

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA
FACULDADE DE MEDICINA

**ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA: PREVALÊNCIA EM
DIABÉTICOS COM E SEM EVENTOS VASCULARES PRÉVIOS**

CAROLINE EICKHOFF COPETTI

Porto Alegre

2011

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA
FACULDADE DE MEDICINA

**ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA: PREVALÊNCIA EM
DIABÉTICOS COM E SEM EVENTOS VASCULARES PRÉVIOS**

CAROLINE EICKHOFF COPETTI

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina e
Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção
do título de Mestre em Medicina e Ciências da
Saúde

Orientador: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub

Porto Alegre

2011

C782a Copetti, Caroline Eickhoff

Anticorpos anticardiolipina: prevalência em diabéticos com e sem eventos vasculares prévios / Caroline Eickhoff Copetti. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

71 f.: . tab. Inclui um artigo de periódico submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA. 2. DIABETES MELLITUS TIPO 2.
3. CARDIOPATIAS. 4. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Staub, Henrique Luiz. II. Título.

C.D.D. 616.079
N.L.M. QW 575

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

CAROLINE EICKHOFF COPETTI

**ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA: PREVALÊNCIA EM
DIABÉTICOS COM E SEM EVENTOS VASCULARES PRÉVIOS**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do Grau de Mestre pelo Programa de
Pós-graduação em Medicina e Ciências da
Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul
(PUCRS).

Aprovada em _____ de _____ de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Inês Guimarães da Silveira (Reumatologia)

Dr. Marcus Franck (Reumatologia)

Dra. Luciana Schreiner (Endocrinologia)

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Professor Dr. Henrique Luiz Staub por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação; pelo incentivo, paciência e exemplo de mestre, que trabalha com seriedade e grande entusiasmo pela profissão.

Aos meus pais, por terem me proporcionado uma excelente formação tanto pessoal quanto profissional.

Ao meu noivo João Lucas, pelo apoio e carinho dedicados e pela constante compreensão nos momentos de ausência.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital São Lucas da PUCRS pela colaboração na realização das dosagens de anticorpos.

À Daniela Benzano, pelo auxílio estatístico.

À chefia do Laboratório Hemovita Análises Clínicas por permitir que eu conciliasse o trabalho e a realização deste mestrado.

LISTA DE ABREVIATURAS

aCL: anticorpos anticardiolipina

Beta2-gpI: beta2-glicoproteína I

DM: diabetes mellitus

ELISA: ensaio de imunoabsorção ligado à enzima

IgA: imunoglobulina A

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

LES: lupus eritematoso sistêmico

SAF: síndrome antifosfolípica

VDRL: venereal disease research laboratory

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	07
1.1 Anticorpos anticardiolipina e síndrome antifosfolipídica.....	07
1.2 Diabetes mellitus e anticorpos anticardiolipina.....	11
2. JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO.....	16
3. OBJETIVO.....	17
4. HIPÓTESES.....	18
4.1 Hipótese Operacional.....	18
4.2 Hipótese Conceitual.....	18
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
6. ARTIGO EM PORTUGUÊS	27
7. ARTIGO EM INGLÊS.....	44
8. ANEXOS	63
Anexo I – Carta de Aprovação do CEP – PUC/RS.....	64
Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	66
Anexo III – Questionário.....	67
Anexo IV – Submissão do Artigo	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anticorpos anticardiolipina e síndrome antifosfolípida

Em 1906, Wasserman originalmente descreveu a ocorrência de anticorpos antifosfolípidos em pacientes com sífilis. Décadas mais tarde, a presença de reações falso-positivas para o VDRL (venereal disease research laboratory, emulsão que contém cardiolipina, fosfatidilcolina e colesterol) foi detectada em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES)¹⁻². Em 1963, Bowie *et al* observaram que alguns pacientes com LES e trombose apresentavam um inibidor da coagulação, a partir de então denominado anticoagulante lúpico³.

Os anticorpos antifosfolípidos constituem um grupo altamente complexo de anticorpos dirigidos contra cardiolipina, outros fosfolípidos carregados negativamente e cofatores fosfolípidos como a beta2-glicoproteína I (beta2-gpI). De forma eventual, anticorpos antifosfolípidos se ligam a fosfolípidos neutros como a fosfatiletanolamina⁴.

Os anticorpos atuam contra fosfolípidos que participam do complexo protrombinase da coagulação, composto pelos fatores V e X, fosfolípidos e cálcio^{++2 5-6}. Os mecanismos intrínsecos da ligação dos anticorpos com fosfolípidos da via da coagulação e de membranas celulares permanecem pouco conhecidos¹⁻².

Harris *et al* em 1983, após confirmarem a ocorrência de falsa-positividade para o VDRL no LES, desenvolveram um teste para detecção de anticorpos aCL em fase sólida (radioimunoensaio e posteriormente ensaio enzimático). A técnica imunoenzimática (ELISA) quantifica diretamente os níveis de anticorpos aCL a partir de amostras de soro ou plasma. Após algumas modificações e ajustes de padronização, estão disponíveis hoje no mercado a testagem para anticorpos aCL de classe IgG, IgM e IgA^{1 7-8}. Anticorpos aCL são normalmente detectados em ensaios de fase sólida que utilizam o cofator beta2-gpI em tampões ou diluentes⁹⁻¹⁰.

Os testes habituais para detecção de anticorpos antifosfolípidos incluem ensaios de coagulação (anticoagulante lúpico) e os testes sorológicos para anticorpos anti-beta2-gpI e

aCL. Os ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos aCL constituem métodos rotineiros para confirmação do diagnóstico de síndrome antifosfolípide (SAF). Ao menos duas testagens positivas de anticorpos anti-beta2-gpI ou aCL em um intervalo de 6 semanas se fazem necessárias para confirmação laboratorial da SAF¹¹.

A técnica imunoenzimática consiste basicamente em quantificar anticorpos aCL de isotipos IgG, IgM e IgA em placas de fase sólida¹²⁻¹⁴. Na primeira etapa da reação, amostras diluídas dos soros-teste (potencialmente contendo anticorpos aCL) são incubadas em poços contendo cardiolipina. Tampões contendo o cofator beta2-gp1 são utilizados¹⁵. Em uma segunda incubação, anticorpos anti-IgG, anti-IgM ou anti-IgA humana conjugados com peroxidase são acrescentados à placa. Após adição de cromogêneo, a intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos aCL na amostra¹⁶⁻¹⁷.

Com o desenvolvimento de métodos sensíveis para a quantificação de anticorpos antifosfolípidos, as associações destes autoanticorpos com doença tromboembólica se tornaram mais definidas¹⁸. Anticorpos aCL estão associados a trombozes arteriais, venosas, morbidade gestacional, trombocitopenia e distúrbios neurológicos¹⁹⁻²¹.

A combinação da presença de anticorpos aCL (ou anticorpos anti-beta2-gpI, ou anticoagulante lúpico) com fenômenos trombóticos e/ou morbidade gestacional em pacientes com LES ou outra doença auto-imune, infecciosa ou neoplásica define a SAF^{2 21-22}.

A denominação síndrome do anticorpo aCL havia sido proposta inicialmente em 1985²³. Harris *et al* em 1987 renomearam este conjunto de eventos como SAF, dada a ocorrência, neste contexto, de outros anticorpos contra fosfolípidos que não anticorpos aCL²⁴. A SAF tem sido diagnosticada em associação com uma variedade de afecções, principalmente autoimunes²⁵. Formas primárias da doença, entretanto, tem sido bem reconhecidas nos últimos anos²⁶⁻²⁷.

Embora classicamente descritos em pacientes com SAF²⁶⁻²⁷ e LES²⁸, anticorpos antifosfolípidos podem ocorrer em indivíduos com outras doenças autoimunes, doenças infecciosas, tumores ou então naqueles sob uso de fármacos como procainamida e hidralazina.

A frequência de anticorpos antifosfolípidos em indivíduos saudáveis é em torno de 2%, podendo aumentar com a idade e doenças crônicas coexistentes²⁹. Para Petri *et al*, a prevalência de anticorpos aCL em controles sadios foi de 2,5%³⁰. Em estudo de 2004, a

positividade em controles foi de 2,5% para IgG e de 3,1% para IgM aCL³¹. No Brasil, a frequência de títulos baixos de aCL foi de 6% e a de títulos altos em 1% dos indivíduos saudáveis³². Alguns estudos demonstraram que indivíduos com mais de 65 anos podem apresentar taxas superiores a 20 unidades de aCL^{1 33-36}. Fields *et al* 1989 reportaram IgG ou IgM aCL em 12% dos idosos saudáveis e em 2% de indivíduos mais jovens³⁷. Diferentemente, outros autores descreveram positividade insignificante para anticorpos aCL em idosos³⁸.

A marca registrada da SAF³⁹ é a tendência a trombozes venosas e arteriais⁴⁰. Trombozes venosas predominam na doença. Quase todo o leito vascular pode ser afetado na SAF. De importância, pacientes com história de trombose e níveis significantes de anticorpos antifosfolípidos possuem risco elevado para a recorrência de trombose⁴⁰.

Muito provavelmente os fenômenos isquêmicos vistos na SAF decorrem da indução de trombose por anticorpos aCL e outros anticorpos contra fosfolípidos. Entretanto, os mecanismos pelos quais anticorpos aCL deflagram trombogênese ainda não são completamente conhecidos. Nos dias correntes, a papel da beta2-gpI como antígeno que se acopla a fosfolípidos de carga negativa em membranas plaquetárias e endoteliais é altamente considerado. A beta2-gpI, um anticoagulante natural, é provavelmente o principal alvo antigênico dos anticorpos aCL, desempenhando papel central na fisiopatogenia desta afecção⁴¹⁻⁴².

Em termos de trombozes venosas, predominam na SAF os trombos em membros inferiores e a embolia pulmonar. Outros acometimentos da rede venosa incluem a retina e as veias hepática e renal. A manifestação arterial mais freqüente é o acidente vascular cerebral isquêmico ou acidente isquêmico transitório. Oclusão de artéria retiniana, infarto agudo do miocárdio e oclusão arterial periférica são também acometimentos conhecidos⁴³⁻⁴⁶.

Uma série de manifestações cardíacas foram descritas em pacientes com SAF primária ou secundária, principalmente doença valvular⁴⁷. A valvulopatia vista na SAF é apenas ocasionalmente agressiva⁸. A endocardite previamente conhecida como de Libman-Sacks provavelmente decorre de microtrombose valvular e está associada à SAF; pode se manifestar como embolia cerebral ou sistêmica⁴⁸⁻⁴⁹. A SAF constitui uma das causas de acidentes cerebrovasculares e infarto agudo do miocárdio em indivíduos jovens, a maioria sem fatores de risco tradicionais para aterosclerose^{7-8 50}.

Diferentes estudos demonstraram que a presença de altos títulos de aCL (acima de 20-40 unidades) estão intimamente ligados à ocorrência de eventos trombo-oclusivos⁵¹⁻⁵³. Uma associação entre acidente vascular cerebral e presença de anticorpos aCL foi proposta⁵⁴⁻⁵⁵. Positividade para anticorpos aCL em indivíduos com doença coronária não associada a fatores de risco clássicos tem sido fartamente relatada⁵⁶⁻⁶¹.

Títulos elevados de IgG aCL são encontrados mais frequentemente após o curso agudo de um evento cardiovascular e nas valvulopatias do que na população geral. Títulos elevados de anticorpos aCL após cirurgia coronária ou cirurgia de revascularização periférica podem indicar reoclusão precoce ou identificar pacientes com risco de trombose venosa profunda. Entre os isotipos aCL, a IgG tem sido a mais preditiva para eventos trombóticos⁶².

Sabidamente, uma das principais causas de trombose em pacientes sob hemodiálise é a presença do acesso arteriovenoso⁶³. De interesse, alguns estudos relataram associação entre títulos elevados de IgG aCL e tromboses de fístulas arteriovenosas nestes pacientes⁶⁴⁻⁶⁷.

Indivíduos com idade inferior a 50 anos e níveis moderados ou altos de aCL têm um risco relativo de sete a oito vezes maior de desenvolver trombose venosa profunda, embolia pulmonar ou acidente vascular isquêmico em relação à população normal. Estes indivíduos são candidatos a terapia antiplaquetária profilática^{1 68}. Nos indivíduos assintomáticos com níveis baixos de anticorpos aCL, a terapia antiplaquetária não é consensual.⁶⁹ Em pacientes com SAF estabelecida, o tratamento de fase aguda se baseia na anticoagulação com heparina venosa (regular) ou subcutânea (regular ou fracionada). A prevenção de novos eventos trombóticos é efetuada através do uso de varfarina a longo prazo. Um INR normatizado internacional ao redor de 3 deve ser mantido. Imunossupressores, corticosteróides e gamaglobulina endovenosa estão indicados somente em casos de trombose refratárias, ou para o tratamento de doença autoimune associada^{1 68}.

Na SAF gestacional estabelecida e isolada, o protocolo-padrão inclui fundamentalmente heparina subcutânea e ácido acetil-salicílico em dose baixa. A dosagem e a frequência de heparina dependem do peso corporal e história clínica. O índice de sucesso gestacional com a aplicação deste protocolo é de cerca de 70%. A gamaglobulina endovenosa é restrita a pacientes com morbidade gestacional refratária ao tratamento convencional. Em

pacientes com SAF gestacional isolada, a profilaxia pós-parto pode incluir fundamentalmente antiplaquetários⁷⁰.

Digno de menção, anticorpos aCL podem estar presentes em 21 a 65% dos pacientes com LES, 33% dos casos de artrite reumatóide, 28% das artrites psoriáticas, 14% das osteoartrites, 14% das polimiosites e dermatomiosites, e ocasionalmente em pacientes com miastemia gravis, esclerose múltipla, tireoidite de Hashimoto, síndrome de Sjögren, poliarterite nodosa, sífilis, AIDS e hepatites virais A ocorrência de anticorpos aCL no diabetes mellitus (DM)²⁷¹ é de nosso particular interesse e será abordada a seguir.

1.2 Diabetes mellitus e anticorpos anticardiolipina

O DM é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina (por destruição das células beta do pâncreas) e/ou da incapacidade da mesma de exercer adequadamente seus efeitos, resultando em resistência insulínica. Notabiliza-se pela presença de hiperglicemia crônica, freqüentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial⁷².

A doença cresce em proporções preocupantes neste século, especialmente em países em desenvolvimento. A estimativa é de que nestes países haverá um crescimento de 170% na prevalência de DM, aumentando de 84 para 228 milhões de indivíduos afetados. Em contraste com os países desenvolvidos, onde a faixa etária mais acometida será acima dos 65 anos, para países em desenvolvimento a faixa etária é de 45 a 64 anos. Um Estudo Multicêntrico de Prevalência de DM revelou, no final da década de 1980, que 7,6% da população adulta brasileira era diabética⁷³⁻⁷⁴. Os dados atuais são indicativos de que 12% da população brasileira (cerca de 12 milhões de pessoas) estejam acometidas por esta afecção⁷⁵.

As formas mais freqüentes de diabetes são o DM tipo 1 e o DM tipo 2. Até recentemente, os termos "dependente e não dependente de insulina" eram utilizados na caracterização dos dois tipos de diabetes. Esta nomenclatura não é mais utilizada nos dias atuais. O DM tipo 1, que não é foco do presente estudo, se caracteriza por destruição progressiva da população de células beta do pâncreas, provavelmente por mecanismos autoimunes, sejam humorais e ou celulares⁷⁶⁻⁷⁸.

O DM tipo 2 representa cerca de 90% dos casos de diabetes. É caracterizado por distúrbios da ação ou secreção da insulina⁷⁹. A maioria dos pacientes acometidos por esta forma da doença apresenta obesidade. Percebe-se um aumento relativo de DM tipo 2 em adultos jovens. Estes indivíduos apresentam quase sempre um fenótipo clássico: predisposição à obesidade, sedentarismo e história familiar de DM tipo 2. São geralmente provenientes de grupos socioeconômicos menos favorecidos⁸⁰. Outros fatores predisponentes incluem o sexo feminino e a ocorrência de síndrome dos ovários policísticos⁸¹.

