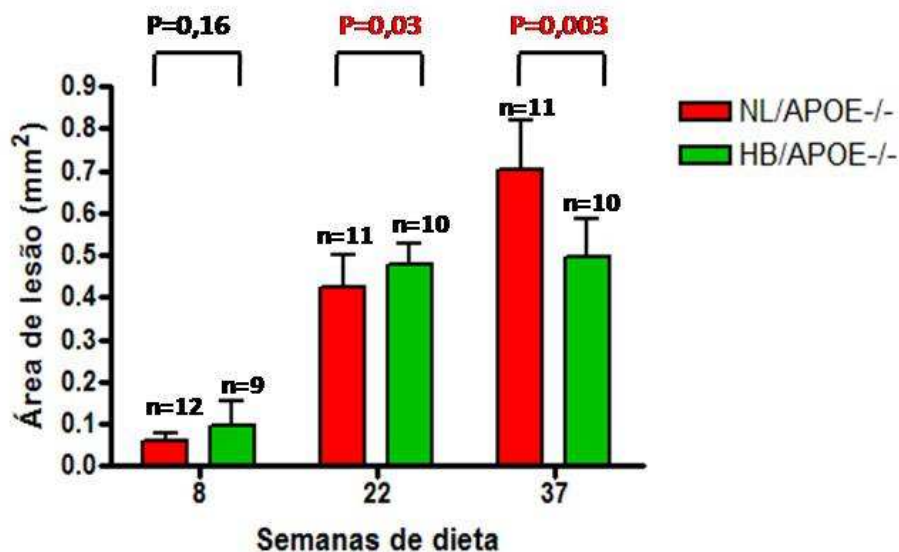


Gráfico 6: Quantificação da doença aterosclerótica sob dieta aterôgenica (Western) no seio aórtico dos animais deficientes de apoE (NL/APOE-/-), em vermelho, e dos animais hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE-/-), em verde.

4.2.1 e) *Maior densidade de fibras colágenas nas lesões dos animais deficientes de FIX*

Não encontramos diferenças na porcentagem de áreas positivas entre grupos NL/APOE-/- e HB/APOE-/- na coloração para α -actina (músculo liso) (6,99% e 11,34% respectivamente; $p=0,26$), assim como na coloração com anti Mac-1 (macrófagos) (47,18% vs 78,28% respectivamente; $p=0,4$). Na coloração para colágeno (Tricrômio de Masson), observamos maior densidade de fibras colágenas no grupo HB/APOE-/- em relação ao grupo controle NL/APOE-/- (12,34% vs 43,57% respectivamente, $p=0,057$). Interessante, que apesar de não haver diferença significativa entre a concentração de macrófagos nas lesões entre os dois grupos, nos chamou a atenção a presença de grande infiltrado destas células nas regiões peri-vasculares dos animais HB/APOE-/-, conforme ilustrado na figura 11.

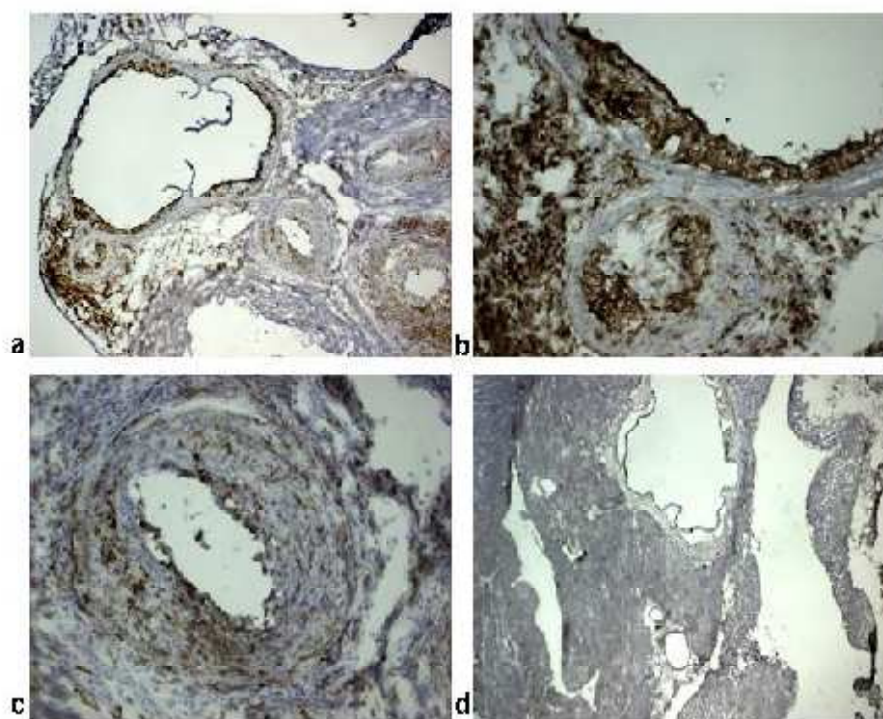


Figura 12: *Infiltração de macrófagos nos animais hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE^{-/-}). As fotografias representam reações de imunohistoquímica com anticorpo anti Mac-1 em cortes de coração de animal hemofílico B deficiente de apoE (HB/APOE^{-/-}) (a, b e c), e de animal controle (NL/APOE^{-/-}) (d). Destaca-se os acentuados infiltrados de macrófagos nas regiões perivasculares no grupo deficiente de FIX. (foto “a” aumento de 5X, “d” de 10X, “b” e “c” de 20X).*

Não houve diferença entre o número de animais com calcificações no seio aórtico dos dois grupos (NL/APOE^{-/-} e HB/APOE^{-/-}). Após 22 semanas, 6 de 11 animais do grupo NL/APOE^{-/-} apresentaram calcificações, que foram identificadas em 6 dos 10 animais do grupo HB/APOE^{-/-}. Após 37 semanas calcificações foram visualizadas em 8 dos 11 animais NL/APOE^{-/-} e em 5 dos 10 animais HB/APOE^{-/-}.

4.2.2 - Resultados da deficiência do FIX no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de receptores de LDL:

4.2.2 a) A deficiência do FIX elevou os níveis de colesterol do modelo deficiente de LDLR após longo período de dieta hipercolesterolêmica.

