

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

**ANA LÍGIA BENDER**

**PROTEÍNA OLIGOMÉRICA DA MATRIZ DA CARTILAGEM  
(COMP/TROMBOSPONDINA 5) EM DOENÇAS REUMÁTICAS PREVALENTES E  
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Porto Alegre

2006

**ANA LÍGIA BENDER**

**PROTEÍNA OLIGOMÉRICA DA MATRIZ DA CARTILAGEM  
(COMP/TROMBOSPONDINA 5) EM DOENÇAS REUMÁTICAS PREVALENTES E  
INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, no Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Clínica Médica, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**Orientador: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto von Mühlen**

Porto Alegre

2006

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

B458p Bender, Ana Lígia  
Proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP/trombospondina 5) em doenças reumáticas prevalentes e infarto agudo do miocárdio / Ana Lígia Bender; orient. Henrique Luiz Staub; co-orient. Carlos Alberto von Mühlen. Porto Alegre: PUCRS, 2006.  
126f.: fig. tab.

Tese (Doutorado) – 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. TROMBOSPONDINAS. 2. MARCADORES BIOLÓGICOS. 3. PROTEÍNA OLIGOMÉRICA DA MATRIZ DA CARTILAGEM. 4. ARTRITE REUMATÓIDE. 5. OSTEOARTRITE. 6. INFARTO DO MIOCÁRDIO. 7. ESTUDOS DE CASOS E CONTROLES. I. Staub, Henrique Luiz. II. von Mühlen, Carlos Alberto. III. Título.

C.D.D. 616.72  
C.D.U. 616-0002.77⊕616-005.8(043.2)  
N.L.M. QU 55.7

Este trabalho foi subvencionado pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da PUCRS (PRPPG-PUCRS) e pelo Hospital São Lucas da PUCRS.

Os testes para dosagem da proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP/Trombospondina 5) foram gentilmente fornecidos pelas empresas INOVA inc., Califórnia, USA, e ANAMAR de Estocolmo, Suécia, por intermédio do Dr. Rufus Burlingame e do Dr. Carlos Alberto von Mühlen.

*Para minha filha Luísa Bender Cauduro.*

*Ao meu pai Werno, minha mãe Noely e minha irmã Ana Lúcia.*

*Ao Pai.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Henrique Luiz Staub, competente orientador.

Ao Dr. Carlos Alberto von Mühlen, o responsável pelo nascimento desse trabalho, pela competência e auxílio.

Ao Dr. Mauro Keiserman e equipe pelo apoio do Serviço de Reumatologia do Hospital São Lucas da PUCRS.

Ao Dr. Mário Wagner, pela competência, disponibilidade, orientação, ensino e estímulo ao estudo da epidemiologia clínica.

Ao Dr. Marcos Winkler, competente coordenador do Serviço de Hemoterapia do Hospital São Lucas da PUCRS, pela disponibilidade e colaboração juntamente com sua equipe na seleção do grupo controle.

Ao Dr. Marcus Franck pelo estímulo e apoio.

Aos colegas e amigos Dra. Terezinha Paz Munhoz, Myriam Fortes Perrenoud, Dr. Geraldo Atílio De Carli, Dra. Fernanda Bueno Morrone, Denise Milão, Dra. Temis Weber Furlaneto Corte, Dra. Virgínia Schmitt, Dra. Cristina Maria Morigushi Jeckel e Sirlei Santos da Silva por todo o apoio e incentivo.

À amiga querida Dra. Inês Guimarães da Silveira, médica reumatologista, competente e apaixonada pela vida e pelo seu trabalho, pelo apoio incondicional.

Ao Laboratório Clínico do Hospital São Lucas da PUCRS, especialmente aos colegas do setor de imunologia, pela disponibilidade.

À Diretora da Faculdade de Farmácia da PUCRS e querida amiga Dra. Flavia Valladão Thiesen, pelo apoio e incentivo.

À Sônia Aparecida da Silva Mantovani, e funcionários do curso de Pós-Graduação, pela competência, disponibilidade e organização.