Outros tipos específicos de DM a serem citados incluem o DM do adulto de início no jovem (sem predisposição para a cetoacidose e sem obesidade; com hiperglicemia leve, iniciando antes dos 25 anos de idade e com várias gerações de familiares com diabetes) e diabetes de origem mitocondrial (indivíduos jovens e sem obesidade; hiperglicemia leve, podendo progredir lentamente para graus mais avançados; associação com mutação do DNA mitocondrial; presença de surdez neurossensorial e distrofia macular e, menos freqüentemente, miopatia, cardiomiopatia e doença renal)⁷⁶.

Além dos anteriores, deve ser citado ainda o diabetes gestacional. Esta forma é, conceitualmente, uma tolerância diminuída aos carboidratos. O diagnóstico da doença é firmado durante a gestação, e pode ou não persistir após o parto⁸².

O DM se caracteriza por complicações neurológicas, nefrológicas e vasculares⁸³. Diferentes anormalidades estão presentes no DM. Um exemplo é a geração de produtos glicados (que decorre do estado hiperglicêmico), capaz de gerar arteriopatia e hipercoagulabilidade⁸⁴⁻⁸⁵.

O DM é considerado um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença aterosclerótica e complicações associadas a ela⁸⁶. Pacientes diabéticos são propensos a complicações micro e macrovasculares; a etiopatogenia destas complicações é complexa e multifatorial, e ainda necessita esclarecimentos mais detalhados³⁵.

O DM tipo 2, foco de nosso interesse, é caracterizado por resistência à ação da insulina e por uma associação definida com obesidade. Citocinas (principalmente o fator de necrose tumoral, produto do adipócito e de outras células do sistema imune) estão ligadas à gênese da resistência insulínica⁸⁷. Níveis elevados das interleucinas 6 e 8 são também observados em pacientes com DM tipo 2, e o papel destas citocinas na resistência à insulina é também reivindicado no momento atual⁸⁸.

O DM apresenta altas taxas de morbi-mortalidade, com perda na qualidade de vida. Os custos para o atendimento ao paciente diabético variam de 2,5% a 15% dos gastos nacionais com saúde. A doença representa também uma carga adicional à sociedade, em decorrência da perda de produtividade no trabalho, aposentadoria precoce e mortalidade prematura⁸⁹.

Uma série de estudos transversais e prospectivos compararam a sensibilidade à insulina em várias populações étnicas e nacionais dentro dos Estados Unidos, analisando possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de DM tipo 2. Independentemente de fatores culturais e étnicos, o *San Antonio Heart Study* reportou que os mais fortes preditores de risco para o deflagramento de DM tipo 2 são as elevadas concentrações de insulina em jejum e a reduzida secreção de insulina⁹⁰. Complicações vasculares são a principal causa de morbidade em pacientes com diabetes mellitus⁹¹. Complicações macrovasculares, como as que afetam as circulações coronária e cerebral, constituem causas maiores de mortalidade em diabéticos⁹²⁻⁹³.

As complicações macrovasculares decorrem de doença aterosclerótica obstrutiva. As alterações patológicas que levam às alterações funcionais e estruturais em vasos de diabéticos incluem a disfunção endotelial, diminuição da complacência vascular e aterosclerose. A ativação endotelial leva a superexpressão de uma série de citocinas pró-inflamatórias e vasoativas. Vias hemodinâmicas são ativadas e, possivelmente, amplificadas por hipertensão arterial sistêmica concomitante. Além disso, a hiperglicemia, a modulação lipídica e a ativação de fatores de crescimento contribuem para o desenvolvimento da doença vascular diabética⁹⁴. Pacientes com DM tipo 2 estão sob risco substancialmente alto de evoluir com obstruções macrovasculares, particularmente cardíacas e cerebrais⁹⁵.

O estresse oxidativo é aumentado no DM, provavelmente em decorrência de auto-oxidação da glicose⁹⁶. Células endoteliais continuamente expostas ao estado hiperglicêmico sintetizam ânions superóxidos; estes, por sua vez, inibem o efeito vasodilatador do óxido nítrico. Como resultado, temos desestruturação da homeostase vascular em diabéticos⁹⁷.

O DM tipo 2 é uma condição que se notabiliza por alterações de um duplo cenário, funcional e metabólico⁹⁸; estas alterações promovem a aterogênese e suas conseqüentes alterações macrovasculares. Em pacientes diabéticos do tipo 2, o estado crônico de hiperglicemia e a resistência à insulina são responsáveis por disfunções endoteliais,

plaquetárias e das vias da coagulação e fibrinólise. A adesividade de monócitos e macrófagos é também alterada nestes pacientes⁹⁹.

A mortalidade por doença coronariana está aumentada em diabéticos dos tipos 1 e 2¹⁰⁰. Alterações da hemostasia são responsáveis por este risco coronariano elevado¹⁰¹⁻¹⁰². De grande interesse, o DM está associado com risco aumentado de doença cardiovascular mesmo na presença do controle glicêmico intensivo¹⁰³.

Embora o estado hiperglicêmico e a eventual concomitância de hipertensão arterial estejam estreitamente associados à desestruturação vascular e tendência trombótica em diabéticos, o papel de mecanismos autoimunes na angiopatia diabética é também matéria a ser considerada. Anticorpos antifosfolípidos, entre outros, podem se constituir em fatores adicionais na gênese da vasculopatia diabética. A prevalência de anticorpos aCL em pacientes diabéticos tem sido foco de poucos estudos nos anos recentes, e os resultados não são de forma alguma homogêneos.

Em termos etiopatogênicos, a tendência trombótica atribuída à ação de anticorpos aCL decorre de múltiplos mecanismos: ativação plaquetária, de células endoteliais, de monócitos, do sistema do complemento e via da coagulação¹⁰⁴. O papel deste interessante grupo de autoanticorpos no deflagramento ou perpetuação dos eventos isquêmicos próprios do paciente diabético é ainda nebuloso.

Alguns estudos demonstraram aumento da prevalência de anticorpos aCL em pacientes com diabetes 1 e 2. Os níveis médios do anticorpo foram significativamente maiores em diabéticos comparativamente a controles saudáveis¹⁰⁵. Em outro estudo, os níveis de anticorpos aCL foram maiores em diabéticos tipo 1 com complicações vasculares quando comparados a diabéticos sem complicações e a controles⁸⁶.

De acordo com estudo datado de 1989, diabéticos com e sem doença arterial coronariana tiveram prevalência aumentada de IgG aCL em relação a indivíduos saudáveis¹⁰⁶. Níveis de anticorpos IgA contra fosfatidiletalomanina (fosfolípide neutro) foram aumentados em diabéticos em relação a controles saudáveis⁸³.

Segundo dados de 1989, pacientes com DM tipo 2 e complicações macrovasculares tem uma prevalência considerável de anticorpos aCL¹⁰⁷. Uma frequência significativamente alta de anticorpos aCL foi também relatada em diabéticos dos tipos 1 e

2 com macroangiopatia e nefropatia. Estes pacientes apresentaram maiores titulações do anticorpo do que pacientes com diabetes não complicado ou controlado³⁵.

Um grupo de autores estudou a associação de teste positivo para anticorpos aCL e anti-beta2-gpI com os eventos micro e vasculares próprios do DM. A eventual ocorrência destes dois grupos de autoanticorpos não se associou à vasculopatia diabética; os autores concluem pela não-relevância destes anticorpos na patogenia das obstruções vasculares de diabéticos¹⁰⁸. Recentemente, reportamos frequência insignificante de IgG, IgM e IgA aCL em pacientes com síndrome metabólica¹⁰⁹.

Também recentemente, reinvidicou-se uma associação sinérgica de anticorpos aCL e disfunção endotelial no deflagramento de vasculopatia em diabéticos tipo 1¹¹⁰.

Como visto, os dados que concernem à frequência e papel patogénico dos anticorpos aCL na vasculopatia diabética são polêmicos e por vezes antagônicos, e o assunto necessita elucidação.

2. JUSTIFICATIVAS PARA O ESTUDO

Podemos arrolar algumas justificativas para a realização deste estudo:

- Dados envolvendo detecção de anticorpos aCL em pacientes diabéticos praticamente inexistem na literatura nacional;
- Os estudos que avaliaram prevalência de anticorpos aCL no DM não se mostraram homogêneos quanto aos resultados;
- O isotipo IgA aCL, aqui incluído, foi pouco estudado em populações diabéticas até o momento;
- A patogenia da macrovasculopatia diabética é complexa e multifatorial, podendo incluir autoimunidade. Uma eventual associação entre anticorpos aCL e histórico vascular poderia contribuir adicionalmente para a compreensão da patogênese da angiopatia diabética.

3. OBJETIVOS

Verificar a frequência de IgG, IgM e IgA aCL em uma população brasileira com DM tipo 2 (com ou sem história de eventos macrovasculares) e em controles saudáveis; avaliar a associação, se existente, entre anticorpos aCL e histórico de macrovasculopatia diabética.

4. HIPÓTESES

4.1 Hipótese operacional

Pacientes com DM tipo 2 não apresentam frequência aumentada de teste positivo para IgG, IgM e IgA aCL em relação a controles; estes anticorpos não se associam a histórico de macrovasculopatia diabética.

4.2 Hipótese conceitual

Pacientes com DM tipo 2 apresentam frequência aumentada de teste positivo para IgG, IgM e IgA aCL em relação a controles; estes anticorpos se associam a histórico de macrovasculopatia diabética.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Louzada PJ, Simon SM, Voltarelli JC, Donadi EA. Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide. *Med Rib Preto* 1998;31:305-15.
2. Diógenes MJN, Siquera Neto JI, Ribeiro Neto CC, Holanda RRA. Síndrome dos anticorpos antifosfolípides (SaAFLs): anticoagulante lúpico (AL) e/ou anticorpo anticardiolipina (aCL). *An Bras Dermatol.* 1999;74(6):613-9.
3. Bowie EJ, Thompson JH, Jr., Pascuzzi CA, Owen CA, Jr. Thrombosis in Systemic Lupus Erythematosus Despite Circulating Anticoagulants. *J Lab Clin Med* 1963;62:416-30.
4. Staub HL, Harris EN, Khamashta MA, Savidge G, Chahade WH, Hughes GR. Antibody to phosphatidylethanolamine in a patient with lupus anticoagulant and thrombosis. *Ann Rheum Dis* 1989;48(2):166-9.
5. Alves MMR, Panico MDB, Silveira PRM, Reis CV, Agorionitis NP, Albuquerque EM, et al. Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido: Relato de dois casos. *Revista Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular* 1993;2.
6. Hughes GR. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993;342(8867):341-4.
7. Harris EN, Gharavi AE, Boey ML, Patel BM, Mackworth-Young CG, Loizou S, et al. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1983;2(8361):1211-4.
8. Asherson RA, Harris EN. Anticardiolipin antibodies--clinical associations. *Postgrad Med J* 1986;62(734):1081-7.
9. Santamaria JR, Badziak D, Barros MFd, Mandelli FL, Cavalin LC, Sato MS. Síndrome antifosfolípide. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2005;80:225-39.
10. Reddel SW, Krilis SA. Testing for and clinical significance of anticardiolipin antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(6):775-82.
11. Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Testing for antiphospholipid antibodies: problems and solutions. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(1):48-57; quiz 58-9.
12. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987;46(1):1-6.
13. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR. Anti-phospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985;11(3):591-609.
14. Harris EN. Solid-phase anti-cardiolipin test revisited. *Am J Med* 1988;85(5):599-601.
15. Chamley LW, McKay EJ, Pattison NS. Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies. *Thromb Res* 1991;61(3):291-9.

16. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987;68(1):215-22.
17. Brown RD, Gibson J, Wells J, Jun R, Rickard K, Kronenberg H. Human cardiolipin as the antigen in an ELISA to detect anticardiolipin antibodies. *Br J Rheumatol* 1989;28(2):109-12.
18. Loizou S, McCrea JD, Rudge AC, Reynolds R, Boyle CC, Harris EN. Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results. *Clin Exp Immunol* 1985;62(3):738-45.
19. Ergüven S, Calgüner M, Gülmezoglu AM, Gülmezoglu E, Sungur CRO, Özcebe O. Clinical Significance of Anticardiolipin Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus. . *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 1989;2(3):189-92.
20. Leker RR, Steiner I. Anticardiolipin antibodies are frequently present in patients with idiopathic intracranial hypertension. *Arch Neurol* 1998;55(6):817-20.
21. Hughes GR. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287(6399):1088-9.
22. Costa C, Castanheira R, Coelho F, Dias C. Síndrome antifosfolípida primária - estudo retrospectivo de 29 doentes de uma Unidade de Doenças Auto-imunes. . *Rev Soc Port de Med Int*. 2009;16(1):3-7.
23. Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE. The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol* 1986;13(3):486-9.
24. Harris EN. Syndrome of the black swan. *Br J Rheumatol* 1987;26(5):324-6.
25. Vasu TS, Saluja J, Amzuta IG, Lenox RJ. Massive pulmonary embolism secondary to anticardiolipin antibody syndrome. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2007;49(1):53-5.
26. Cervera R, Piette JC, Font J, Khamashta MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome: clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum* 2002;46(4):1019-27.
27. Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, et al. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus in routine determinations--a cooperative project of the European Antiphospholipid Forum. *Thromb Haemost* 2001;86(2):575-83.
28. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
29. Gezer S. Antiphospholipid syndrome. *Dis Mon* 2003;49(12):696-741.
30. Petri M, Rheinschmidt M, Whiting-O'Keefe Q, Hellmann D, Corash L. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. A study of sixty consecutive patients by activated partial thromboplastin time, Russell viper venom time, and anticardiolipin antibody level. *Ann Intern Med* 1987;106(4):524-31.

31. Al Jabri AA, Al Buloshi MS. Anticardiolipin and antinuclear antibodies in the adult healthy Omani individuals. *Saudi Med J* 2004;25(3):313-7.
32. Godoy JMP, Lúpino PL, Souza DRS, Parma AHC, Angulo IL, Godoy MF. Prevalência de anticorpos anticardiolipina em doadores voluntários de banco de sangue. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter* 1998:65-8.
33. Bertolaccini ML, Khamashta MA. Laboratory diagnosis and management challenges in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2006;15(3):172-8.
34. Schmidt R, Auer-Grumbach P, Fazekas F, Offenbacher H, Kapeller P. Anticardiolipin antibodies in normal subjects. Neuropsychological correlates and MRI findings. *Stroke* 1995;26(5):749-54.
35. Galtier-Dereure F, Biron C, Vies M, Bourgeois V, Schved JF, Bringer J. Vascular complications of diabetes mellitus: what role for phospholipid-binding antibodies? *Lupus* 1998;7(7):469-74.
36. Manoussakis MN, Tzioufas AG, Silis MP, Pange PJ, Goudevenos J, Moutsopoulos HM. High prevalence of anti-cardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population. *Clin Exp Immunol* 1987;69(3):557-65.
37. Fields RA, Toubbeh H, Searles RP, Bankhurst AD. The prevalence of anticardiolipin antibodies in a healthy elderly population and its association with antinuclear antibodies. *J Rheumatol* 1989;16(5):623-5.
38. Chakravarty KK, Gray RE, Webley M, Byron MA, Wozniak J. Prevalence of anticardiolipin antibodies in the elderly British population. *Postgrad Med J* 1991;67(786):358-61.
39. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4(2):295-306.
40. Edwards CJ, Hughes GR. Hughes syndrome (the antiphospholipid syndrome): 25 years old. *Mod Rheumatol* 2008;18(2):119-24.
41. Matsuura E, Igarashi Y, Fujimoto M, Ichikawa K, Koike T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease. *Lancet* 1990;336(8708):177-8.
42. McNeil HP, Simpson RJ, Chesterman CN, Krilis SA. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(11):4120-4.
43. Keswani SC, Chauhan N. Antiphospholipid syndrome. *J R Soc Med* 2002;95(7):336-42.
44. Rosove MH, Brewer PM. Antiphospholipid thrombosis: clinical course after the first thrombotic event in 70 patients. *Ann Intern Med* 1992;117(4):303-8.
45. Bick RL, Jakway J, Baker WF, Jr. Deep vein thrombosis: prevalence of etiologic factors and results of management in 100 consecutive patients. *Semin Thromb Hemost* 1992;18(2):267-74.