Até 22 semanas de dieta os valores de colesterol foram semelhantes entre os animais deficientes de LDLR e os hemofílicos B deficientes de LDLR. No entanto, após 37 semanas de dieta hipercolesterolêmica, os valores encontrados nos hemofílicos B tornaram-se significativamente maiores do que nos animais com níveis normais de FIX. Estes resultados estão demonstrados na tabela 6.

Tempo de dieta (semanas)	Genótipo	Colesterol (mg/dL)	n	p
8	HB/LDLR-/-	1568 ± 785	12	0,62
	NL/LDLR-/-	1239 ± 355	12	
22	HB/LDLR-/-	1115 ± 547	11	0,06
	NL/LDLR-/-	1542 ± 329	10	
37	HB/LDLR-/-	1517 ± 592	09	0,03
	NL/LDLR-/-	1001 ± 325	10	

Tabela 6: Colesterol plasmático nos animais deficientes de receptor de LDL (NL/LDLR) e nos hemofílicos B deficientes LDLR (HB/LDLR) submetidos a dieta rica em colesterol. Os valores representam a média ± o desvio padrão.

4.2.2 b) A deficiência do FIX agrava a aterosclerose na aorta do modelo deficiente de LDL

Na avaliação da aorta, a deficiência do FIX esteve associada ao agravamento das lesões tanto após 22 semanas (15,7% no grupo HB/LDLR-/- e 10,8% no grupo

NL/LDLR-/-, $p=0,01$), como após 37 semanas de dieta (35,7% e 23,41% respectivamente, $p=0,01$). Estes resultados estão demonstrados no gráfico 7.

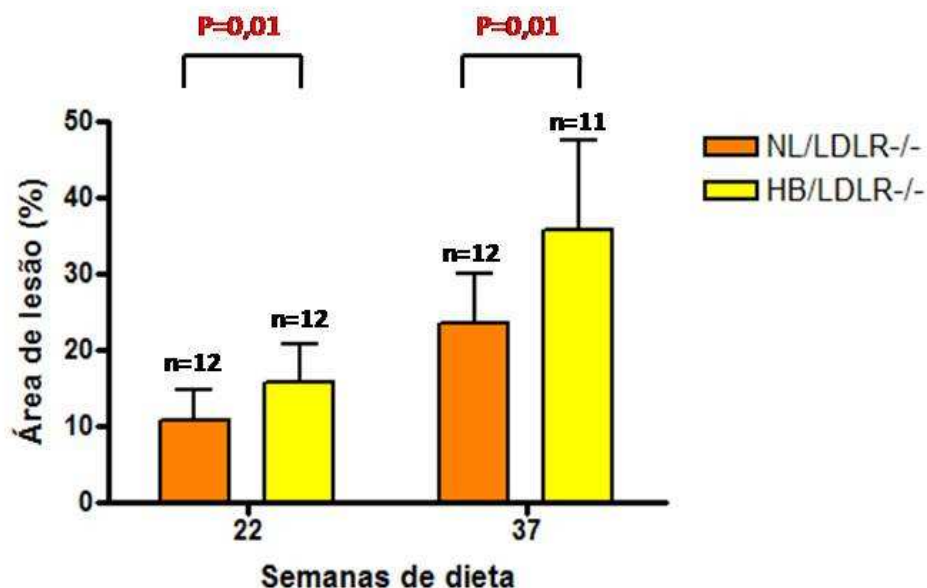


Gráfico 7: Quantificação da doença aterosclerótica sob dieta aterogênica nos animais deficientes de LDLR (NL/LDLR-/-), em laranja, e nos animais hemofílicos B deficientes de LDLR (HB/LDLR-/-), em amarelo.

4.2.2 c) Animais deficientes de FIX apresentam mais lesões no seio aórtico após 37 semanas de dieta no modelo deficiente de LDLR

Não encontramos diferenças significativas na comparação entre os grupos de NL/LDLR-/- e HB/LDLR-/- após 8 semanas ($0,080\text{mm}^2$ e $0,052\text{mm}^2$ respectivamente, $p=0,09$) ou 22 semanas ($n=11$) ($0,498\text{ mm}^2$ e $0,502\text{ mm}^2$ respectivamente, $p=0,84$). No entanto a diferença tornou-se evidente após 37 semanas, quando o grupo HB/LDLR-/- apresentou mais lesões que o controle NL/LDLR-/- ($0,794$ e $0,685\text{ mm}^2$ respectivamente, $p=0,01$). Estes dados estão representados no gráfico 8.

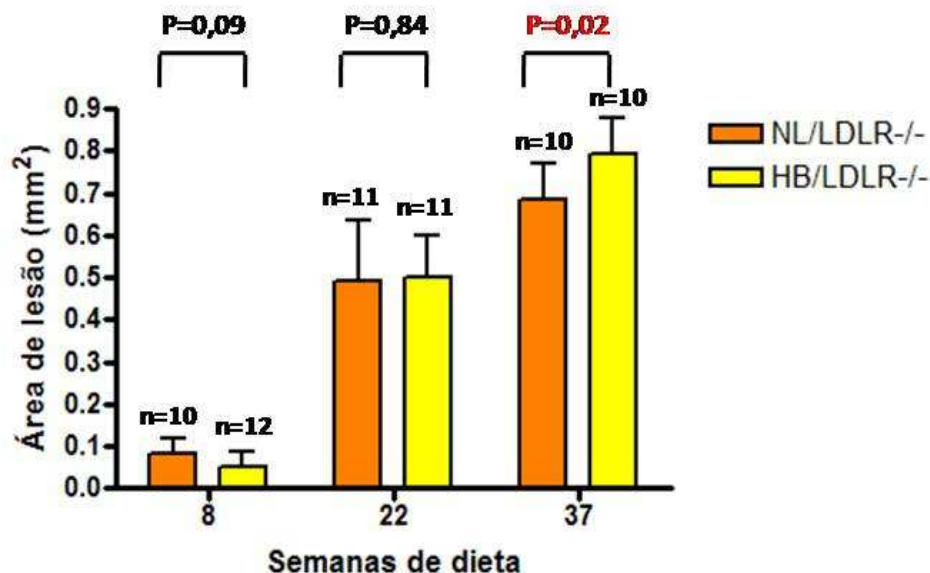


Gráfico 8: Quantificação da doença aterosclerótica sob dieta aterogênica nos animais deficientes de LDLR (NL/LDLR-/-), em laranja, e dos animais hemofílicos B deficientes de LDLR (HB/LDLR-/-), em amarelo.