46. Levine SR. Antiphospholipid syndromes and the nervous system. Clinical features, mechanisms, and treatment. *Semin Neurol* 1994;14(2):168-78.
47. Mialdea M, Sangle SR, D'Cruz DP. Antiphospholipid (Hughes) syndrome: beyond pregnancy morbidity and thrombosis. *J Autoimmune Dis* 2009;6:3.
48. Melo AMP, Ximenes AC, Baptista ML, Godoy R. Síndrome do Anticorpo Anti-Fosfolípide: Relato de Caso e Revisão de Literatura. *Estudos* 2006;33(11/12):893-901.
49. Palmer GW, Greco TP. Diabetic thigh muscle infarction in association with antiphospholipid antibodies. *Semin Arthritis Rheum* 2001;30(4):272-80.
50. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002;346(10):752-63.
51. Finazzi G, Brancaccio V, Moia M, Ciaverella N, Mazzucconi MG, Schinco PC, et al. Natural history and risk factors for thrombosis in 360 patients with antiphospholipid antibodies: a four-year prospective study from the Italian Registry. *Am J Med* 1996;100(5):530-6.
52. Escalante A, Brey RL, Mitchell BD, Jr., Dreiner U. Accuracy of anticardiolipin antibodies in identifying a history of thrombosis among patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1995;98(6):559-65.
53. Levine SR, Salowich-Palm L, Sawaya KL, Perry M, Spencer HJ, Winkler HJ, et al. IgG anticardiolipin antibody titer > 40 GPL and the risk of subsequent thrombo-occlusive events and death. A prospective cohort study. *Stroke* 1997;28(9):1660-5.
54. Terashi H, Uchiyama S, Hashimoto S, Miyazaki K, Tsutsumi Y, Yamazaki M, et al. Clinical characteristics of stroke patients with antiphospholipid antibodies. *Cerebrovasc Dis* 2005;19(6):384-90.
55. Ali HA, Osman RR, Idris MN, Sokrab TEO. Anticardiolipin antibodies in stroke patients in Sudan. *Neurosciences* 2007;12(1):21-24.
56. Morton KE, Gavaghan TP, Krilis SA, Daggard GE, Baron DW, Hickie JB, et al. Coronary artery bypass graft failure--an autoimmune phenomenon? *Lancet* 1986;2(8520):1353-7.
57. Hamsten A, Norberg R, Bjorkholm M, de Faire U, Holm G. Antibodies to cardiolipin in young survivors of myocardial infarction: an association with recurrent cardiovascular events. *Lancet* 1986;1(8473):113-6.
58. Klemp P, Cooper RC, Strauss FJ, Jordaan ER, Przybojewski JZ, Nel N. Anti-cardiolipin antibodies in ischaemic heart disease. *Clin Exp Immunol* 1988;74(2):254-7.
59. Zuckerman E, Toubi E, Shiran A, Sabo E, Shmuel Z, Golan TD, et al. Anticardiolipin antibodies and acute myocardial infarction in non-systemic lupus erythematosus patients: a controlled prospective study. *Am J Med* 1996;101(4):381-6.
60. Vaarala O, Manttari M, Manninen V, Tenkanen L, Puurunen M, Aho K, et al. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995;91(1):23-7.

61. Wu R, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Holm G, Lefvert AK. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):3159-63.
62. Muir KW. Anticardiolipin antibodies and cardiovascular disease. *J R Soc Med* 1995;88(8):433-6.
63. Vianna FJM, Castro AA, Costa AFP, Pitta GBB, Miranda FJ. Incidência de trombose venosa profunda secundária ao implante de cateter para hemodiálise: avaliação pela ultrasonografia com Doppler. *J Vasc Br* 2005;4(2):176-82.
64. Sitter T, Schiffh H. Anticardiolipin antibodies in patients on regular hemodialysis: an epiphenomenon? *Nephron* 1993;64(4):655-6.
65. Prakash R, Miller CC, 3rd, Suki WN. Anticardiolipin antibody in patients on maintenance hemodialysis and its association with recurrent arteriovenous graft thrombosis. *Am J Kidney Dis* 1995;26(2):347-52.
66. Prieto LN, Suki WN. Frequent hemodialysis graft thrombosis: association with antiphospholipid antibodies. *Am J Kidney Dis* 1994;23(4):587-90.
67. Brunet P, Aillaud MF, San Marco M, Philip-Joet C, Dussol B, Bernard D, et al. Antiphospholipids in hemodialysis patients: relationship between lupus anticoagulant and thrombosis. *Kidney Int* 1995;48(3):794-800.
68. Petri M. Pathogenesis and treatment of the antiphospholipid antibody syndrome. *Med Clin North Am* 1997;81(1):151-77.
69. Lim W, Crowther MA, Eikelboom JW. Management of antiphospholipid antibody syndrome: a systematic review. *JAMA* 2006;295(9):1050-7.
70. Tincani A, Branch W, Levy RA, Piette JC, Carp H, Rai RS, et al. Treatment of pregnant patients with antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2003;12(7):524-9.
71. Sene D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev* 2008;7(4):272-7.
72. Sociedade Brasileira de Diabetes, Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002. Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. *São Paulo* 2003.
73. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21(9):1414-31.
74. Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care* 1992;15(11):1509-16.
75. Diabetes Mellitus. Portal Banco da Saúde, 2008.

76. Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJd. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2002;46:16-26.
77. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994;331(21):1428-36.
78. Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 2000;342(5):301-7.
79. World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. *Geneva, World Health Organization.*, 1999. 59p.
80. Wilmot EG, Davies MJ, Yates T, Benhalima K, Lawrence IG, Khunti K. Type 2 diabetes in younger adults: the emerging UK epidemic. *Postgrad Med J* 2010;86(1022):711-8.
81. Bacha F, Arslanian S. Insulin resistance and insulin secretion in the pathophysiology of youth type 2 diabetes. In: Dabelea D, Klingensmith G, editors. *Epidemiology of pediatric and adolescent diabetes*. . First edition ed. New York: Informa Healthcare, 2008:139-64.
82. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997;20: 1183-97
83. Gargiulo P, Goldberg J, Romani B, Schiaffini R, Ciampalini P, Faulk WP, et al. Qualitative and quantitative studies of autoantibodies to phospholipids in diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 1999;118(1):30-4.
84. Calvo-Romero JM, Lima-Rodriguez EM. Anticardiolipin antibodies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Med Res* 2009;7(3):93-5.
85. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999;84(5):489-97.
86. Ahmed E, Nityanand S, Mustafa A, Brismar K, Lefvert AK. Anti-cardiolipin antibodies and circulating immune complexes in type 1 diabetes mellitus: increased prevalence and relation to vascular complications. *Clin Exp Immunol* 1999;115(2):255-9.
87. Lorenzo M, Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci* 2008;86(14 Suppl):E94-104.
88. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003;278(46):45777-84.
89. Guidoni C, Olivera C, Freitas O, Pereira L. Assistência ao diabetes no Sistema Único de Saúde: análise do modelo atual. *Bras Jour Pharm Sci* 2009;45(1).

90. Haffner SM. Epidemiology of type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 3:C3-6.
91. Palomo IG, Mujica VE, Alarcon ML, Pereira JG, Vasquez MR. Prevalence of antiphospholipid antibodies is not different in Chilean diabetic patients and normal individuals. *J Diabetes Complications* 2005;19(3):133-7.
92. Carter AM, Grant PJ. Vascular homeostasis, adhesion molecules, and macrovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1997;14(6):423-32.
93. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979;241(19):2035-8.
94. Rahman S, Rahman T, Ismail AA, Rashid AR. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes Obes Metab* 2007;9(6):767-80.
95. Boyle PJ. Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. *Am J Med* 2007;120(9 Suppl 2):S12-7.
96. Yorek MA. The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. *Free Radic Res* 2003;37(5):471-80.
97. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19(3):257-67.
98. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *Cardiol Rev* 2005;13(6):322-7.
99. Mafri A, Proietti R. [Atherothrombosis in patients with type 2 diabetes mellitus: an overview of pathophysiology]. *G Ital Cardiol (Rome)* 2010;11(6):467-77.
100. Borch-Johnsen K, Kreiner S. Proteinuria: value as predictor of cardiovascular mortality in insulin dependent diabetes mellitus. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;294(6588):1651-4.
101. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 1974;23(2):105-11.
102. Fuller JH, Keen H, Jarrett RJ, Omer T, Meade TW, Chakrabarti R, et al. Haemostatic variables associated with diabetes and its complications. *Br Med J* 1979;2(6196):964-6.
103. Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* 2007;3(6):853-76.
104. Mehdi AA, Uthman I, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis and a window of treatment opportunities in the future. *Eur J Clin Invest* 2010;40(5):451-64.
105. Giusti C. Are phospholipid-binding antibodies implicated in the pathogenesis of diabetic microangiopathy? *Med Hypotheses* 2004;63(2):235-8.

106. Hendra TJ, Baguley E, Harris EN, Khamashta MH, Trembath RC, Hughes GR, et al. Anticardiolipin antibody levels in diabetic subjects with and without coronary artery disease. *Postgrad Med J* 1989;65(761):140-3.
107. Triolo G, Giardina E, Scarantino G, Seddio G, Bompiani G. Detection of anti-phospholipid (cardiolipin, phosphatidylserine) antibodies in the serum of patients with non insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus and macroangiopathy. Coexistence of anti-platelet reactivity. *Diabetes Res* 1989;10(2):63-7.
108. Tarkun I, Hacıhanefioglu A, Tarkun P, Cetinarslan B, Canturk Z. Anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibody concentrations in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;68(3):181-7.
109. Krás Borges R, Bodanese L, von Mühlen C, Repetto G, Viehe M, Norman G, et al. Anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies and metabolic syndrome. *Arq Bras Cardiol* in press.
110. Ciarla MV, Bocciarelli A, Di Gregorio S, Tordi A, Cotroneo P, Marra G, et al. Autoantibodies and endothelial dysfunction in well-controlled, uncomplicated insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Atherosclerosis* 2001;158(1):241-6.

6. ARTIGO EM PORTUGUÊS

ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINA: PREVALÊNCIA EM DIABÉTICOS COM E SEM EVENTOS VASCULARES PRÉVIOS

Caroline Eickhoff Copetti¹, Myriam Perrenoud², Henrique Luiz Staub³

Serviços de Reumatologia, Cardiologia e Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.

1 Farmacêutica-bioquímica. Mestranda em Medicina e Ciências da Saúde com ênfase em Clínica Médica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

2 Doutora em Medicina e Ciências da Saúde e Mestre em Gerontologia Biomédica. Coordenadora do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS.

3 Doutor em Reumatologia e Mestre em Imunologia Clínica. Professor Adjunto de Reumatologia da Faculdade de Medicina PUCRS. Professor do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da PUCRS.

Endereço para correspondência:
Caroline Eickhoff Copetti
Rua Bento Gonçalves, 445 apto 202
CEP 98700-000 – Ijuí – Brasil
e-mail: caroleickcop@yahoo.com.br

RESUMO

A relação entre anticorpos anticardiolipina (aCL), marcadores da síndrome antifosfolípide, e vasculopatia em diabéticos é matéria de debate. Este estudo, transversal controlado, avaliou a frequência de IgG, IgM e IgA aCL em diabéticos do tipo 2 com ou sem eventos vasculares nos últimos 5 anos e em controles saudáveis. Os anticorpos foram detectados por ensaio imunoenzimático. Setenta e três diabéticos (33 com eventos vasculares prévios) e 54 controles foram estudados. Diabéticos foram predominantemente mulheres ($p=0,003$), e de idade mais avançada ($p<0,001$) em relação aos controles. A duração média da doença foi de 10 anos. A prevalência de teste positivo para anticorpos aCL foi de 7,4% em controles e de 9,5% em diabéticos ($p=0,910$). Após ajuste para sexo e idade, a frequência de anticorpos aCL não diferiu significativamente quando se comparou controles e diabéticos com ou sem macrovasculopatia ($p>0,09$). A frequência de anticorpos aCL também não diferiu quando se comparou os dois grupos de diabéticos entre si ($p>0,47$). Após ajuste para sexo, idade, hipertensão e tabagismo, uma associação fraca, mas estatisticamente insignificante, foi

observada entre IgM aCL e diabéticos com vasculopatia (OR ajustado 2,7; IC95% 0,2-34,2; $p=0,441$). Globalmente, níveis de IgG ($r=0,25$; $p=0,005$) e IgM ($r=0,23$; $p=0,010$) aCL se correlacionaram com idade progressiva. Em resumo, a frequência de teste positivo para anticorpos aCL em diabéticos tipo 2 (com ou sem histórico vascular) não foi significativa em relação a controles sadios. Não houve associação entre presença de anticorpos aCL e eventos vasculares em diabéticos tipo 2.

Palavras-Chaves: anticorpos anticardiolipina, diabetes melitus tipo 2, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral.

ABSTRACT

The relationship between anticardiolipin antibodies (ACA), markers of the antiphospholipid syndrome, and vascular complications of diabetes is a matter of debate. This cross-sectional study assessed the frequency of IgG, IgM, and IgA-ACA in type 2 diabetics with or without history of vascular events in the last 5 years and in healthy controls. Antibodies were detected by enzyme immunoassay. A total of 73 type 2 diabetics (33 with history of vascular events) and 54 healthy controls were tested. Most diabetics were female ($p = 0.003$), and older than controls ($p < 0.001$). Mean duration of disease was 10 years. The prevalence of a positive ACA test was 7.4% in controls and 9.5% in diabetics ($p = 0.910$). Comparison of healthy controls and diabetics with or without history of macrovasculopathy, after adjusting for gender and age, showed no significant differences in ACA positivity ($p > 0.09$). ACA positivity rates were also similar when diabetics with or without recent history of vascular events were compared ($p > 0.47$). After adjusting for gender, age, hypertension, and smoking status, a weak but statistically nonsignificant association was found between IgM-ACA and vasculopathy in diabetics (adjusted OR 2.7; 95%CI 0.2 – 34.2; $p = 0.441$). Overall, levels of IgG ($r = 0.25$; $p = 0.005$) and IgM ($r = 0.23$; $p = 0.010$) ACA were associated with advancing age. In short, the frequency of positive ACA test in type 2 diabetics (with or without previous vascular events) was not significant as compared to healthy controls. There was no association between ACA and vascular events in patients with type 2 diabetes.

Keywords: anticardiolipin antibodies, type 2 diabetes mellitus, myocardial infarction, cerebrovascular infarction.

INTRODUÇÃO

Anticorpos anticardiolipina (aCL), assim como o anticoagulante lúpico e os anticorpos contra beta2-glicoproteína I (beta2-gpI), são marcadores clássicos da síndrome antifosfolipídica (SAF), diátese trombótica autoimune típica de adultos jovens. Nos dias atuais, a SAF primária é considerada a mais freqüente das trombofilias adquiridas¹. Anticorpos aCL e SAF são focos de interesse de um grande número de especialidades clínicas e cirúrgicas.

Nosso grupo recentemente documentou uma associação definida entre anticorpos IgA contra beta2-gpI (cofator fosfolipídico de ação anticoagulante) e doença isquêmica cerebral², coronária³, carotídea⁴ e periférica⁵. Em somente um destes estudos⁵, anticorpos aCL (no caso o isotipo IgA) se associaram ao desfecho. A relação de anticorpos aCL com eventos isquêmicos em diabéticos não tinha sido abordada por nosso grupo até então, e é motivo de polêmica na literatura.

O diabetes mellitus (DM) é uma entidade metabólica caracterizada por hiperglicemia persistente e dano multiorgânico. A freqüência de DM cresce em proporções alarmantes neste século, especialmente em países em desenvolvimento⁶. Estima-se que 12% da população brasileira (cerca de 22 milhões de pessoas) seja acometida pela doença⁷. Há um aumento relativo da freqüência de DM tipo 2 em adultos jovens, justificável por características genéticas, sedentarismo e hábitos alimentares inadequados⁸.

O DM constitui fator de risco independente para doença aterosclerótica, mas a etiopatogenia das complicações micro e macrovasculares ainda não está totalmente elucidada⁹. Complicações macrovasculares, como as que afetam as circulações coronária e cerebral, compõem a principal causa de mortalidade em diabéticos¹⁰⁻¹¹.

O DM tipo 2, foco de nosso estudo, é caracterizado por resistência à ação da insulina e por uma associação definida com a obesidade. Dados recentes apontam para um papel primordial de citocinas (principalmente o fator de necrose tumoral, produto do adipócito e de outras células do sistema imune) na gênese da resistência à insulina¹². Níveis elevados das interleucinas 6 e 8 não são raros em pacientes com DM tipo 2, e o papel desta citocinas na resistência à insulina é também reivindicado nos dias de hoje¹³.

Embora eventualmente descritos em infecções como sífilis, hanseníase, aids e hepatites virais¹⁴, anticorpos aCL estão historicamente atrelados aos fenômenos tromboembólicos vistos na SAF¹⁵. De interesse atual, anticorpos aCL induzem ativação de plaquetas, células endoteliais, monócitos, do sistema do complemento e da via da coagulação, com resultante tendência trombofílica¹⁶. O papel deste interessante grupo de autoanticorpos na gênese ou perpetuação dos eventos isquêmicos próprios do paciente diabético é ainda nebuloso.

Per si, a geração de produtos glicados que decorre do estado hiperglicêmico é capaz de gerar inflamação arterial e hipercoagulabilidade¹⁷. O estresse oxidativo é definitivamente aumentado em diabéticos, e provavelmente decorre de auto-oxidação da glicose¹⁸. Altas glicemias levam à síntese de ânions superóxidos por células endoteliais, o que inibe a função vasodilatadora do óxido nítrico. Estabelece-se, então, uma ruptura na homeostase vascular nestes pacientes¹⁹. Ainda assim, é de interesse a avaliação do papel de fenômenos autoimunes, incluindo-se aqui os anticorpos aCL, na injúria vascular vista nesta afecção.

A prevalência de anticorpos aCL em pacientes diabéticos tem sido pouco abordada na literatura recente, e os resultados não são uniformes. No presente estudo, avaliamos a frequência de IgG, IgM e IgA aCL em uma população brasileira com DM tipo 2 (com ou sem história de eventos vasculares) e em controles saudáveis. Uma eventual associação entre anticorpos aCL e histórico de vasculopatia em diabéticos foi também investigada.

MATERIAL E MÉTODOS

População

Este estudo, transversal controlado, incluiu pacientes com DM tipo 2 atendidos em unidades de saúde do município de Ijuí/RS mediante consentimento informado próprio ou de parente próximo. Estas unidades acompanham os pacientes diabéticos em reuniões e consultas mensais. Os indivíduos selecionados para o estudo obrigatoriamente deveriam ter 50 anos ou mais, e mais de cinco anos de diagnóstico de DM de acordo com os critérios tradicionais²⁰. Todos os pacientes foram submetidos a uma entrevista que abordou os

principais aspectos de suas condições de saúde. Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico²¹ e SAF²² foram excluídos.

Os pacientes diabéticos foram divididos em dois grupos. O grupo I incluiu pacientes que apresentaram eventos vasculares como infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral isquêmico (AVCi) nos últimos 5 anos. O diagnóstico de IAM foi confirmado por achados clínicos, eletrocardiograma, enzimas cardíacas e exame de imagem quando necessário; o diagnóstico de (AVCi) foi estabelecido através de achados clínicos e exames de imagem cerebral. Estes dados foram obtidos através de prontuários médicos. O grupo II foi composto por diabéticos tipo 2 sem evento vascular prévio. O grupo-controle, incluído para estimativa da ocorrência de aCL na população geral, consistiu-se de doadores de sangue entre 50 e 65 anos de idade.

Dados clínicos e demográficos foram obtidos mediante preenchimento de ficha cadastral durante entrevista com pacientes e seus familiares, sendo consideradas as seguintes características: 1) idade; 2) sexo; 3) tempo de diagnóstico confirmado de diabetes; 4) tabagismo ativo (≥ 5 cigarros/dia²³ por mais de 30 dias)²⁴ ou história de hábito tabágico²⁵; 4) história de hipertensão arterial sistêmica (HAS)²⁶; 5) histórico de doença vascular. Todas as informações foram confirmadas mediante entrevista ou pesquisa em prontuário médico.

Amostra

Amostras de sangue foram coletadas de veia periférica, centrifugadas e congeladas até 2 horas após a coleta. Subseqüentemente, foram armazenadas à temperatura de -70°C para posterior testagem. Anticorpos aCL de isotipos IgG, IgM e IgA foram quantificados por ensaio imunoenzimático (ORGENTEC Diagnostika GmbH – Anti-Cardiolipin) em placas de fase sólida²⁷⁻²⁹. Na primeira etapa da reação, amostras diluídas dos pacientes foram incubadas em poços contendo cardiolipina. Tampões contendo o cofator beta2-gp1 foram utilizados³⁰. Uma segunda incubação incluiu a adição de anticorpos anti-IgG, anti-IgM e anti-IgA humana conjugados com peroxidase. Após adição de cromogêneo, a intensidade da cor produzida foi proporcional à concentração de anticorpos aCL na amostra³¹⁻³². A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro. Posteriormente, foi traçada a curva de calibração para obtenção das concentrações de anticorpos aCL IgG, IgM e IgA. Títulos foram considerados positivos quando acima de 10 GPL para IgG aCL, 10 MPL para IgM aCL e 7 unidades/mL para IgA aCL.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas da PUCRS.

Análise de dados

Os dados foram digitados no programa EXCEL e exportados para o SPSS v. 17.0 para análise estatística. As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão quando a distribuição foi simétrica; estas foram comparadas pelo teste t de Student para amostras independentes. Quando a distribuição foi assimétrica, as variáveis foram descritas pela mediana e o intervalo interquartil.

As variáveis categóricas foram descritas por frequência e percentuais, e comparadas pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates. Quando possível, foram obtidas razões de chances (odds ratios, OR) com intervalo de confiança de 95% para avaliar força de associação entre variáveis. A escala de Hopkins para estratificação de OR foi utilizada como segue: um OR de 1-1.5 foi considerado trivial; entre 1.5-3,5 como fraco; entre 3.5-9 como moderado; entre 9-32 como forte; e acima de 32 como muito forte³³. Quando necessária, correção de Agresti³⁴ foi empregada para obtenção de OR não-ajustados. Para associar variáveis quantitativas foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Ajustes para potenciais fatores de confusão foram procedidos através de regressão logística. Foi considerado um nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Foram arrolados 73 pacientes diabéticos e 54 controles para o nosso estudo. A Tabela 1 descreve os dados demográficos e os níveis de anticorpos aCL nos dois grupos. Controles e diabéticos diferiram de forma significativa quanto à idade (diabéticos com idade mais avançada) e sexo (predomínio do sexo feminino nos diabéticos). Cerca de 15% dos diabéticos eram hipertensos, e aproximadamente um quarto deles apresentavam histórico de tabagismo. A duração média da doença em diabéticos foi de uma década. Em termos gerais, a positividade para anticorpos aCL foi baixa em controles e diabéticos (7,4% e 9,5% respectivamente), sem variação estatisticamente significativa entre os dois grupos. Um entre os 11 indivíduos aCL-positivos (9,1%) apresentou nível alto do anticorpo (acima de 40 unidades): um diabético sem evento vascular com 45 unidades de IgA aCL (14,3% dos diabéticos). Os outros 10 indivíduos aCL-positivos (90,9%) apresentaram níveis baixos do

anticorpo (abaixo de 40 unidades). Uma associação moderada, estatisticamente insignificante, entre IgM aCL e DM foi observada. Positividade para IgG e IgA aCL foi mais frequente em controles, mas o dado também não foi estatisticamente significativo. Após ajuste para sexo e idade, não houve associação entre estes isotipos e ocorrência do desfecho.

Tabela 1: Características demográficas dos controles sadios e dos indivíduos com diabetes mellitus.

	Controles Sadios (n = 54)	Diabéticos (n = 73)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	OR Ajustado ^b (IC 95%)	<i>p</i> ^c
Idade (anos)	54.8 ± 4.3	67.0 ± 9.8	< 0.001	1.3 (1.2 – 1.4) ^a	NC	NC
Sexo feminino	21 (38.9%)	49 (67.1%)	0.003	3.2 (1.5 – 6.7) ^a	NC	NC
HAS	-	11 (15.1%)	NC	NC	NC	NC
Histórico de hábito tabágico	-	19 (26.0%)	NC	NC	NC	NC
Duração da doença(anos)	-	10 (6–12)	NC	NC	NC	NC
aCL positivo (total)	4 (7.4%)	7 (9.5%)	0.910	1.3 (0.3 – 5.8)	NC	NC
IgG aCL positivos	1 (1.9%)	1 (1.4%)	0.999	0.7 (0.05 – 12.0)	0.2 (0.001 – 20.9)	0.458
IgM aCL positivos	0	4 (5.5%)	0.136	3.9 (0.4 – 34.6) ^a	NC	NC
IgA aCL positivos	3 (5.6%)	2 (2.7%)	0.650	0.5 (0.08 – 3.0)	0.5 (0.05 – 6.0)	0.608

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; n: número amostral; ^acorreção de Agresti; ^bOR: *odds ratio* ajustado para sexo e idade; variáveis quantitativas com distribuição simétrica: média ± dp, comparadas pelo teste *t* de Student para amostras independentes; variáveis quantitativas com distribuição assimétrica: mediana (intervalo interquartil P25-P75); variáveis categóricas: n(%), comparadas pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates; NC: não calculado; ^cvalor ajustado para sexo e idade após regressão logística.

A Tabela 2 categoriza controles sadios e diabéticos com evento vascular prévio (grupo I) de acordo com variáveis demográficas e níveis de aCL. As duas populações diferiram de forma significativa quanto à média de idade (diabéticos com mais idade), mas foram homogêneas quanto a sexo. A positividade para IgG e IgA aCL não variou de forma significativa entre os grupos. Uma associação moderada, mas também estatisticamente insignificante, entre IgM aCL e diabéticos com macrovasculopatia prévia foi documentada.

Tabela 2: Variáveis demográficas e frequência de anticorpos aCL em controles sadios e diabéticos com evento vascular prévio.

	Controles (n = 54)	Diabéticos com evento vascular (Grupo I) (n = 33)	p	OR (IC 95%) ^d
Idade (anos) ^a	54.8 ± 4.25	68.2 ± 10.65	0.001 ^b	1.3 (1.1 – 1.4)
Sexo Feminino	21 (38.9%)	16 (48.5%)	0.512 ^c	1.5 (0.6 – 3.5)
IgG aCL positivos	1 (1.9%)	0	0.999 ^c	0.8 (0.07 – 9.1)
IgM aCL positivos	0	3 (9.1%)	0.099 ^c	7.1 (0.8 – 66.3)
IgA aCL positivos	3 (5.6%)	0	0.440 ^c	0.4 (0.04 – 3.6)

n: número amostral; ^a DP - Desvio Padrão; ^b teste *t* de Student; ^c teste do qui-quadrado; ^d correção de Agresti.

A Tabela 3 categoriza controles e diabéticos sem evento vascular prévio (grupo II) quanto a variáveis demográficas e níveis de aCL. Os dois grupos diferiram significativamente quanto à média de idade (diabéticos com mais idade) e sexo (predomínio de mulheres no grupo de diabéticos). Uma associação fraca e estatisticamente insignificante entre IgM aCL e DM sem dano vascular foi observada. Após ajuste para sexo e idade, não houve associação entre teste positivo para IgG ou IgA aCL e DM sem evento vascular.

Tabela 3. Variáveis demográficas e frequência de anticorpos aCL em controles sadios e diabéticos sem evento vascular prévio.

	Controles n = 54	Diabéticos sem evento vascular (Grupo II) n = 40	p	OR (IC 95%)	OR Ajustado ^e (IC 95%)	p ^f
Idade (anos) ^a	54.8 (± 4.25)	65,9 (± 9.10)	0.001 ^b	1.3 (1.2 – 1.5) ^d	NC	NC
Sexo feminino	21 (38.9%)	33 (82.5%)	0.001 ^c	7.4 (2.8 – 19.8) ^d	NC	NC
IgG aCL positivos	1 (1.9%)	1 (2.5%)	0.999 ^c	1.4 (0.08 – 22.4)	0.3(0.001– 54.6)	0.621
IgM aCL positivos	0	1 (2.5%)	0.880 ^c	2.8 (0.2 – 31.4) ^d	NC	NC
IgA aCL positivos	3 (5.6%)	2 (5.0%)	0.999 ^c	0.9 (1.0 – 5.6)	1.8 (0.1 – 23.1)	0.660

n: número amostral; ^a DP - Desvio Padrão; ^b teste *t* de Student; ^c teste do qui-quadrado; ^d correção de Agresti; ^e ajuste para sexo e idade; NC: não calculado; ^f teste do qui-quadrado após ajuste para sexo e idade.

Quando comparamos os dois grupos de pacientes diabéticos entre si (Tabela 4), observamos que a média de idade foi uniforme. O sexo feminino predominou significativamente no grupo sem eventos vasculares (grupo II). A ocorrência de HAS e tabagismo (ativo ou histórico de) foi similar nos dois grupos. A frequência de teste positivo para IgG e IgA aCL não diferiu significativamente entre os grupos. Após ajuste para sexo, idade, HAS e tabagismo, notou-se uma associação fraca entre IgM aCL e DM com evento vascular prévio; o dado, entretanto, não foi de significância estatística.

Tabela 4. Variáveis demográficas e frequência de anticorpos aCL nos dois grupos de diabéticos

	Diabéticos com evento vascular (Grupo I) n = 33	Diabéticos sem evento vascular (Grupo II) n = 40	<i>p</i>	OR (IC 95%)	OR Ajustado ^e (IC 95%)	<i>p</i>
Idade (anos) ^a	68.2 (± 10.65)	65.9 (± 9.1)	0.331 ^b	1.0 (0.9 – 1.1) ^d	NC	NC
Sexo feminino	16 (48.5%)	33 (82.5%)	0.005 ^c	0.2 (0.1 – 0.6) ^d	NC	NC
HAS	29 (87.9%)	33 (82.5%)	0.744 ^d	1.5 (0.4 – 5.8) ^d	NC	NC
Histórico de hábito tabágico	8 (24.2%)	11 (27.5%)	0.962	0.8 (0.3 – 2.4) ^d	NC	NC
aCL IgG positivos	0	1 (2.5%)	0.999 ^c	0.6 (0.05– 6.8) ^d	NC	NC
aCL IgM positivos	3 (9.1%)	1 (2.5%)	0.475 ^c	3.9 (0.4 – 39.4)	2.7 (0.2 – 34.2)	0.441
aCL IgA positivos	0	2 (5.0%)	0.560 ^c	0.4(0.04 – 3.9) ^d	NC	NC

HAS: Hipertensão arterial sistêmica; n: número amostral; ^a DP - Desvio Padrão; ^b teste *t* de Student; ^c teste do qui-quadrado; ^d correção de Agresti; ^e ajuste para sexo, idade, HAS e tabagismo; NC: não calculado.

A figura 1 mostra a relação entre os níveis de anticorpos aCL e idade na população geral de nosso estudo. Houve uma correlação estatisticamente significativa, porém fraca, entre os níveis de IgG ($r=0,25$; $p=0,005$) e IgM ($r=0,23$; $p=0,010$) aCL com idade progressiva. Esta correlação não foi documentada para IgA aCL ($r=0,08$; $p=0,360$).