4.2.2 d) A deficiência do FIX não influencia as características das lesões ateroscleróticas no modelo deficiente de LDLR

Não encontramos diferenças na porcentagem de áreas positivas entre os grupos NL/LDLR-/- e HB/LDLR-/- na coloração para α -actina (músculo liso) (5,17% e 8,13% respectivamente, $p=0,1$), anti Mac-1 (macrófagos) (97,74% e 49,84% respectivamente; $p=0,13$) e também na coloração de Tricrômio de Masson (colágeno) (15,05% e 22,24% respectivamente, $p=0,8$).

O número de animais com calcificações no seio aórtico foi semelhante nos dois grupos. Após 22 semanas, encontramos calcificações em 1 dos 11 animais NL/LDLR-/- e em 2 dos 11 animais HB/LDLR-/. Após 37 semanas, calcificações foram observadas em 7 dos 10 animais NL/LDLR-/- e 4 dos 10 animais HB/LDLR-/-.

4.3.1 – Resultados dos elevados níveis de FIX no desenvolvimento da aterosclerose em animais deficientes de apoE

No outro modelo de coagulação estudado, nós avaliamos animais machos, com elevados níveis de FIX humano (~200-300% da atividade normal) (Sabatino et al, 2004). Estes animais foram cruzados com animais deficientes de apoE (Tg+/APOE-/-) e comparados com controles deficientes de apoE com níveis normais de FIX (Tg-/APOE-/-). Grupos de animais dos dois genótipos foram submetidos a dieta padrão por 52 semanas ou a dieta tipo Western por 20 ou 40 semanas, com avaliação da aterosclerose na aorta e seio aórtico após estes períodos.

4.3.1 a) Níveis elevados de FIX não piora a aterosclerose na aorta dos animais deficientes de apoE

Os dois grupos tiveram evolução semelhante nas lesões da aorta após 52 semanas na dieta padrão (7,97% no grupo Tg+/APOE-/- e 10,88% no grupo Tg-/APOE-/-; $p=0,42$) e 20 semanas sob dieta Western (19,9% e 23,24% respectivamente; $p=0,48$). Após 40 semanas de dieta Western, os animais com elevados níveis de FIX apresentaram discreta melhora na evolução da aterosclerose em relação ao grupo controle (34,05% e 50,86% respectivamente, $p=0,056$). Estes resultados estão demonstrados no gráfico 9.

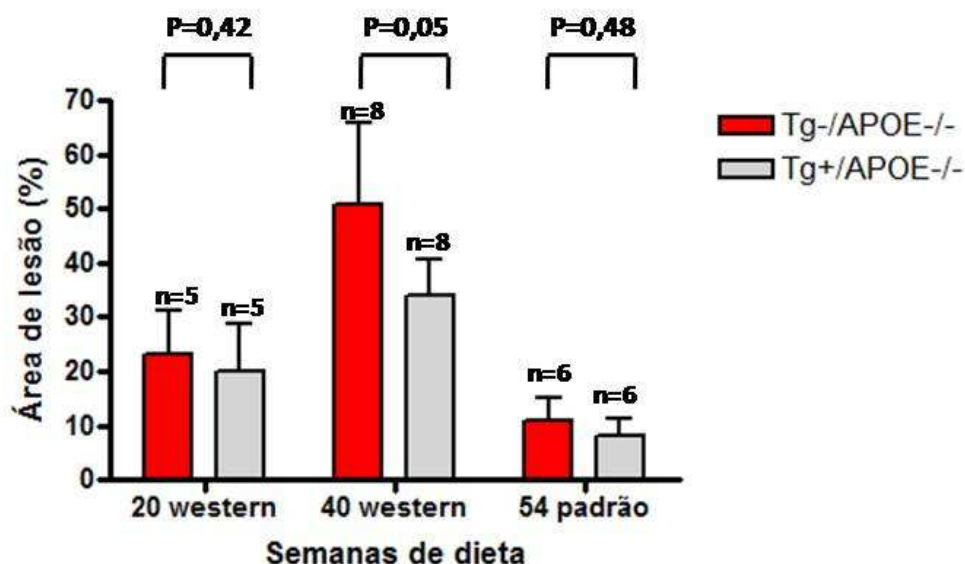


Gráfico 9: Evolução da doença aterosclerótica na aorta dos animais apoE^{-/-} (Tg⁻/APOE^{-/-}), em vermelho, e dos animais apoE^{-/-} com níveis elevados de FIX (Tg⁺/APOE^{-/-}), em cinza.

4.3.1 b) Níveis elevados de FIX não piora a evolução das lesões ateroscleróticas no seio aórtico dos animais deficientes de apoE

Na avaliação do seio aórtico, não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos, após 20 semanas (0,585 mm² no grupo Tg⁻/APOE^{-/-} e 0,532 mm² no grupo Tg⁺/APOE^{-/-}; p>0,99) ou 40 semanas de dieta Western (0,792 e 0,688 mm² respectivamente; p=0,463) ou em dieta normal por 52 semanas (0,270 e 0,226 mm² respectivamente; p=0,58). Estes resultados estão demonstrados no gráfico 10.