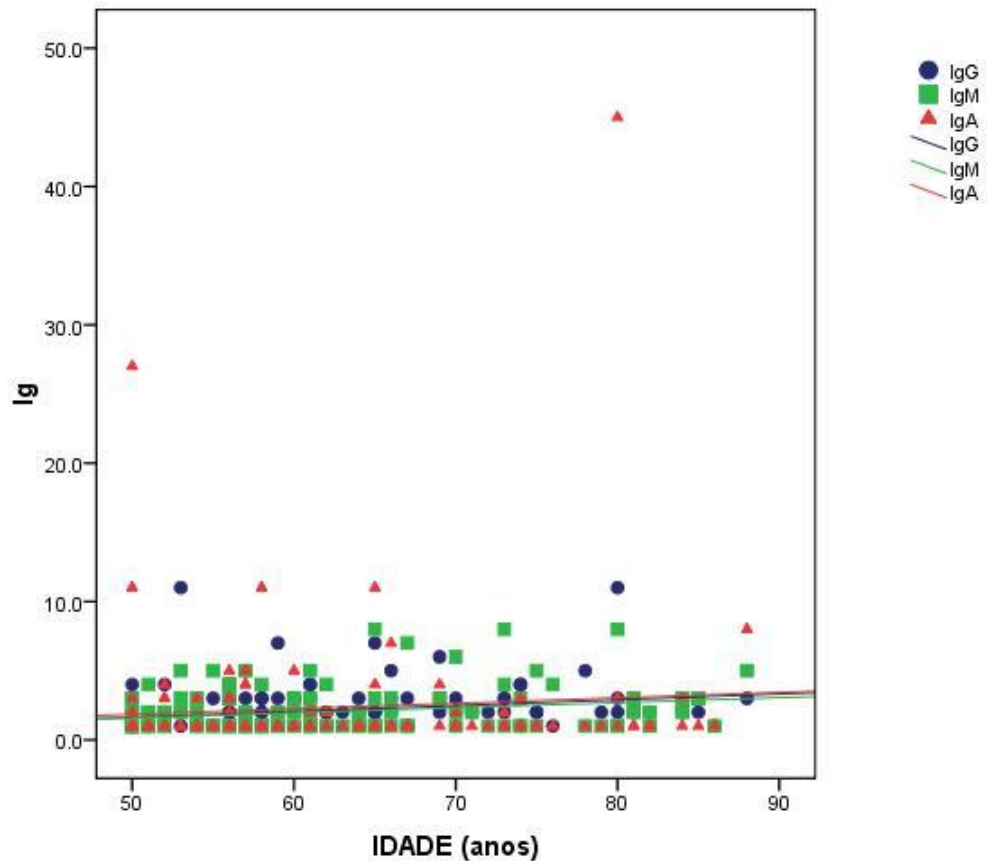


Figura 1. Relação entre níveis de aCL e idade. Gráfico de dispersão de pontos da relação entre os valores quantitativos de aCL e idade.

DISCUSSÃO

A relação entre anticorpos aCL e eventos vasculares em diabéticos é matéria de debate. Este é, provavelmente, o primeiro estudo brasileiro a abordar este binômio. Os pacientes selecionados para o estudo freqüentam uma unidade de saúde municipal de uma cidade média do interior do Rio Grande do Sul, Brasil. Neste cenário, os pacientes diabéticos atendem reuniões e consultas em caráter mensal, o que facilitou a organização da casuística.

No intuito de responder à questão basilar do estudo (uma eventual associação entre anticorpos aCL e evento vascular em diabéticos), a decisão foi a de homogeneizar a amostra em torno de pacientes com DM tipo 2, considerando-se a maior freqüência desta afecção em relação a do tipo 1³⁵. Todos os diabéticos tipo 2 da unidade de saúde com no mínimo 5 anos de doença e que concordaram em participar do estudo foram incluídos. A

partir desta escolha, a dicotomização em pacientes com histórico ou não de eventos vasculares (IAM, AVCi) representou uma seqüência natural na metodologia do estudo.

O diagnóstico do evento vascular (arbitrariamente considerados nos últimos 5 anos) se baseou em dados de entrevista e prontuário. Somente eventos macrovasculares definidos por critérios absolutos (IAM e AVCi) foram considerados, o que pode ter limitado a seleção de casos e as conclusões do estudo.

O grupo-controle, de doadores de sangue não-diabéticos, não pôde ser idealmente pareado por sexo e idade. Estatisticamente, estas variáveis diferiram de forma significativa quando comparadas à da população diabética (controles foram mais jovens, e com predomínio masculino). Quando se analisou graus de positividade para anticorpos aCL, ajustes para sexo e idade foram procedidos sempre que possível.

O grupo de diabéticos foi predominantemente feminino, com média de idade de 67 anos e com duração moderada de doença (ao redor de uma década). Um quarto da população diabética era tabagista, e 15% era hipertensa. Uma vez que a prevalência de HAS e tabagismo não pôde ser avaliada em controles (inviabilizando o ajuste estatístico), uma influência destas variáveis nos níveis de anticorpos aCL em diabéticos não pode ser descartada. Apenas um (9,1%) dos 11 indivíduos com teste positivo o fez em concentrações acima de 40 unidades (um diabético sem evento vascular). Conceitualmente^{22,36}, então, titulações baixas foram quase que a regra em nossa casuística aCL-positiva. Apenas um dos 7 diabéticos (e este não apresentava histórico vascular) apresentou níveis altos de anticorpos aCL.

Em termos gerais, a freqüência de teste positivo para anticorpos aCL foi baixa em controles e diabéticos (7,4% e 9,5%, respectivamente), sem variação significativa entre os grupos. Embora o OR bruto sugira uma associação moderada de IgM aCL com DM, os IC95% foram inconfiáveis e o dado não alcançou significância estatística. Os OR ajustados para sexo e idade para IgG e IgA aCL (0,2 e 0,5 respectivamente) sugerem que positividade para estes isotipos aCL seja até mesmo protetora para DM. Entretanto, os intervalos de confiança foram inconfiáveis e estes dados foram desprovidos de significância estatística. De interesse, Hendra *et al*, em estudo controlado, documentaram freqüência aumentada de IgG aCL (níveis baixos) em diabéticos com ou sem coronariopatia.³⁷ Gargiulo *et al*, por sua vez,

reportaram níveis elevados de IgA contra o fosfolípide neutro fosfatidiletanolamina, mas não anticorpos aCL, em diabéticos do tipo 1 ou 2 comparativamente a controles³⁸.

Quando comparamos diabéticos com macrovasculopatia e controles, os grupos diferiram quanto à média de idade, mas foram uniformes quanto ao sexo. Não houve diferença significativa quanto à frequência de teste positivo para anticorpos IgG e IgA aCL. Uma associação moderada entre IgM aCL e DM com vasculopatia, sugerida pelo OR bruto, não se confirmou estatisticamente. Em diabéticos tipo 1, diferentemente, Ahmed *et al* reportaram prevalência aumentada de IgG e IgA aCL em diabéticos com vasculopatia em relação a controles sadios. Na comparação direta com diabéticos não-complicados, a diferença nos níveis de aCL foi insignificante, entretanto. Um teste positivo para IgM aCL foi mais freqüente em diabéticos com angiopatia do que em controles, mas este dado foi, semelhantemente ao nosso estudo, estatisticamente insignificante³⁹.

Na comparação de diabéticos sem histórico vascular e controles, não houve, após ajuste para sexo e idade, associação entre IgG e IgA aCL com o desfecho. A estimativa bruta do OR sugeriu associação fraca de IgM aCL com DM não-complicado, mas o dado foi desprovido de significância estatística. Em concordância com nossos achados, a prevalência de anticorpos aCL no DM não-complicado foi irrelevante em estudo prévio⁴⁰. A partir destes dados, infere-se que o comportamento biológico de anticorpos aCL no DM tipo 2 não-complicado e em controles sadios é semelhante.

Na comparação dos dois grupos de diabéticos entre si, ajustes para sexo, idade, tabagismo e hipertensão foram procedidos. Uma associação fraca entre IgM aCL e DM com evento vascular prévio foi sugerida pelo OR ajustado; este dado, uma vez mais, não foi de significância estatística. Digno de nota, uma frequência significativamente maior de aCL foi relatada em diabéticos tipo 1 e 2 com macroangiopatia e nefropatia em relação a pacientes com doença não-complicada ou controlada⁴⁰. Outros autores reportaram, em 1989, uma prevalência aumentada de IgG e IgA aCL na população diabética tipo 2 com eventos macrovasculares⁴¹.

No presente estudo, a prevalência de autoanticorpos aCL em controles de banco de sangue foi de 1,9% para IgG, nula para IgM e de 5,6% para IgA aCL. Considerando que o ensaio imunoenzimático contempla ligações inespecíficas da IgM com a placa de poliestireno com alguma frequência⁴², foi chamativa a frequência zero de IgM aCL em nossos controles.

Em oposição a este achado, a prevalência de IgA aCL foi alta em doadores de sangue, sobrepujando a da nossa população diabética (embora de maneira estatisticamente insignificante). É possível que, no imunoensaio empregado em nosso estudo, ligações inespecíficas para IgA tenham ocorrido, ou que eventuais morbidades clínicas nos controles expliquem este achado. A prevalência de anticorpos aCL em controles sadios foi de 2,5%, de acordo com Petri *et al*⁴³. Em estudo de 2004, a positividade em controles foi de 2,5% para IgG e de 3,1% para IgM aCL⁴⁴. Dados brasileiros apontam para uma frequência de títulos baixos de aCL em 6% e de títulos altos em 1% dos indivíduos saudáveis⁴⁵.

Documentamos uma correlação fraca, porém estatisticamente significativa, de IgG e IgM aCL com idade progressiva em nosso estudo. Este achado é concordante com o estudo de Fields *et al* de 1989, onde IgG e IgM aCL foram detectados em 12% dos idosos saudáveis e em 2% de indivíduos mais jovens⁴⁶. Em contraste com estes achados, outros autores reportaram que a ocorrência de positividade para anticorpos aCL em idosos foi insignificante e similar à da população mais jovem⁴⁷.

Em termos globais, nossos achados acerca da frequência de anticorpos aCL em diabéticos não foram relevantes em comparação a controles sadios. Uma baixa frequência de anticorpos aCL foi vista indistintamente em diabéticos complicados ou não por eventos vasculares. Nossos dados, embora limitados pelo número amostral, caracterização clínica dos controles e dificuldades nos ajustes estatísticos, sugerem que um papel patogênico para anticorpos aCL na macroangiopatia diabética é pouco provável. Estes achados reforçam os de estudos anteriores, como o de Tarkun *et al*, que desvincula anticorpos aCL e anti-beta2-gpI da patogênese das complicações vasculares do DM tipo 2⁴⁸.

Nosso grupo recentemente avaliou a frequência de anticorpos aCL e anti-beta2-gpI em pacientes com síndrome metabólica. Enquanto o isotipo IgA anti-beta2-gpI se associou com a ocorrência do desfecho, o mesmo não foi observado para quaisquer dos isotipos aCL. Infere-se então que, de forma similar à relatada para DM tipo 2 no presente estudo, a ocorrência de aCL parece não estar associada à síndrome metabólica⁴⁹. Também recentemente, e em contra-argumento, postulou-se que associação entre anticorpos aCL e disfunção endotelial seja sinérgica para o deflagramento de vasculopatia precoce em diabéticos insulino-dependentes⁵⁰. Estes dados, em conjunto, espelham um intrigante debate acerca do papel dos anticorpos aCL na vasculopatia diabética.

Em resumo, a frequência de anticorpos aCL em diabéticos tipo 2 (com ou sem histórico vascular) não foi significativa comparativamente a controles em nosso estudo. Não houve, tampouco, associação entre presença de anticorpos aCL e diabetes tipo 2 complicado por macroangiopatia. A ocorrência em níveis baixos na maioria dos pacientes sugere que anticorpos aCL possam ser epifenômenos no DM. A relação entre anticorpos aCL e eventos vasculares em diabéticos deve ser ampliada em estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Edwards CJ, Hughes GR. Hughes syndrome (the antiphospholipid syndrome): 25 years old. *Mod Rheumatol* 2008;18(2):119-24.
2. Staub HL, Norman GL, Crowther T, da Cunha VR, Polanczyk A, Bohn JM, et al. Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein I and heat-shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61(3B):757-63.
3. Ranzolin A, Bohn JM, Norman GL, Manenti E, Bodanese LC, von Muhlen CA, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies as risk factors for acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol* 2004;83(2):141-4; 37-40.
4. Franck M, Staub HL, Petracco JB, Norman GL, Lassen AJ, Schiavo N, et al. Autoantibodies to the atheroma component beta2-glycoprotein I and risk of symptomatic peripheral artery disease. *Angiology* 2007;58(3):295-302.
5. Recuero ML, Silva JB, Norman GL, von Muhlen CA, Staub HL. IgA antibodies to beta2-glycoprotein I and carotid disease. *Isr Med Assoc J* 2007;9(6):495-6.
6. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21(9):1414-31.
7. Diabetes Mellitus. Portal Banco da Saúde, 2008.
8. Wilmot EG, Davies MJ, Yates T, Benhalima K, Lawrence IG, Khunti K. Type 2 diabetes in younger adults: the emerging UK epidemic. *Postgrad Med J* 2010;86(1022):711-8.
9. Palomo IG, Mujica VE, Alarcon ML, Pereira JG, Vasquez MR. Prevalence of antiphospholipid antibodies is not different in Chilean diabetic patients and normal individuals. *J Diabetes Complications* 2005;19(3):133-7.
10. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979;241(19):2035-8.
11. Carter AM, Grant PJ. Vascular homeostasis, adhesion molecules, and macrovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1997;14(6):423-32.

12. Lorenzo M, Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci* 2008;86(14 Suppl):E94-104.
13. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003;278(46):45777-84.
14. Sene D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev* 2008;7(4):272-7.
15. Gezer S. Antiphospholipid syndrome. *Dis Mon* 2003;49(12):696-741.
16. Mehdi AA, Uthman I, Khamashta M. Antiphospholipid syndrome: pathogenesis and a window of treatment opportunities in the future. *Eur J Clin Invest* 2010;40(5):451-64.
17. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999;84(5):489-97.
18. Yorek MA. The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. *Free Radic Res* 2003;37(5):471-80.
19. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19(3):257-67.
20. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *Cardiol Rev* 2005;13(6):322-7.
21. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
22. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006;4(2):295-306.
23. Piegas LS, Avezum A, Pereira JC, Neto JM, Hoepfner C, Farran JA, et al. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. *Am Heart J* 2003;146(2):331-8.
24. Dias-Júnior SA, Pinto RC, Angelini L, Fernandes FLA, Cukier A, Stelmach R. Prevalência de tabagismo ativo e passivo em uma população de asmáticos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2009;35:261-65.
25. Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernandez-Cruz A. Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev* 2004;5(2):95-103.
26. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003;289(19):2560-72.

27. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 1987;46(1):1-6.
28. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR. Anti-phospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 1985;11(3):591-609.
29. Harris EN. Solid-phase anti-cardiolipin test revisited. *Am J Med* 1988;85(5):599-601.
30. Chamley LW, McKay EJ, Pattison NS. Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies. *Thromb Res* 1991;61(3):291-9.
31. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987;68(1):215-22.
32. Brown RD, Gibson J, Wells J, Jun R, Rickard K, Kronenberg H. Human cardiolipin as the antigen in an ELISA to detect anticardiolipin antibodies. *Br J Rheumatol* 1989;28(2):109-12.
33. Hopkins WG. A new view of statistics. Disponível em: <http://www.sportsci.org/resource/stats/index>.
34. Agresti A. On logit confidence intervals for the odds ratio with small samples. *Biometrics* 1999;55(2):597-602.
35. Haffner SM. Epidemiology of type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care* 1998;21 Suppl 3:C3-6.
36. Tincani A, Casu C, Cartella S, Ziglioli T, Cattaneo R. [Antiphospholipid antibody: laboratory, pathogenesis and clinical manifestations]. *Reumatismo* 2010;62(1):65-75.
37. Hendra TJ, Baguley E, Harris EN, Khamashta MH, Trembath RC, Hughes GR, et al. Anticardiolipin antibody levels in diabetic subjects with and without coronary artery disease. *Postgrad Med J* 1989;65(761):140-3.
38. Gargiulo P, Goldberg J, Romani B, Schiaffini R, Ciampalini P, Faulk WP, et al. Qualitative and quantitative studies of autoantibodies to phospholipids in diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 1999;118(1):30-4.
39. Ahmed E, Nityanand S, Mustafa A, Brismar K, Lefvert AK. Anti-cardiolipin antibodies and circulating immune complexes in type 1 diabetes mellitus: increased prevalence and relation to vascular complications. *Clin Exp Immunol* 1999;115(2):255-9.
40. Galtier-Dereure F, Biron C, Vies M, Bourgeois V, Schved JF, Bringer J. Vascular complications of diabetes mellitus: what role for phospholipid-binding antibodies? *Lupus* 1998;7(7):469-74.
41. Triolo G, Giardina E, Scarantino G, Seddio G, Bompiani G. Detection of anti-phospholipid (cardiolipin, phosphatidylserine) antibodies in the serum of patients with non insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus and macroangiopathy. Coexistence of anti-platelet reactivity. *Diabetes Res* 1989;10(2):63-7.

42. Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN. Testing for antiphospholipid antibodies: problems and solutions. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(1):48-57; quiz 58-9.
43. Petri M, Rheinschmidt M, Whiting-O'Keefe Q, Hellmann D, Corash L. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. A study of sixty consecutive patients by activated partial thromboplastin time, Russell viper venom time, and anticardiolipin antibody level. *Ann Intern Med* 1987;106(4):524-31.
44. Al Jabri AA, Al Buloshi MS. Anticardiolipin and antinuclear antibodies in the adult healthy Omani individuals. *Saudi Med J* 2004;25(3):313-7.
45. Godoy JMP, Lúpino PL, Souza DRS, Parma AHC, Angulo IL, Godoy MF. Prevalência de anticorpos anticardiolipina em doadores voluntários de banco de sangue *Bol Soc Bras Hematol Hemoter* 1998:65-8
46. Fields RA, Toubbeh H, Searles RP, Bankhurst AD. The prevalence of anticardiolipin antibodies in a healthy elderly population and its association with antinuclear antibodies. *J Rheumatol* 1989;16(5):623-5.
47. Chakravarty KK, Gray RE, Webley M, Byron MA, Wozniak J. Prevalence of anticardiolipin antibodies in the elderly British population. *Postgrad Med J* 1991;67(786):358-61.
48. Tarkun I, Hacıhanefioglu A, Tarkun P, Cetinarslan B, Canturk Z. Anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibody concentrations in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;68(3):181-7.
49. Krás Borges R, Bodanese L, von Mühlen C, Repetto G, Viehe M, Norman G, et al. Anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies and metabolic syndrome. *Arq Bras Cardiol* in press.
50. Ciarla MV, Bocciarelli A, Di Gregorio S, Tordi A, Cotroneo P, Marra G, et al. Autoantibodies and endothelial dysfunction in well-controlled, uncomplicated insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Atherosclerosis* 2001;158(1):241-6.

7. ARTIGO EM INGLÊS

ANTICARDIOLIPIN ANTIBODIES: PREVALENCE IN DIABETICS WITH AND WITHOUT HISTORY OF VASCULAR EVENTS

Caroline Eickhoff Copetti¹, Myriam Perrenoud², Henrique Luiz Staub³

Departments of Rheumatology, Cardiology, and Endocrinology, Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

1 Farmacêutica-bioquímica. Mestranda em Medicina e Ciências da Saúde com ênfase em Clínica Médica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

2 Doutora em Medicina e Ciências da Saúde e Mestre em Gerontologia Biomédica. Coordenadora do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS.

3 Doutor em Reumatologia e Mestre em Imunologia Clínica. Professor Adjunto de Reumatologia da Faculdade de Medicina PUCRS. Professor do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da PUCRS.

Corresponding author:

Caroline Eickhoff Copetti
Rua Bento Gonçalves, 445 apto 202
Ijuí, RS, Brazil
98700-000
e-mail: caroleickcop@yahoo.com.br

ABSTRACT

The relationship between anticardiolipin antibodies (ACA), markers of the antiphospholipid syndrome, and vascular complications of diabetes is a matter of debate. This cross-sectional study assessed the frequency of IgG, IgM, and IgA-ACA in type 2 diabetics with or without history of vascular events in the last 5 years and in healthy controls. Antibodies were detected by enzyme immunoassay. A total of 73 type 2 diabetics (33 with history of vascular events) and 54 healthy controls were tested. Most diabetics were female ($p = 0.003$), and older than controls ($p < 0.001$). Mean duration of disease was 10 years. The prevalence of a positive ACA test was 7.4% in controls and 9.5% in diabetics ($p = 0.910$). Comparison of healthy controls and diabetics with or without history of macrovasculopathy, after adjusting for gender and age, showed no significant differences in ACA positivity ($p > 0.09$). ACA positivity rates were also similar when diabetics with or without recent history of vascular events were compared ($p > 0.47$). After adjusting for gender, age, hypertension, and

smoking status, a weak but statistically nonsignificant association was found between IgM-ACA and vasculopathy in diabetics (adjusted OR 2.7; 95%CI 0.2 – 34.2; $p = 0.441$). Overall, levels of IgG ($r = 0.25$; $p = 0.005$) and IgM ($r = 0.23$; $p = 0.010$) ACA were associated with advancing age. In short, the frequency of positive ACA test in type 2 diabetics (with or without previous vascular events) was not significant as compared to healthy controls. There was no association between ACA and vascular events in patients with type 2 diabetes.

Keywords: anticardiolipin antibodies, type 2 diabetes mellitus, myocardial infarction, cerebral infarction.

INTRODUCTION

Anticardiolipin antibodies (aCL antibodies or ACA), lupus anticoagulant, and anti-beta2-glycoprotein I (beta2-gpI) antibodies are classical markers of antiphospholipid syndrome (APS), an autoimmune thrombotic disorder that typically affects young adults. Primary APS is currently considered the most common acquired thrombophilia [1]. ACA and APS are of interest to a wide variety of clinical and surgical specialties.

Our research group recently documented an association between anti-beta2-gpI (an antiphospholipid protein cofactor with anticoagulant action) IgA antibodies and several pathologic conditions, including cerebral ischemia [2] and coronary [3], carotid [4], and peripheral artery disease [5]. In only one of these studies [5] were ACA (of the IgA isotype) associated with the outcome of interest. Although debate surrounds the relationship between ACA and ischemic events in people with diabetes, this topic had not yet been addressed by our team.

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic condition characterized by persistent hyperglycemia and multiorgan damage. The frequency of DM has been increasing at alarming rates in the 21st century, particularly in developing countries [6]. It is estimated that 12% of the Brazilian population, or approximately 22 million people, are affected by diabetes [7]. There has been a relative increase in the frequency of type 2 diabetes (T2DM) among young adults, which is explained by genetic characteristics, sedentary lifestyles, and inappropriate dietary habits [8].

DM is an independent risk factor for atherosclerotic disease, but the etiology and pathophysiology of its micro and macrovascular complications has yet to be fully elucidated [9]. Macrovascular complications, such as those affecting the coronary and cerebral circulation, are the leading cause of death in diabetes [10,11].

T2DM, the focus of our study, is characterized by insulin resistance and by a well-established association with obesity. Recent data suggest that cytokines (particularly tumor necrosis factor, a product of adipocytes and other immune system cells) play a key role in the pathogenesis of insulin resistance [12]. Elevated levels of interleukin-6 and interleukin-8 are not unusual in patients with T2DM, and these cytokines have also been claimed to play a role in insulin resistance [13].

Although their presence has been described in infectious diseases such as syphilis, leprosy, HIV, and viral hepatitis [14], ACA have classically been associated with the thromboembolic phenomena of APS [15]. ACA are now known to induce activation of platelets, endothelial cells, monocytes, the complement system, and the coagulation cascade, thus leading to thrombophilia [16]. The role of this remarkable group of autoantibodies in the pathogenesis or perpetuation of the characteristic ischemic events of diabetes is still unclear.

The formation of advanced glycation end-products secondary to hyperglycemia is in and of itself capable of inducing arterial inflammation and hypercoagulability [17]. Oxidative stress is clearly increased in diabetics, most likely due to autooxidation of glucose [18]. High blood sugar levels lead to synthesis of superoxide anion by endothelial cells, which inhibits the vasodilator effects of nitric oxide, thus disrupting vascular homeostasis [19]. Nevertheless, investigations into the role of autoimmune phenomena (including ACA) in the vascular complications of diabetes are warranted.

The prevalence of ACA in diabetic patients has received little attention in the recent literature, and findings reported thus far have been inconsistent. The present study sought to assess the frequency of anticardiolipin IgG, IgM and IgA antibodies in a Brazilian population of type 2 diabetics (with or without a prior history of vascular events) and in healthy controls, as well as assess the potential association between presence of ACA and history of vasculopathy in diabetics.

MATERIALS AND METHODS

Study population

This cross-sectional, case-control study was conducted on a sample of T2DM patients treated at public health units in the municipality of Ijuí, state of Rio Grande do Sul, Brazil. At these units, diabetic patients undergo monthly follow-up and take part in monthly meetings. The criteria for inclusion were age ≥ 50 years and T2DM, diagnosed according to traditional criteria [20], of at least five years' duration. All patients took part in a thorough interview that addressed the main aspects of their overall health and relevant conditions. Patients with systemic lupus erythematosus [21] or APS [22] were excluded.

Participants were allocated into one of two groups. Group I included patients with a history of vascular events, such as acute myocardial infarction (AMI) or ischemic stroke, over the preceding five years. Diagnosis of AMI was confirmed by clinical findings, ECG tracings, cardiac enzyme studies, and, when required, imaging studies; diagnosis of ischemic stroke was established by clinical and neuroimaging findings. These data were obtained through a review of medical records. Group II comprised T2DM patients with no prior history of vascular events. The control group, included as a means of estimating the prevalence of ACA in the general population, consisted of blood donors aged 50 to 65. All participants (or next of kin) provided informed consent prior to inclusion in the study sample.

Clinical and demographic information was obtained from a registration filled out by patients or their relatives during interviews. Data on the following variables were collected: 1) age; 2) gender; 3) time since confirmation of T2DM diagnosis; 4) smoking status (current, defined as ≥ 5 cigarettes/day [23] for at least 30 days [24], or past [25]); 4) history of arterial hypertension (HTN) [26]; 5) history of vascular disease. All data provided by patients were confirmed during interviews or by a review of medical records.

Sampling

Peripheral blood samples were drawn, centrifuged and frozen within 2 hours of collection, and subsequently stored at -70°C for later testing. IgG-ACA, IgM-ACA, and IgA-ACA were quantitated by enzyme immunoassay (Anti-Cardioliipin Screen, ORGENTEC Diagnostika GmbH, Mainz, Germany) on solid phase extraction plates [27-29]. During the first step of the, diluted blood sample aliquots were dispensed into cardioliipin-containing

wells. Buffers containing the beta2-gp1 cofactor were used [30]. Peroxidase-conjugated anti-human IgG, anti-human IgM, and anti-human IgA were added during a second run. Chromogen was added, producing a color reaction was proportional to the amount of ACA present in the sample [31,32]. Plates were read using a spectrophotometer. Calibration curves were then used to obtain IgG-ACA, IgM-ACA, and IgA-ACA concentration levels. Titers > 10 GPL for IgG-ACA, > 10 MPL for IgM-ACA, and > 7 U/mL for IgA-ACA were considered positive.

The study design was approved by the PUCRS-Hospital São Lucas Research Ethics Committee.

Data Analysis

Data were entered into a Microsoft Excel spreadsheet and exported to SPSS v. 17.0 for statistical analysis. Quantitative variables with symmetric distribution were expressed as means and standard deviation and compared by means of Student's *t* test for independent samples. Those variables with an asymmetric distribution were expressed as median and interquartile range.

Categorical variables were expressed as absolute and relative frequencies and compared with Yates' chi-square test. Odds ratios (ORs) with a 95% confidence interval (95%CI) were obtained to assess the strength of association between variables. The Hopkins scale for stratification of odds ratios was used as follows: an OR of 1 – 1.5 was considered trivial; 1.5 – 3.5, weak; 3.5 – 9, moderate; 9 – 32, strong; and > 32, very strong [33]. Agresti's [34] correction was used to obtain unadjusted ORs when required. Pearson's correlation coefficient was used for association of quantitative variables. Logistic regression was performed to adjust for potential confounders. The significance level was set at 5%.

RESULTS

A total of 73 diabetic patients and 54 healthy controls were enrolled. Table 1 provides an overview of demographic data and ACA levels for both groups. Significant between-group differences were found in age (diabetics were older) and gender (most diabetics were female). Approximately 15% of subjects in the T2DM group had hypertension, and roughly one-quarter had a history of smoking. Mean duration of disease (time elapsed

since diagnosis of T2DM) was 10 years. Overall, seven diabetics (9.5%) and four healthy controls (7.4%) tested positive for ACA ($p = 0.910$). One of the 11 ACA-positive subjects (9.1%, 14.3% of diabetic subjects) had high antibody levels (> 40 units): a diabetic patient with no history of vascular events exhibited an IgA-ACA level of 45 U/mL. The 10 remaining ACA-positive subjects (90.9%) had low antibody levels (< 40 units). A moderate but statistically nonsignificant association was found between IgM-ACA positivity and DM was detected. Conversely, IgG-ACA and IgA-ACA positivity were more prevalent among controls, but, once again, this finding was not statistically significant. After adjusting for gender and age, there was no association between ACA (any isotype) and the outcome of interest.

Table 2 compares demographic data and ACA levels for healthy controls and diabetics with a prior history of vascular events (Group I). Both populations differed significantly in terms of mean age (again, diabetics were older), but there were no significant differences in gender. IgG-ACA, IgM-ACA, and IgA-ACA positivity were also statistically similar in both groups; IgM-ACA positivity was moderately associated with a prior history of macrovascular events in diabetes, but not significantly so.

Table 3 shows a comparison of demographic data and ACA levels for healthy controls and diabetics with no prior history of vascular events (Group II). As in the overall sample, significant between-group differences were found in age (diabetics were older) and gender (more diabetics were female). There were no statistically significant between-group differences in IgM-ACA positivity, although a weak association between IgM-ACA and absence of vascular events was noted. After adjusting for gender and age, there was no association between IgG-ACA or IgA-ACA positivity and absence of prior vascular events in T2DM patients.

Between-group comparison of both diabetic subgroups (Table 4) showed no significant differences in mean age. Female gender was significantly preponderant in the non-vascular event group (Group II). Prevalence rates of HTN and smoking (current or past) were similar in both groups. There was no significant difference in IgG-ACA or IgA-ACA positivity. After adjusting for gender, age, HTN, and smoking, a weak association between IgM-ACA positivity and a history of vascular events in T2DM became apparent; however, it did not reach statistical significance.

Figure 1 shows the relationship between ACA levels and age in the study sample. A statistically significant, though weak, correlation was found between IgG -ACA ($r = 0.25$; $p = 0.005$) and IgM-ACA ($r = 0.23$; $p = 0.010$) titers and advancing age. This correlation did not hold for IgA-ACA ($r = 0.08$; $p = 0.360$).

DISCUSSION

Debate surrounds the relationship between ACA and vascular events in diabetes. The present study is most likely the first Brazilian investigation to address the topic. Participants were recruited from the municipal health services of a moderately large municipality in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, where diabetic patients attend monthly meetings and undergo monthly clinical follow-up, greatly facilitating the logistics of the study.