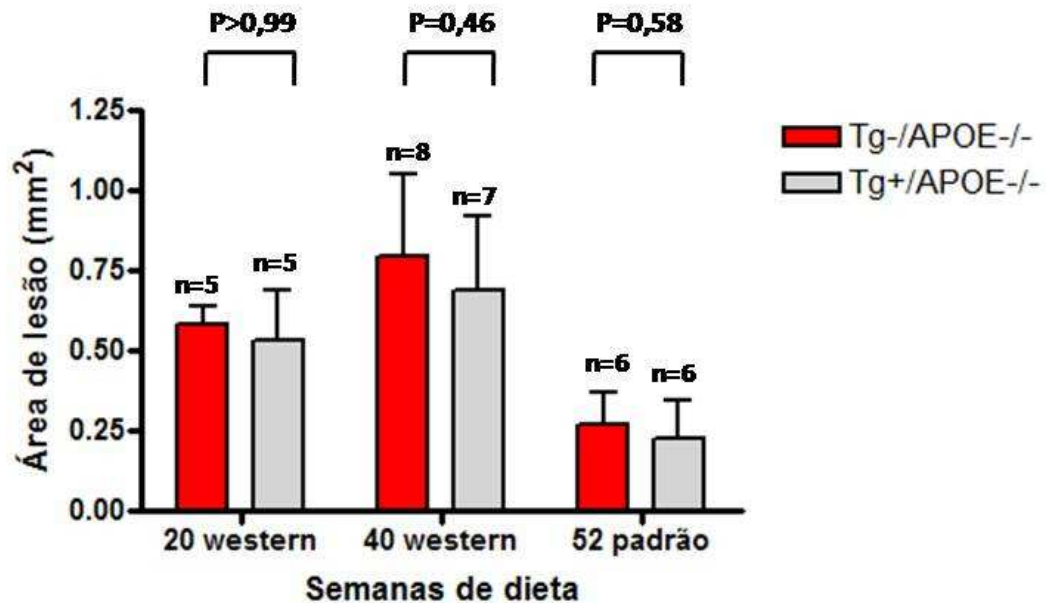


Gráfico 10: Quantificação da doença aterosclerótica no seio aórtico dos animais apoE^{-/-} (Tg⁻/APOE^{-/-}), em vermelho, e dos animais deficientes de apoE com níveis elevados de FIX (Tg⁺/APOE^{-/-}), em cinza.

4.3.1 c) Elevados níveis de FIX aumenta a incidência de trombose venosa nos animais deficientes de apoE

Em 3 dos 6 animais deficientes de apoE com níveis elevados de FIX (TG⁺/APOE^{-/-}) foi diagnosticado clinicamente trombose venosa profunda (nas patas) quando submetidos a dieta padrão por 52 semanas. Esse achado não foi documentado em nenhum animal dos controles (Tg⁻/APOE^{-/-}).

Discussão

5- DISCUSSÃO

A compreensão da fisiopatologia e a procura de novos mecanismos envolvidos na doença aterosclerótica são de grande interesse pois podem proporcionar novas abordagens terapêuticas para doenças com os mais elevados índices de mortalidade na população ocidental. Muitos desses mecanismos são conhecidos, no entanto, as abordagens conhecidas, seja de prevenção seja de tratamento, não possuem o impacto desejado na redução da morbi-mortalidade associada às complicações das doenças vasculares oclusivas.

A utilização de modelos animais geneticamente modificados contribuiu substancialmente para a compreensão dos mecanismos das doenças vasculares, sejam com alterações genéticas isoladas sejam com combinadas, minimizando os efeitos ambientais, principais limitantes nos estudos em humanos. Utilizando esses modelos, é possível, de certa forma, mimetizar doenças de humanos e compreender melhor mecanismos fisio-patológicos a partir de observações clínicas.

Em pacientes hemofílicos, assim como nas portadoras de hemofilia, é reconhecida a menor mortalidade decorrente de doenças arteriais oclusivas quando comparados à população geral. Entretanto, a presença da doença aterosclerótica foi identificada nesses pacientes através de estudos de imagem ou de necrópsias. O que ainda, contudo, é desconhecido é o mecanismo pelo qual a proteção contra a doença arterial oclusiva ocorre. As hipóteses para justificar essa proteção baseiam-se na menor sobrevivência desses pacientes, na menor geração de trombina e conseqüente incapacidade de formação de trombo sobre a placa de ateroma, ou, se por algum outro mecanismo, esses pacientes estariam em parte protegidos da ateromatose.

Aqui neste trabalho, procuramos estudar de forma ampla a interação dos fatores VIII e IX da coagulação na aterogênese, utilizando dois modelos distintos de dislipidemia, habitualmente usados em estudos de investigação da doença aterosclerótica, avaliando o desenvolvimento da doença desde as fases mais

precoces (lesões iniciais, “*fatty streak*”) até a fase mais tardia da doença (lesões maduras, com forte componente de fibrose e calcificação).

Nosso objetivo é compreender melhor os mecanismos de interação entre esses fatores pró-coagulantes no desenvolvimento da doença arterial, seja diretamente por seu efeito coagulante seja por outros mecanismos ainda não evidentes, contribuindo, com isso, para a elaboração de novas abordagens para doenças tão prevalentes e de alta morbi-mortalidade.

5.1 – Desenvolvimento da doença aterosclerótica nos animais deficientes de FVIII:

Nossos resultados no desenvolvimento da doença aterosclerótica mostraram que a deficiência grave do FVIII protegeu de forma significativa da aterosclerose em um dos modelos de dislipidemia utilizado (deficiente de apoE), mas não interferiu de forma significativa no outro modelo estudado (deficiente de LDLR). Essa proteção foi mais evidente principalmente nas fases mais avançadas da doença, e não nas fases iniciais (até 8 semanas), mostrando-se mais significativa no decorrer do tempo.

A diferença nos resultados obtidos entre os dois modelos de doença arterial pode ter ocorrido porque os animais deficientes de apoE apresentam doença arterial mais grave do que os deficientes de LDLR, principalmente quando submetidos a dieta aterogênica, o que pode ter acentuado a diferença na evolução da doença neste modelo. Uma possibilidade de estudarmos a discrepância encontrada entre os dois modelos (apoE e LDLR) seria a posterior avaliação dos grupos NL/APOE e HA/APOE mantendo-os sob dieta normal (sem acréscimo de colesterol), que proporciona uma doença aterosclerótica mais branda.

Em nosso trabalho, observamos que animais HA/APOE^{-/-} apresentaram níveis de colesterol significativamente mais elevados do que os animais apenas deficientes de apoE (NL/APOE^{-/-}). É interessante, pois, apesar dos altos níveis de

colesterol, um reconhecido fator de risco para doença aterosclerótica, eles apresentaram redução da extensão das lesões ateromatosas.

Níveis elevados de colesterol em animais deficientes de FVIII já foram observados anteriormente em um estudo que elaborou a hipótese de que o fígado do animal hemofílico teria um potencial maior para a produção de colesterol, quando não produzisse FVIII (Kallou-Laschet *et al*, 2005). No entanto, os autores não apresentaram dados que corroborassem essa hipótese. Em outro estudo, foi demonstrado que ratos submetidos a hepatectomia e tratados com estatinas no pós-operatório, tiveram recuperação mais precoce dos parâmetros de coagulação, sugerindo uma interação entre o metabolismo de lípides e a produção de fatores de coagulação (Cai *et al*, 2000). Em conjunto, essas observações permitem que seja feita a hipótese de uma ação facilitadora do FVIII na incorporação do colesterol (LDL) na íntima do vaso. A partir dessa hipótese, a diminuição do FVIII em animais deficientes comprometeria esse mecanismo de incorporação, levando ao aumento do colesterol plasmático e à diminuição de sua integração nas lesões. Em consonância com essa hipótese, Ananyeva e colaboradores (Ananyeva *et al*, 2002) demonstraram a presença de FVIII em grande quantidade em macrófagos e células musculares lisas de regiões de ateromatose, mas não em áreas de endotélio normal. Nesses pontos, a concentração de FVIII estava altamente relacionada com o depósito de LDL oxidadas (oxLDL). Já foi sugerido um mecanismo análogo, no qual a fibrina ou fibrinogênio precederiam ou facilitariam o acúmulo de LDL na parede da artéria (Khrenov *et al*, 2002).