In order to provide a more adequate answer to the underlying research question of this study (whether an association exists between ACA and vascular events in diabetics), we chose to homogenize the sample to include only T2DM patients, in light of the far greater prevalence of this form of the condition in comparison to type 1 diabetes mellitus [35]. All patients treated at the local health unit who had at least a five-year history of T2DM and agreed to take part in the study were included. The decision to allocate these participants into two groups depending on the presence or absence of a prior history of vascular events (AMI, ischemic stroke) was the logical next step.

Definition of a history of vascular events (arbitrarily restricted to a five-year period preceding the study) was based on interview data and on a review of medical records. Only macrovascular events diagnosed according to established, absolute criteria (AMI and ischemic stroke) were considered, which may have limited case selection and affected the conclusions of this study.

Subjects and controls (non-diabetic blood donors) could not be optimally paired by gender and age. Statistically significant differences were found between these variables and those of the diabetic group (controls were younger and mostly male, whereas diabetic subjects were older and mostly female). ACA positivity was adjusted for gender and age whenever possible.

Overall, the case group (T2DM patients) predominantly comprised female patients, with a mean age of 67 years and a mean duration of illness of 10 years. One-quarter of diabetic subjects were smokers and 15% had hypertension. As the prevalence of HTN and smoking was not assessed in controls, rendering statistical adjustment impossible, the influence of these variables on ACA positivity cannot be ruled out. Only one (9.1%) of the 11 ACA-positive individuals had levels in excess of 40 units (a diabetic subject with no history of vascular events). Therefore, conceptually speaking [36], low titers were the norm in our ACA-positive subjects. Only one of seven ACA-positive diabetics (one with no history of vascular events) had elevated ACA levels.

Overall, ACA positivity was low in controls and diabetics alike (7.4% and 9.5% respectively), with no significant between-group differences. Although crude ORs suggested a moderate association between IgM-ACA positivity and T2DM, confidence intervals were unreliable, and this finding was also statistically insignificant. Adjusted ORs for IgG-ACA and IgA-ACA positivity (0.2 and 0.5 respectively) suggest that positivity for these ACA isotypes could actually have a protective effect in T2DM. However, confidence intervals were again unreliable, and these findings also did not reach statistical significance. Interestingly, in a controlled study, Hendra *et al.* found increased low-level IgG-ACA positivity in diabetics with or without coronary artery disease [37]. Gargiulo *et al.*, in turn, reported high levels of IgA antibodies to phosphatidylethanolamine, but not of ACA, in type 1 and type 2 diabetics [38].

Comparison of the T2DM plus history of vascular events subgroup and healthy controls showed differences in mean age, but no difference in gender. Once again, there were no significant between-group differences in IgG-ACA and IgA-ACA positivity. A moderate association between IgM-ACA positivity and vasculopathy, as suggested by crude ORs, could not be statistically proven. Conversely, in a study of type 1 diabetics, Ahmed *et al.* reported increased prevalence of IgG-ACA and IgA-ACA in those with vasculopathy as compared to healthy controls. However, on direct comparison with uncomplicated diabetics, the difference in ACA levels did not reach statistical significance. IgM-ACA positivity was more common among diabetics with angiopathy than in healthy controls, but, as in our study, this finding did not reach statistical significance [39].

On comparison between diabetics with a history of vascular events and healthy controls, after adjusting for gender and age, there was no association between IgG-ACA or

IgA-ACA positivity and the outcome of interest. Crude ORs suggested a weak association between IgM-ACA positivity and uncomplicated diabetes, but this finding was not statistically significant. Our findings are consistent with those of a previous study, which reported a negligibly higher prevalence of ACA in uncomplicated diabetic patients [40]. These data suggest that the biological behavior of ACA in uncomplicated T2DM is similar to that found in healthy individuals.

On comparison between both diabetic subgroups (with and without history of vascular events), ORs adjusted for gender, age, smoking status, and hypertension suggested a weak association between IgM-ACA positivity and prior vascular events; this association did not, however, reach statistical significance. Notably, previous studies have reported significantly higher prevalence of ACA positivity among type 1 and 2 diabetics with macrovascular complications and nephropathy than in diabetics with uncomplicated or well-managed disease [40]. In 1989, another group of investigators reported an increased prevalence of IgG-ACA and IgA-ACA positivity in type 2 diabetics with a history of macrovascular events [41].

In the present study, the prevalence of anticardiolipin antibodies in healthy blood donor controls was 1.9% for the IgG isotype, 0% for the IgM isotype, and 5.6% for the IgA isotype. Bearing in mind that nonspecific IgM binding to polystyrene plates occurs rather often during enzyme immunoassay [42], the complete absence of IgM-ACA positivity in our controls was remarkable, and stands in stark contrast to the high prevalence of IgA-ACA in controls, which exceeded that of the diabetic group (although the difference was not statistically significant). Nonspecific IgA binding may have occurred during enzyme immunoassays in our sample, or controls may have had underlying clinical conditions that might explain this finding. The prevalence of ACA in healthy controls was 2.5%, consistent with that reported by Petri *et al.* [43]. In a 2004 study, IgG-ACA and IgM-ACA positivity rates in healthy controls were 2.5% and 3.1% respectively [44]. Data from Brazilian samples suggests that low ACA titers are detectable in 6% and high ACA titers in 1% of healthy individuals [45].

We did find a weak, but statistically significant, association between IgG-ACA and IgM-ACA positivity and increasing age. This finding is consistent with that reported by Fields *et al.* in 1989, in a study in which IgG-ACA and IgM-ACA were detected in 12% of healthy adults and 2% of younger individuals [46]. Conversely, some authors have found

insignificant ACA positivity in older adults and rates similar to those found in younger populations [47].

Overall, our findings on the frequency of ACA positivity in diabetic patients showed no relevant or significant difference from healthy controls. The prevalence of ACA positivity was uniformly low in our diabetic subjects, regardless of prior history of vascular events. Our data, though limited by sample size, clinical evaluation of controls, and challenges in statistical adjustment, suggest that ACA are unlikely to play a role in the pathogenesis of diabetic macroangiopathy. These findings are consistent with and reinforce those of prior studies, such as that by Tarkun *et al.*, which cleared ACA and anti-beta2-gpI antibodies from any major role in the pathogenesis of the vascular complications of T2DM [48].

Our research group recently analyzed the frequency of ACA and anti-beta2-gpI antibodies in patients with metabolic syndrome (MS). Whereas the IgA isotype of anti-beta2-gpI antibodies was associated with MS, none of the ACA isotypes were. We thus infer that ACA positivity does not appear to be associated with MS [49]. Conversely, another recent study argued that the association between ACA and endothelial dysfunction may play a synergistic role in triggering early-onset vasculopathy in patients with insulin-dependent diabetes [50]. These conflicting data mirror the intriguing debate on the true role of ACA in diabetic vasculopathy.

In short, the frequency of ACA positivity was not significantly different in type 2 diabetics (with or without a history of vascular events) and in healthy controls in our sample, nor did we find any association of ACA with macrovascular complications of T2DM. The presence of low levels of ACA in most subjects in our sample suggests that these antibodies may be an epiphenomenon of diabetes mellitus. The relationship of ACA positivity and vascular events in patients with diabetes still requires further investigation.

REFERENCES

1. Edwards CJ, Hughes GR (2008) Hughes syndrome (the antiphospholipid syndrome): 25 years old. *Mod Rheumatol* 18 (2):119-124. doi:10.1007/s10165-008-0042-3
2. Staub HL, Norman GL, Crowther T, da Cunha VR, Polanczyk A, Bohn JM, Fernandes JG, Chahade WH, von Muhlen CA (2003) Antibodies to the atherosclerotic plaque components

beta2-glycoprotein I and heat-shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr* 61 (3B):757-763. doi:S0004-282X2003000500010

3. Ranzolin A, Bohn JM, Norman GL, Manenti E, Bodanese LC, von Muhlen CA, Staub HL (2004) Anti-beta2-glycoprotein I antibodies as risk factors for acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol* 83 (2):141-144; 137-140. doi:/S0066-782X2004001400005

4. Franck M, Staub HL, Petracco JB, Norman GL, Lassen AJ, Schiavo N, Borges RB, von Muhlen CA (2007) Autoantibodies to the atheroma component beta2-glycoprotein I and risk of symptomatic peripheral artery disease. *Angiology* 58 (3):295-302. doi:10.1177/0003319707302493

5. Recuero ML, Silva JB, Norman GL, von Muhlen CA, Staub HL (2007) IgA antibodies to beta2-glycoprotein I and carotid disease. *Isr Med Assoc J* 9 (6):495-496

6. King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21 (9):1414-1431

7. Banco de Saúde (2008) Tudo sobre Diabetes Mellitus, Diabetes Gestacional e Pré-Diabetes. <http://www.bancodesaude.com.br/diabetes/diabetes-mellitus-tipo-1-2-diabetes-gestacional-pre-diabetes>. Accessed 10 February 2011

8. Wilmot EG, Davies MJ, Yates T, Benhalima K, Lawrence IG, Khunti K (2010) Type 2 diabetes in younger adults: the emerging UK epidemic. *Postgrad Med J* 86 (1022):711-718. doi:10.1136/pgmj.2010.100917

9. Palomo IG, Mujica VE, Alarcon ML, Pereira JG, Vasquez MR (2005) Prevalence of antiphospholipid antibodies is not different in Chilean diabetic patients and normal individuals. *J Diabetes Complications* 19 (3):133-137. doi:10.1016/j.jdiacomp.2004.09.004

10. Kannel WB, McGee DL (1979) Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 241 (19):2035-2038

11. Carter AM, Grant PJ (1997) Vascular homeostasis, adhesion molecules, and macrovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 14 (6):423-432. doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199706)14:6<423:AID-DIA421>3.0.CO;2-F

12. Lorenzo M, Fernandez-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I (2008) Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes. *J Anim Sci* 86 (14 Suppl):E94-104. doi:10.2527/jas.2007-0462

13. Rotter V, Nagaev I, Smith U (2003) Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278 (46):45777-45784. doi:10.1074/jbc.M301977200

14. Sene D, Piette JC, Cacoub P (2008) Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev* 7 (4):272-277. doi:10.1016/j.autrev.2007.10.001

15. Gezer S (2003) Antiphospholipid syndrome. *Dis Mon* 49 (12):696-741. doi:10.1016/j.disamonth.2003.10.001

16. Mehdi AA, Uthman I, Khamashta M (2010) Antiphospholipid syndrome: pathogenesis and a window of treatment opportunities in the future. *Eur J Clin Invest* 40 (5):451-464. doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02281.x
17. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D (1999) Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 84 (5):489-497
18. Yorek MA (2003) The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. *Free Radic Res* 37 (5):471-480
19. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19 (3):257-267
20. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith Jr SC, Spertus JA, Costa F (2005) Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *Cardiol Rev* 13 (6):322-327
21. Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40 (9):1725. doi:10.1002/1529-0131(199709)40:9<1725::AID-ART29>3.0.CO;2-Y
22. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, PG DEG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4 (2):295-306. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01753.x
23. Piegas LS, Avezum A, Pereira JC, Neto JM, Hoepfner C, Farran JA, Ramos RF, Timerman A, Esteves JP (2003) Risk factors for myocardial infarction in Brazil. *Am Heart J* 146 (2):331-338. doi:10.1016/S0002-8703(03)00181-9
24. Dias-Júnior SA, Pinto RC, Angelini L, Fernandes FLA, Cukier A, Stelmach R (2009) Prevalência de tabagismo ativo e passivo em uma população de asmáticos. *J Bras Pneumol* 35:261-265
25. Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernandez-Cruz A (2004) Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev* 5 (2):95-103. doi:10.1111/j.1467-789X.2004.00131.x
26. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ (2003) The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289 (19):2560-2572. doi:10.1001/jama.289.19.2560
27. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR (1987) Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis* 46 (1):1-6
28. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GR (1985) Anti-phospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis* 11 (3):591-609
29. Harris EN (1988) Solid-phase anti-cardiolipin test revisited. *Am J Med* 85 (5):599-601

30. Chamley LW, McKay EJ, Pattison NS (1991) Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies. *Thromb Res* 61 (3):291-299
31. Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR (1987) Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 68 (1):215-222
32. Brown RD, Gibson J, Wells J, Jun R, Rickard K, Kronenberg H (1989) Human cardiolipin as the antigen in an ELISA to detect anticardiolipin antibodies. *Br J Rheumatol* 28 (2):109-112
33. Hopkins WG A new view of statistics. Disponível em: <http://www.sportsci.org/resource/stats/index>. Accessed 03 February 2011
34. Agresti A (1999) On logit confidence intervals for the odds ratio with small samples. *Biometrics* 55(2):597-602
35. Haffner SM (1998) Epidemiology of type 2 diabetes: risk factors. *Diabetes Care* 21 Suppl 3:C3-6
36. Tincani A, Casu C, Cartella S, Ziglioli T, Cattaneo R (2010) [Antiphospholipid antibody: laboratory, pathogenesis and clinical manifestations]. *Reumatismo* 62 (1):65-75
37. Hendra TJ, Baguley E, Harris EN, Khamashta MH, Trembath RC, Hughes GR, Yudkin JS (1989) Anticardiolipin antibody levels in diabetic subjects with and without coronary artery disease. *Postgrad Med J* 65 (761):140-143
38. Gargiulo P, Goldberg J, Romani B, Schiaffini R, Ciampalini P, Faulk WP, McIntyre JA (1999) Qualitative and quantitative studies of autoantibodies to phospholipids in diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol* 118 (1):30-34. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.01014.x.
39. Ahmed E, Nityanand S, Mustafa A, Brismar K, Lefvert AK (1999) Anti-cardiolipin antibodies and circulating immune complexes in type 1 diabetes mellitus: increased prevalence and relation to vascular complications. *Clin Exp Immunol* 115 (2):255-259
40. Galtier-Dereure F, Biron C, Vies M, Bourgeois V, Schved JF, Bringer J (1998) Vascular complications of diabetes mellitus: what role for phospholipid-binding antibodies? *Lupus* 7 (7):469-474
41. Triolo G, Giardina E, Scarantino G, Seddio G, Bompiani G (1989) Detection of anti-phospholipid (cardiolipin, phosphatidylserine) antibodies in the serum of patients with non insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus and macroangiopathy. Coexistence of anti-platelet reactivity. *Diabetes Res* 10 (2):63-67
42. Pierangeli SS, Gharavi AE, Harris EN (2001) Testing for antiphospholipid antibodies: problems and solutions. *Clin Obstet Gynecol* 44 (1):48-57; quiz 58-49
43. Petri M, Rheinschmidt M, Whiting-O'Keefe Q, Hellmann D, Corash L (1987) The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. A study of sixty consecutive patients by activated partial thromboplastin time, Russell viper venom time, and anticardiolipin antibody level. *Ann Intern Med* 106 (4):524-531

44. Al Jabri AA, Al Buloshi MS (2004) Anticardiolipin and antinuclear antibodies in the adult healthy Omani individuals. *Saudi Med J* 25 (3):313-317. doi:20030384 [pii]
45. Godoy JMP, Lúpino PL, Souza DRS, Parma AHC, Angulo IL, Godoy MF (1998) Prevalência de anticorpos anticardiolipina em doadores voluntários de banco de sangue. *Bol Soc Bras Hematol Hemoter* 20 (178):65-68
46. Fields RA, Toubbeh H, Searles RP, Bankhurst AD (1989) The prevalence of anticardiolipin antibodies in a healthy elderly population and its association with antinuclear antibodies. *J Rheumatol* 16 (5):623-625
47. Chakravarty KK, Gray RE, Webley M, Byron MA, Wozniak J (1991) Prevalence of anticardiolipin antibodies in the elderly British population. *Postgrad Med J* 67 (786):358-361
48. Tarkun I, Hacıhanefioglu A, Tarkun P, Cetinarslan B, Canturk Z (2005) Anticardiolipin and anti-beta2 glycoprotein I antibody concentrations in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 68 (3):181-187. doi:10.1016/j.diabres.2004.09.005
49. Krás Borges R, Bodanese L, von Mühlen C, Repetto G, Viehe M, Norman G, Staub H (in press) Anti-beta2-glycoprotein I autoantibodies and metabolic syndrome. *Arq Bras Cardiol*
50. Ciarla MV, Bocciarelli A, Di Gregorio S, Tordi A, Cotroneo P, Marra G, Ghirlanda G, Strom R (2001) Autoantibodies and endothelial dysfunction in well-controlled, uncomplicated insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Atherosclerosis* 158 (1):241-246. doi:S0021915001004403 [pii]

Table 1. Demographic characteristics of healthy controls and diabetics participants.