É bem descrita a interação entre FVIII e as proteínas ligadas ao receptor de LDL (chamada LRP – “*low density lipoprotein receptor-related protein*”) que é associado ao *clearance* e até mesmo à biossíntese do FVIII. (Lenting *et al*, 1999; Saenko *et al*, 1999; Bovenchen *et al*, 2003). Já foi também demonstrado que os LDLR possuem ligação com o FVIII e atuam em conjunto com os LRP para regulação de seus níveis no plasma (Bovenschen *et al*, 2005), reiterando a relação entre estes receptores e a hemostasia.

Uma de nossas hipóteses para justificar a proteção conferida pela deficiência do FVIII na doença aterosclerótica estaria relacionada à ação da PCa. A partir dessa hipótese, nos animais hemofílicos A, a redução acentuada do FVIII, um dos substratos da PCa, poderia levar a maior disponibilidade local dessa proteína, com aumento de seus efeitos anti-inflamatórios e citoprotetores. Da mesma forma, a maior disponibilidade da PCa poderia aumentar seu efeito inibitório sobre o FVa, com redução da geração de trombina, assim como de seus efeitos na microcirculação.

Muito tem sido discutido sobre as funções anti-inflamatórias da PCa em diversas patologias, inclusive na doença aterosclerótica, onde esse efeito poderia levar ao abrandamento da doença vascular. Zorio e colaboradores demonstraram que jovens sobreviventes de infarto agudo do miocárdio apresentavam níveis reduzidos de PCa. Além disso, os autores demonstraram uma relação inversa da atividade da PCa com a gravidade das lesões (Zorio *et al*, 2006). Em outro trabalho, Matsumoto e colaboradores associaram a diminuição da atividade da PCa à piora da aterosclerose na carótida de pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2, associando a sua diminuição com a aterogênese nesses pacientes (Matsumoto *et al*, 2007).

Em trabalho anterior, em que foram avaliadas as lesões ateroscleróticas precoces de camundongos hemofílicos A, sugeriu-se uma diminuição do processo inflamatório inicial nas lesões dos hemofílicos, a partir da demonstração de níveis diminuídos de marcadores pró-inflamatórios nas lesões destes animais (Khallou-Laschet *et al*, 2005). Os autores sugerem que a via intrínseca seria pró-aterogênica apenas nas fases iniciais da aterosclerose e que esse efeito reduziria com o decorrer do tempo. Nossos achados sugerem que esse efeito seja duradouro na evolução da doença arterial. Um limitante na conclusão do estudo anterior foi o curto período da evolução das lesões avaliadas (apenas por 16 semanas).

Outro dado importante observado em nosso estudo foi a redução do número de calcificações das lesões ateroscleróticas no seio aórtico dos animais

hemofílicos A. As calcificações são conhecidos marcadores de gravidade e complexidade da lesão aterosclerótica. Isso significa que, além da redução da área de lesões, os hemofílicos A apresentaram também lesões menos complexas.

5.2 – Desenvolvimento da doença aterosclerótica nos animais com diferentes níveis de FIX:

Ao contrário da expectativa inicial, a deficiência do FIX da coagulação não apenas não exerceu efeito protetor sobre o desenvolvimento da doença arterial, como foi um fator de piora na evolução da doença aterosclerótica nos dois modelos de aterosclerose estudados. No modelo deficiente de LDLR, o aumento da aterosclerose foi evidente tanto na avaliação da aorta (nos dois momentos avaliados - 22 e 37 semanas) como no seio aórtico (após 37 semanas de dieta rica em colesterol). Nos animais hemofílicos B deficientes de apoE (HB/APOE-/-) observamos aumento da progressão das lesões ateroscleróticas nos dois momentos avaliados (22 e 37 semanas) e no seio aórtico com 22 semanas.

A fim de confirmar esses dados, realizamos experimentos com animais que apresentam hiper-expressão de fator IX (Tg+). Nesses animais, que apresentam níveis de FIX entre 2 a 3 vezes acima do normal, o efeito de piora das lesões observado em animais com deficiência do FIX foi revertido. Além disso, esses animais apresentaram uma tendência à redução no tamanho das lesões ateroscleróticas principalmente após um período mais prolongado de dieta aterogênica (40 semanas). Independentemente da evolução da doença arterial, esses animais apresentaram aumento da frequência de eventos de trombose venosa em relação aos controles.

Em conjunto, esses dados sugerem que o fator IX pode ter um papel protetor no desenvolvimento da doença aterosclerótica, possivelmente independente de seu efeito na coagulação.

Uma possível explicação para esse fenômeno pode estar relacionada à interação entre o FIX e o colágeno. Em 1983, Heimark e colaboradores descreveram pela primeira vez a ligação do FIX em um sítio específico nas células endoteliais, informação esta confirmada posteriormente por outros grupos de forma mais detalhada (Stern *et al*, 1983, Brinkman *et al*, 1994). Em 1992, Cheung e colaboradores (Cheung *et al*, 1992) localizaram os resíduos 3-11 da região amino terminal do FIX no domínio Gla como sendo a região responsável pela sua ligação nas células endoteliais e, posteriormente, o mesmo grupo identificou o colágeno IV como sítio endotelial da ligação do FIX (Cheung *et al*, 1996).

O colágeno IV é uma proteína da matriz extra-celular e um dos principais componentes da membrana basal das células endoteliais. Entre os diversos componentes da matriz extracelular, o colágeno tem grande importância devido a sua abundância e a sua contribuição para a estrutura da placa aterosclerótica, mantendo sua resistência tênsil e integridade. Por outro lado, é o equilíbrio entre a produção de citocinas, como por exemplo o TGF β e o PDGF, que controla o equilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno, bem como de proliferação de células musculares lisas. Quaisquer fatores que alterem esse equilíbrio podem determinar mudanças na evolução da progressão e na vulnerabilidade das placas ateroscleróticas.

Mutações no domínio Gla do FIX, incluindo a lisina 5 pela alanina (K5A) e valina 10 pela lisina (V10K), produziram FIX que não tinha afinidade pelo colágeno, mas mantinha atividade coagulante normal (Cheung *et al*, 1992). Esses dados reforçam que o sítio de ligação ao colágeno não está relacionado à função coagulante do FIX, mas, sim, a alguma função associada exclusivamente ao endotélio. É interessante que, apesar dessa ligação entre FIX e célula endotelial/colágeno IV ser bem documentada, pouco é conhecido sobre seu significado fisiológico. Portanto, é possível imaginar que a piora na evolução das lesões ateroscleróticas em animais com deficiência de FIX poderia estar relacionada à ausência do papel protetor do fator IX na regulação de processos inflamatórios das células endoteliais mediante sua ligação ao colágeno.

Um resultado aparentemente discrepante foi encontrado na avaliação do grupo HB/APOE^{-/-}, onde houve diminuição da lesão aterosclerótica no seio aórtico, comparativamente aos controles apenas deficientes de apoE (NL/APOE^{-/-}), e aumento nos achados da aorta, onde a doença foi mais grave no grupo com hemofilia B. Na avaliação desse achado é importante destacar a alta mortalidade desse grupo (HB/APOE^{-/-}) em relação a todos os demais grupos do estudo. De 60 animais HB/APOE^{-/-} colocados em dieta, 29 morreram antes de completar o período previsto para o sacrifício. Esses óbitos aparentemente não foram relacionados a fenômenos hemorrágicos ou infecciosos. É interessante ressaltarmos que os óbitos desses animais provavelmente estariam muito mais associados à gravidade da doença no seio aórtico do que na aorta, visto que esses animais não evoluem com ruptura da placa de ateroma e oclusão arterial aguda. Assim, a doença avançada no seio aórtico poderia ter precipitado a morte de muitos animais no grupo HB/APOE^{-/-}, de modo que apenas os sobreviventes, com doença mais branda no seio aórtico, foram analisados após 37 semanas de dieta aterogênica.

Outro dado relevante para a avaliação deste achado é que na avaliação das lesões após 37 semanas de dieta, apesar de menores no grupo HB/APOE^{-/-}, observamos maior densidade de fibras colágenas nesse grupo em relação aos controles NL/APOE^{-/-}. É importante ressaltar que a presença de colágeno é um conhecido marcador de complexidade da lesão aterosclerótica.

Nossos resultados abrem diferentes frentes para futuros estudos. O efeito protetor da deficiência de FVIII no desenvolvimento da aterosclerose sugere que a manipulação da atividade relativa ao FVIII:PCa possa ser um alvo terapêutico potencial para o tratamento da doença arterial oclusiva. Por outro lado, os resultados obtidos com animais com deficiência de FIX, que exigem uma interpretação ainda cautelosa, reclamam a necessidade de aprofundamento dos estudos do processo inflamatório nesse modelo. Além disso, esses resultados abrem uma nova frente de investigação sobre a interação do fator IX com outros ligantes como, por exemplo, o colágeno endotelial. A identificação desses ligantes, bem como de novos domínios funcionais do FIX tem o potencial de permitir a

elaboração de novas abordagens terapêuticas para a prevenção das doenças vasculares.

Essas informações podem contribuir ainda para o acompanhamento e tratamento dos pacientes hemofílicos, cuja sobrevida com novos tratamentos tem aumentado, permitindo que eles atinjam com maior frequência a idade de maior risco para doença arterial oclusiva. Como já mencionado, o efeito adicional de outras causas de mortalidade até recentemente preponderantes em pacientes com hemofilia (HIV, sangramentos, etc) poderia justificar a ausência de evidências epidemiológicas mais robustas dos fenômenos observados em nosso estudo.

Conclusões

6 – CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos inicialmente propostos nesse estudo, ou seja, de investigar a influência dos fatores VIII e IX no desenvolvimento e progressão da doença aterosclerótica, concluímos que:

1. A deficiência do FVIII teve um efeito protetor na evolução da doença aterosclerótica no modelo de aterosclerose deficiente de apoE, de maneira tempo dependente.
2. O efeito protetor da deficiência de FVIII esteve presente mesmo na presença de níveis mais elevados de colesterol no modelo de camundongos com deficiência de apoE.
3. A deficiência de FIX não apresentou efeito protetor sobre a evolução da doença aterosclerótica nos modelos estudados, mas representou um fator de piora da aterosclerose nos dois modelos estudados.
4. A hiper-expressão de FIX não representou um fator de agravamento na progressão da doença aterosclerótica em camundongos com deficiência de apoE, mas foi um fator de risco para trombose venosa profunda.
5. Esse estudo evidencia a interferência heterogênea dos fatores de coagulação na doença arterial, provavelmente por ações distintas daquelas bem conhecidas na coagulação e no evento final de oclusão arterial aguda.

Referências Bibliográficas

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ananyeva NM, Kouliavskaia DV, Shima M, Saenko EL. Intrinsic pathway of blood coagulation contributes to thrombogenicity of atherosclerotic plaque. *Blood* 2002; (99): 4475-4485.

Armstrong ML, Heistad DD. Animal models of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1990; (85): 15-23.

Bernard GR, Vicent JL, Laterre PF, La Rosa SP, Dhainaut JF, Rodriguez AL, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, for the recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) Study Group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Eng J Med* 2001; (344): 699-709.

Bi L, Lawer AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of hemophilia. *Nat Genet* 1995; (10): 119-121.

Birola F, Zanon E, Petrobelli F, Cavarero M, Prandoni P, Pagnan A, Girolami A. Does hemophilia protect against atherosclerosis? A case-control study. *Clin Appl Thrombosis/Hemostasis* 2006; (2): 193-198.

Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, Mertens K, van Vlijmen BJM. Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood* 2003; (101): 3933-3939.

Bovenschen N, van Dijk KW, Havekes LM, Mertens K, van Vlijmen BJM. Clearance of coagulation factor VIII in very low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Br J Hematol* 2004; (126): 722-725

Bovenschen N, Mertens K, Hu L, Havekes LM, van Vlijmen BJ. LDL receptor cooperates with LDL receptor-related protein in regulating plasma levels of coagulation factor VIII in vivo. *Blood* 2005; (106): 906-912.