	Healthy controls (N = 54)	Diabetics (N = 73)	<i>P</i>	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^b (95% CI)	<i>p</i> ^c
Age (years)	54.8 ± 4.3	67.0 ± 9.8	< 0.001	1.3 (1.2 – 1.4) ^a	NC	NC
Female gender	21 (38.9%)	49 (67.1%)	0.003	3.2 (1.5 – 6.7) ^a	NC	NC
Hypertension	-	11 (15.1%)	NC	NC	NC	NC
History of smoking	-	19 (26.0%)	NC	NC	NC	NC
Disease duration (years)	-	10 (6–12)	NC	NC	NC	NC
Positive ACA (total)	4 (7.4%)	7 (9.5%)	0.910	1.3 (0.3 – 5.8)	NC	NC
Positive IgG-ACA	1 (1.9%)	1 (1.4%)	0.999	0.7 (0.05 – 12.0)	0.2 (0.001 – 20.9)	0.458
Positive IgM-ACA	0	4 (5.5%)	0.136	3.9 (0.4 – 34.6) ^a	NC	NC
Positive IgA-ACA	3 (5.6%)	2 (2.7%)	0.650	0.5 (0.08 – 3.0)	0.5 (0.05 – 6.0)	0.608

N = number; NC = not calculated; ^a Agresti correction. ^b adjusted for gender and age. ^c adjusted for gender and age after logistic regression. Quantitative variables with symmetric distribution expressed as mean (standard deviation) and compared by means of Student's *t* test for independent samples. Quantitative variables with asymmetric distribution expressed as median (interquartile range). Categorical variables expressed as absolute frequency and percentage and compared by means of Yates' chi-square test.

Table 2. Demographic characteristics and frequency of ACA in healthy controls and diabetics with a history of vascular events.

	Healthy controls (N = 54)	Diabetics with prior vascular events (Group I) (N = 33)	<i>p</i>	Crude OR (95% CI) ^d
Age (years) ^a	54.8 ± 4.25	68.2 ± 10.65	0.001 ^b	1.3 (1.1 – 1.4)
Female gender	21 (38.9%)	16 (48.5%)	0.512 ^c	1.5 (0.6 – 3.5)
Positive IgG-ACA	1 (1.9%)	0	0.999 ^c	0.8 (0.07 – 9.1)
Positive IgM-ACA	0	3 (9.1%)	0.099 ^c	7.1 (0.8 – 66.3)
Positive IgA-ACA	3 (5.6%)	0	0.440 ^c	0.4 (0.04 – 3.6)

N= number; ^a standard deviation; ^b Student's *t* test; ^c chi-square test; ^d Agresti correction.

Table 3. Demographic characteristics and frequency of ACA in healthy controls and diabetics with no prior history of vascular events.

	Healthy controls N = 54	Diabetics with no prior vascular events (Group II) N = 40	<i>p</i>	Crude OR (95%CI)	Adjusted OR ^e (95%CI)	<i>p</i> ^f
Age (years) ^a	54.8 (± 4.25)	65,9 (± 9.10)	0.001 ^b	1.3 (1.2 – 1.5) ^d	NC	NC
Female gender	21 (38.9%)	33 (82.5%)	0.001 ^c	7.4 (2.8 – 19.8) ^d	NC	NC
Positive IgG-ACA	1 (1.9%)	1 (2.5%)	0.999 ^c	1.4 (0.08 – 22.4)	0.3 (0.001 – 54.6)	0.621
Positive IgM-ACA	0	1 (2.5%)	0.880 ^c	2.8 (0.2 – 31.4) ^d	NC	NC
Positive IgA-ACA	3 (5.6%)	2 (5.0%)	0.999 ^c	0.9 (1.0 – 5.6)	1.8 (0.1 – 23.1)	0.660

N = number; NC = not calculated; ^a standard deviation; ^b Student's *t* test; ^c chi-square test; ^d Agresti correction; ^e adjusted for gender and age; ^f chi-square test after adjusting for gender and age.

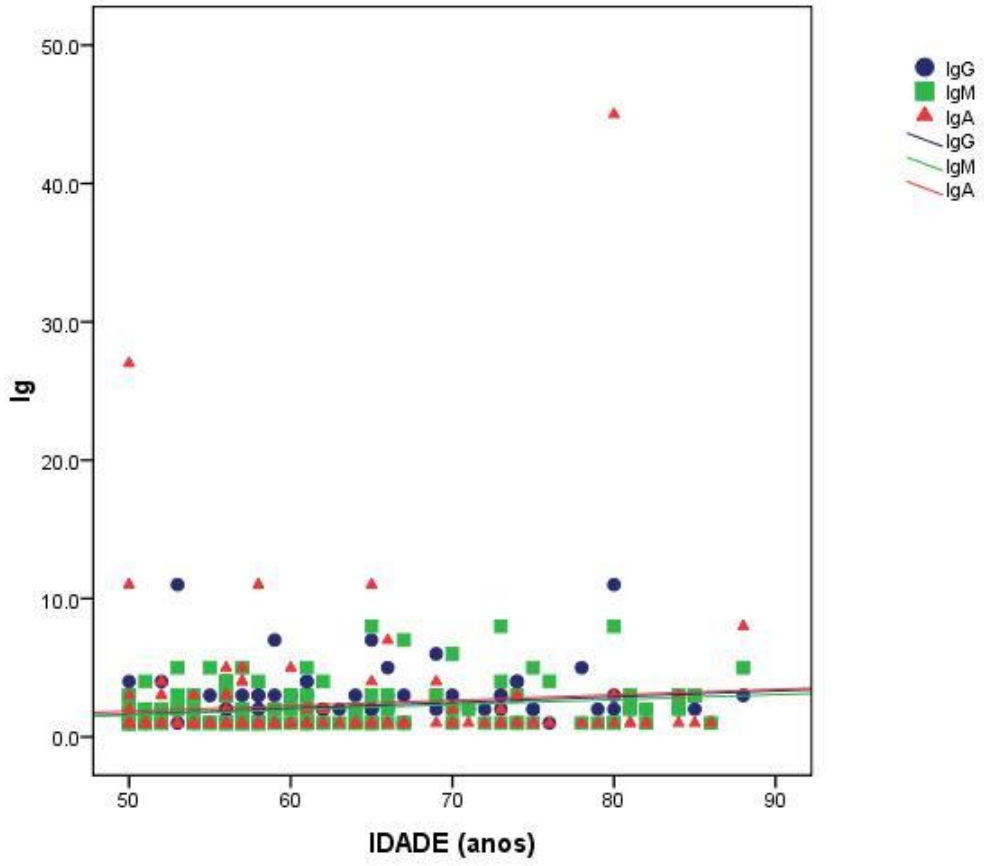
Table 4. Demographic characteristics and frequency of ACA in both diabetes groups.

	Diabetics with prior vascular events (Group I) N = 33	Diabetics with no prior vascular events (Group II) N = 40	<i>p</i>	Crude OR (95% CI)	Adjusted OR ^e (95% CI)	<i>p</i>
Age (years) ^a	68.2 (± 10.65)	65.9 (± 9.1)	0.331 ^b	1.0 (0.9 – 1.1) ^d	NC	NC
Female gender	16 (48.5%)	33 (82.5%)	0.005 ^c	0.2 (0.1 – 0.6) ^d	NC	NC
HTN	29 (87.9%)	33 (82.5%)	0.744 ^d	1.5 (0.4 – 5.8) ^d	NC	NC
Smoking history	8 (24.2%)	11 (27.5%)	0.962	0.8 (0.3 – 2.4) ^d	NC	NC
Positive IgG-ACA	0	1 (2.5%)	0.999 ^c	0.6 (0.05 – 6.8) ^d	NC	NC
Positive IgM-ACA	3 (9.1%)	1 (2.5%)	0.475 ^c	3.9 (0.4 – 39.4)	2.7 (0.2 – 34.2)	0.441
Positive IgA-ACA	0	2 (5.0%)	0.560 ^c	0.4 (0.04 – 3.9) ^d	NC	NC

HTN = hypertension; N = number; NC = not calculated; ^a standard deviation; ^b Student's *t* test; ^c chi-square test; ^d Agresti correction; ^e adjusted for gender, age, HTN, and smoking.

Figure legend

Figure 1. Relationship between ACA levels and age. Scatter plot of relationship between quantitative ACA levels and age.



ANEXOS

ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP – PUC/RS

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-1503/09

Porto Alegre, 06 de novembro de 2009.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 09/04835 intitulado **"Anticorpos anticardiolipina: prevalência em diabéticos com e sem eventos cardiovasculares prévios"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Roberto Goldim
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Dr. Henrique Luiz Staub
Nesta Universidade

PUCRS**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6690 – 3ª andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER

Cadastro do Projeto CEP/PUCRS
09/04835

Título:
"Anticorpos anticardiolipina: prevalência em diabéticos com e sem eventos cardiovasculares prévios"

Pesquisador Responsável:
Henrique Luiz Staub (orientador), Caroline Eickhoff Copetti (mestranda)

Aspectos Científicos e Metodológicos
Estudo vinculado ao Curso de Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS, com o objetivo de estimar a prevalência de anticorpos anticardiolipina em pacientes com DM com e sem eventos cardiovasculares prévios. Será realizado com 100 usuários das Unidades Básicas de Saúde do município de Ijuí/RS e as dosagens de anticorpos serão realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do HSL/PUCRS.

Aspectos Éticos
Adequados.

Recomendação
Aprovar

Considerações Gerais
Pendências atendidas.

Data do Parecer 06/11/2009



ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem por título: “Anticorpos anticardiolipina: prevalência em diabéticos com e sem eventos cardiovasculares prévios”.

Esta pesquisa está sendo desenvolvida para verificar se há presença Anticorpos Anticardiolipina em pacientes diabéticos com e sem problemas cardiovasculares.

O objetivo desta pesquisa é estimar a prevalência de Anticorpos Anticardiolipina em pacientes com Diabetes Mellitus tipo I e II com e sem eventos cardiovasculares prévios.

Caso decida participar desta pesquisa você deverá responder as questões que serão feitas durante entrevista detalhada sobre aspectos de sua saúde. E, posteriormente deverá se submeter à coleta de 10 mL de sangue para dosagem de Anticorpos Anticardiolipina.

Os procedimentos desta pesquisa não envolvem risco para sua saúde. O único desconforto que você poderá ter é a dor da picada para a coleta de sangue. Você também tem a garantia de que não será identificado em nenhum momento da pesquisa.

Pacientes diabéticos são propensos a complicações micro e macrovasculares. Uma eventual associação entre anticorpos anticardiolipina e histórico cardiovascular pode contribuir adicionalmente para a compreensão da doença vascular diabética. A investigação destes marcadores pode ser útil para prevenir estas possíveis complicações vasculares.

Após a realização dos exames pelos pesquisadores, você receberá uma cópia dos resultados que será entregue pelo médico da unidade básica juntamente com os pesquisadores, no momento da consulta. Nesta consulta, você receberá orientação sobre condutas de tratamento medicamentoso, se necessário for (ou seja, se os resultados do seu exame apresentarem níveis de Anticorpos Anticardiolipina IgA, IgM e IgG acima de 20 unidades).

Você tem o direito de retirar seu consentimento em qualquer momento. Os resultados deste estudo serão utilizados única e exclusivamente para fins de pesquisa.

Número de aprovação pelo CEP: _____

Eu, _____
declaro que fui informado da pesquisa acima de maneira clara e detalhada, recebi informação a respeito da entrevista e coleta de sangue e esclareci

ANEXO III – QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO – AVALIAÇÃO DOS PACIENTES DIABÉTICOS

NOME: _____ IDADE: _____ DATA: _____

DN: __/__/__ SEXO: () M () F COR: () B () NB N. CADASTRO: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____ CONTATO _____

MEDICAÇÕES EM USO: (NOME E DOSE)

() DIURÉTICO: _____

() BETABLOQUEADOR: _____

() IECA: _____

() ACC: _____

() ARA: _____

() ALFA-AGONISTAS: _____

() VASODILATADORES: _____

() METIFORMINA: _____

() GLITAZONAS: _____

() ACARBOSE: _____

() ORLISTAT: _____

() ACOMPLIA (RIMONABANT): _____

() OUTROS: _____

HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA / FATORES DE RISCO:

() DM1 () DM2 Tempo de diagnóstico _____

() HAS: Tempo diagnóstico: _____ Tratamento: () regular () irregular

() TABAGISMO ATUAL (≥ 5 cigarros/dia + 30 dias): _____ Tempo/anos: _____

() TABAGISMO PRÉVIO: Tempo de uso: _____ Tempo abandono: _____

() DAC: _____ data _____

() IAM prévio ____ data _____

() ICC: _____

() AVC: ____ data _____

() Dç Vasc Perif: _____

() IRC: _____

() DISLIPIDEMIA: _____

() HIPERURICEMIA/GOTA: _____

() DPOC: _____

() HEPATOPATIA: _____

() DOENÇA DA TIREÓIDE (Qual): _____

() DOENÇA DA OFTALMOLÓGICA (Qual): _____

NEOPLASIA (Qual): _____

() LUPUS () SAF

OUTRAS: _____

HISTÓRIA SOCIAL:

() ESCOLARIDADE (anos de estudo): _____

() PROFISSÃO: _____

() CONSUMO ÁLCOOL: (g/dia) _____

() USO DROGAS: Tipo: _____

() SEDENTARISMO () ATIVIDADE HABITUAL () ATIVIDADES REGULARES

HISTÓRIA FAMILIAR:

() HAS: _____

() DAC: _____

() AVC: _____

() DM – I () DM - II: _____

() DISLIPIDEMIA: _____

() DOENÇA RENAL: _____

() NEOPLASIA: _____

() OUTRAS: _____

EXAME FÍSICO: GERAL: _____

PESO: _____ ALT: _____ IMC: _____ FC: _____

CIRC. BRAQUIAL: _____ QUADRIL: _____ CINTURA: _____

PA¹: ____/____ mmHg PA²: ____/____ mmHg

PULSOS PERIFÉRICOS: _____

EDEMA MEMBROS: ()SIM ()NÃO ()INTENSIDADE: _____/4+

FUNDOSCOPIA (CLASSIFICAÇÃO DE KV - GRAUS)

(1)ESTREITAMENTO ARTERIOLAR (2)CRUZAMENTO A-V PATOLÓGICO

(3)HEMORRAGIA E/OU EXSUDATO RETINA (4)PAPIEDEMA

DÉFICIT MOTOR: ()SIM ()NÃO LOCAL: _____

OUTROS ACHADOS RELEVANTES: _____

EXAMES: ()LABORATÓRIO ()ECG ()RX TÓRAX ()ECOCARDIO

()OUTROS: _____

ANEXO IV – SUBMISSAO DO ARTIGO

Dear Dr. Copetti,

Your submission entitled "Anticardiolipin antibodies: prevalence in diabetics with and without history of vascular events" has been received by journal Acta Diabetologica

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://acdi.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.







Kind regards,

Editorial Office
Acta Diabetologica

Submissions Being Processed for Author Caroline Eickhoff Copetti

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
Action Links		Anticardiolipin antibodies: prevalence in diabetics with and without history of vascular events	14-02-2011	14-02-2011	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)