Breslow JL: Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 1993; (90): 8314-8318.

Brinkman HJM, Mertens K, Holthuis J, Zwart-Huinink LA, Grijm K, van Mourik JA. Br J Haematology 1994 (87): 332-342.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 1986; (232): 34-37

Cai SR, Motoyana K, Shen KJ, Kennedy SC, Flye MW, Ponder KP. Lovastatin decreases mortality and improves liver functions in fulminant hepatic failure from 90% partial hepatectomy in rats. J Hepatol 2000; (32): 67-77.

Calara F, Silvestre M, Casanda F, Yuan N, Napoli C, Palinski W. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. J Pathol 2001;(195):257-263.

Cheng T, Liu D, Griffin JH, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. Nat Med 2003; (9): 338-342.

Cheung WF, Hamaguchi N, Smith KJ, Stafford DW. The binding of human factor IX to endothelial cells is mediated by residues 3-11. J Biol Chem 1992; (267): 20529-20531.

Cheung WF, Van den Born J, Kuhn K, Kjellen L, Hudson BG, Stafford DW. Identification of the endothelial cell binding site for factor IX. Proc Nat Acad Sci USA 1996; (93): 11068-11073.

Cooper JA, Miller GJ, Bauer KA, Morrissey JH, Meade TW, Howarth DJ, Barzegar S, Mitchell JP, Rosenberg RD. Comparison of novel hemostatic factors and conventional risk factors for prediction of coronary heart disease. Circulation 2000; (101): 2816-2822.

Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thompson A, Appleby P, Rumley A, Lowe GD. Fibrin D-dimer and coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Circulation* 2001; (103): 2323-2327.

Darby SC, Kan SW, Spooner RJ, Giagrande PLF, Hill FGH, Hay CRM, Lee CA, Ludlam CA, Williams M. Mortality rates, life expectancy, and causes of death in people with hemophilia A or B in the United Kingdom who were not infected with HIV. *Blood* 2007; (110): 815-825.

Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993; (69): 377-381.

Duncan BB, Schimidt MI, Polanczyk CA, Mengue SS. Altos coeficientes de mortalidade em populações adultas brasileiras – uma comparação internacional. *Ver Ass Med Brasil* 1992; (38):138-144.

Eitzman DT, Westrinck RJ, Xu Z, Tyson J, Ginsburg D. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against atherosclerosis progression in the mouse carotid artery. *Blood* 2000; (96): 4212-4215.

Eitzman DR, Westrick RJ, Shen Y, Bodary PF, Gu S, Manning SL, Dobies SL, Ginsburg D. Homozygosity for factor V Leiden leads to enhanced thrombosis and atherosclerosis in mice. *Circulation* 2005; (111): 1822-1825.

Folson AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR Chambless LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease. *Circulation* 1997; (96): 1102-1108.

Folson AR, Rosamond WD, Shahar E, Cooper LS, Aleksic N, Javier Nieto F, Rasmussen ML, Wu KK. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. *Circulation* 1999; (100): 736-742.

Francke U, Brown MS, Goldstein JL. Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: syntenic of a receptor, a ligand, and a genetic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; (81):2826-2830.

Ghiselli G, Schaeffer EJ, Gascon P, Brewer HB. Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science* 1981; (214): 1239-1241.

Girelli D, Russo C, Ferraresi P, Olivieri O, Pinotti M, Friso S, Manzato F, Mazzucco A, Bernardi F, Corrocher R. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; (343): 774-780.

Gorog DA, Rakhit R, Parums D, Laffan M, Davies GJ. Raised factor VIII is associated with coronary thrombotic events. *Heart* 1998; (80): 415-417.

Hui-Feng L, Maeda N, Smithies O, Straigh DL, Stafford DW. A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood* 1997; (10): 3962-3966.

Inbal A, Freimark D, Modan B, Chetrit A, Matetzky S, Rosenberg N, Dardik R, Baron Z, Seligsohn U. Synergic effects of prothrombotic polymorphisms and atherogenic factors on the risk of myocardial infarction in young males. *Blood* 1999; (93): 2186-2190.

Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, D'Orazio A, Amore C, Arboretti R, Kluff C, Benedetta Donati M. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1988; (338): 79-85.

Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 1994; (93): 1885-1893.

Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, Hynes RO, Schaefer EJ, Wagner DD. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 1997; (99): 1037-1043.

Kannel, WB. The Framingham Study. Br Med J 1976; (6046): 1255.

Khallou-Laschet J, Caliguri G, Tupin E, Gaston A-T, Poirier B, Groyer E, Urbain D, Maisnier-Patin S, Sarkar R, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, Nicoletti A. Role of intrinsic coagulation pathway in atherogenesis assessed in hemophilic apolipoprotein E knockout mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; (25): e123-e126.

Kerschen EJ, Cooley BC, Castellino FJ, Griffin JH, Weiler H. Protective effect of activated protein C in murine endotoxemia: mechanism of action (abstract). Blood 2005; (106): 12a. Abstract 26.

Kerschen EJ, Cooley BC, Castellino FJ, Coughlin SR, Fernandez JA, Griffin JH, Weiler H. Mechanisms for mortality reduction by activated protein C in severe sepsis (abstract). Blood 2006; (108): 5a. Abstract 1.

Krenov AV, Anayena NM, Griffin JH, Saenko EL. Coagulation pathways in atherothrombosis. Trends Cardiovasc Med 2002; (12): 317-324.

Kundu RK, Sangiogi F, Wu LY, Kurashi K, Anderson F, Maxson R, Gordon EM. Targeted inactivation of the coagulation factor IX gene causes hemophilia in mice. Blood 1998; (92): 168-174.

Kung S-H, Hagstrom JN, Cass D, Tai SJ, Lin H-F, Stafford DW, High KA. Human factor IX corrects the bleeding diathesis of mice with hemophilia B. Blood 1998; (91): 784-790.

Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. Blood 2000; (95): 1517-1532.

Lee AJ, Fowkes GR, Lowe GD, Rumley A. Determinants of fibrin D-dimer in the Edinburgh Artery Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; (15): 1094-1097.

Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BMM, et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. J Biol Chem 1999; (274): 23734-23739.

Lin HF, Maeda N, Smithies O, Straight DL, Stafford DW: A coagulation factor IX deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood* 1997; (90): 3962- 3966.

Lou XJ, Boonmark NW, Horigan FT, Degen JL, Lawn RM. Fibrinogen deficiency reduces vascular accumulation of apolipoprotein(a) and development of atherosclerosis in apolipoprotein(a) transgenic mice. *Proc Natl Acad USA* 1998; (95): 12591-12595.

Lu G, Broze GJ Jr, Krishnaswamy S: Formation of factors IXa and Xa by the extrinsic pathway: differential regulation by tissue factor pathway inhibitor and antithrombin III. *J Biol Chem* 2004; (279): 17241-17249.

Mahley RW. Apolipoprotein E cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; (240): 622-630.

Matsumoto K, Yano Y, Gabazza EC, Arakit R, Bruno NE, Suematsu M, Akatsuka H, Katsuki A, Taguchi O, Adachi Y, Sumida Y. Inverse correlation between activated protein C generation and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2007; (24): 1322-1328.

Methia N, André P, Denis CV, Econopoulos M, Wagner DD. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood* 2001; (98): 1424-1428.

Minnema MC, Peters RJ, de Winter R, Lubbers YP, Barzegar S, Bauer KA, Rosemberg RD, Hack CE, ten Cate H. Activation of clotting factors XI and IX in patients with acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; (11): 2489-2493.

Moreno pr, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implication for plaque rupture. *Circulation* 1994; (89): 775-778.

Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, Griffin JH. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood* 2004; (104): 1740-1745.

Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007 (109): 3161-3172.

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. Apo-E deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; (14): 133-140.

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; (100): 2680-2690.

Paigen B, Mitchell D, Reue K, Morrow A, Lusis AJ, Le Boeuf BC. Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; (84): 3763-3767.

Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; (68): 231-240.

Pan W-H, Bai C-H, Chen J-R, Chiu H-C. Associations between carotid atherosclerosis and high factor VIII activity, dyslipidemia, and hypertension. *Stroke* 1997; (28): 88-94.

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto KS, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous in ES cells. *Cell* 1992; (71): 343-353.

Ravanat C, Freund M, Dol F, Cadroy Y, Roussi J, Incardona F, Maffrand J-P, Boneu B, Drouet L, Legrand C, Hebert J-M, Cazenave J-P. Cross-reactivity of human molecular markers for detection of prethrombotic states in various animals species. *Blood Coag Fibrinol* 1995; (6): 446-455.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. American Institute of Nutrition 1993.

Rosendaal FR, Varekamp I, Smit C, Bröcker-Vriends AHJT, Van Dijck H, Vandenbroucke JP, Hermans J, Suurmeijer TPBM, Briët E. Mortality and causes of death en Dutch haemophiliacs, 1973-1986 . *Br J of Haem* 1989; (71): 71-76.

Rosendaal FR, Briët E, Stibbe J, van Herpen G, Gevers Leuven JA, Hofman A, Vandenroucke JP. Haemophilia protects against ischaemic heart disease: a study of risk factors. *Br J of Haem* 1990; (75): 525-530.

Roosendaal FR. Factor VIII and coronary heart disease. *Eur J Epidemiol* 1992; (8): 71-75.

Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth Jr WT, Raghuathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; (89): 2817-2821.

Ross R. Mechanisms of disease: Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; (340): 115-126.

Rumley A, Lowe GDO, Sweetnam PM, Yarnell JWG, Ford RP. Factor VIII, von Willebrand factor and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly Heart Study. *Br J Haem* 1999; (105): 110-116.

Sabatino DE, Armstrong E, Edmonson S, Liu YL, Pleimes M, Schuettrumpf J, Fitzgerald J, Herzog RW, Arruda VR, High KA. Novel hemofilia B mouse models exhibiting a range of mutations in the Factor IX gene. *Blood* 2004; (104): 2767-2774.

Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Safaranov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* 1999; (274): 37685-37692.

Srámek A, Reiber JHC, Gerrits WBJ, Rosendaal FR: Decreased coagulability has no clinically relevant effect on atherogenesis – Observations in individuals with a hereditary bleeding tendency. *Circulation* 2001; (104): 762-767.

Srámek A, Kriek M, Rosendaal FR. Decreased mortality of ischaemic heart disease among carriers of haemophilia. *Lancet* 2003; (362): 351-354.

Sjoland H, Eitzman DT, Gordon D, Westrick RJ, Nabel EG, Ginsburg D. Atherosclerosis progression in LDL receptor deficient and apolipoprotein E deficient mice is independent of genetic alterations in plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; (20): 846-852.

Stek JJ, Silbershatz H, Tofler GH, Matheney TH, Sutherland P, Lipinska I, Massaro JM, Wilson PF, Muller JE, D'Agostino RB Sr. Association of fibrinogen with cardiovascular risk factors and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Population. *Circulation* 2000; (102): 1634-1638.

Stern DM, Drillings M, Nossel HL, Hurlet, Jensen A, La Gamma KS, Owen J. Binding of factors IX and IXa to cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983 (80): 4119-4123.

van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; (89): 36-44.

Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmback K, Xiao Q, Bugge TH, Degen SJ. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; (95): 7597-7602.

Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 1995; (36): 2320-2328.

Warren BL, Eid A, Singer P, et al. High dose antitrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; (286): 1869-1878.

Westrick RJ, Bodary PF, Xu Z, Shen YC, Broze GJ, Eitzman DT. Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice. *Circulation* 2001; (103): 3044-3046.

Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1999; (1): 157-162.

Xiao Q, Danton MJS, Witte DP, Kowala MC, Valentine MT, Bugge TH, Degen JL. Plasminogen deficiency accelerates vessel wall disease in mice predisposed to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; (94): 10335-10340.

Xiao Q, Danton MJS, Witte DP, Kowala MC, Valentine MT, Degen JL. Fibrinogen deficiency is compatible with the development of atherosclerosis in mice. *J. Clin Invest* 1998; (102): 1184-1194.

Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu R, Ichihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002; (347): 1916-1923.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; (258): 468-471.

Zorio E, Navarro S, Medina P, Estellés A, Osa A, Rueda J, Cubillo P, Aznar J, Espana R. Circulating activated protein C is reduced in young survivors of myocardial infarction and inversely correlates with the severity of coronary lesions. J Thromb Haemost 2006 (4): 1530-1536.