À bibliotecária Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia, pela elaboração da ficha catalográfica.

Ao professor Dr. Francisco Rudiger pela revisão ortográfica.

Ao Laboratório Metanalysis, Porto Alegre, pelo auxílio. Especialmente à farmacêutica bioquímica Glória Kaiser.

A Inova Diagnostics, Inc., San Diego, EUA, pela colaboração nos testes sorológicos.

Ao Giquitibá Moraes de Melo pela competência de sempre e o excelente trabalho gráfico.

Às pessoas que me ajudam na organização da minha vida, querida amiga Genelci Terezinha Dellagostin Santos e Gabriele Helena da Silva.

Aos pacientes, que são o motivo do desenvolvimento da pesquisa diagnóstica.

Ao professor Dr. Sérgio de Meda Lamb, querido mestre que sempre me apoiou (em memória).

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Reitor, Vice-Reitor, diretores da Faculdade de Farmácia, professores, funcionários e alunos pela contribuição na minha formação em nível de Pós-Graduação.

## RESUMO

**Introdução:** A proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP) é uma glicoproteína não-colágena, pentamérica, pertencente à família das trombospondinas (TSPs). Participa de processos da estruturação da matriz extracelular, mobilidade celular e organização do citoesqueleto. A expressão da COMP foi evidenciada na cartilagem e humor vítreo, e também em células musculares lisas e mesenquimais, incluindo sinoviócitos e fibroblastos da derme. A COMP atua na estruturação da cartilagem ao interagir com fibrilas de colágenos I e II. O processo de cicatrização pós-infarto agudo do miocárdio (IAM), por sua vez, inclui alto teor de colágeno tipo I e preservação da matriz extracelular, sendo possível a participação da COMP nesta circunstância.

**Objetivo:** Verificar se níveis séricos de COMP, quando alterados, associam-se à presença de doenças reumáticas prevalentes (artrite reumatóide, osteoartrite) e de infarto agudo do miocárdio (IAM).

**Pacientes e Métodos:** Neste estudo de caso-controle, os casos consistiram de pacientes com artrite reumatóide (AR), osteoartrite (OA) e IAM. Os pacientes com AR e OA foram selecionados a partir de base de dados e biobanco autorizado com diagnóstico confirmado segundo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia. Os pacientes com IAM foram selecionados a partir de base de dados e biobanco autorizado, sendo o diagnóstico previamente confirmado por cardiologistas de acordo com critérios tradicionais. O grupo-controle consistiu de doadores de sangue selecionados consecutivamente, sem queixas reumáticas ou cardiovasculares na anamnese efetuada pelo hemoterapeuta. A COMP foi dosada quantitativamente por imunoensaio enzimático. Um nível de significância de 5% foi considerado para valores P. Para estimar o grau de associação entre níveis de COMP e doença, razões de chances (“odds ratios”, OR) foram calculadas. A comparação entre os grupos foi realizada com análise de variância. O desempenho diagnóstico da COMP nos grupos estudados foi apresentado através da sensibilidade, especificidade e razão de verossimilhança (“likelihood ratio”, LR).

**Resultados:** Foram estudados 269 indivíduos (100 controles, 63 com AR, 40 com OA e 66 com IAM). A média de idade nos grupos foi: controle =  $48 \pm 6$  anos; AR =  $54 \pm 14$  anos, OA =  $65 \pm 9$  anos e IAM =  $58 \pm 10$  anos ( $P < 0,05$  para os grupos IAM e OA em relação ao grupo controle e  $P > 0,05$  para o grupo AR em relação ao grupo controle). O sexo feminino

predominou nos grupos AR e OA, e o masculino nos grupos controle e IAM. A maioria dos indivíduos com AR e OA tinham menos de 10 anos de doença.

Os níveis médios de COMP ajustados para idade e sexo nos grupos controle, AR, OA e IAM foram respectivamente  $7,3 \pm 0,5$ ,  $12,9 \pm 0,7$ ,  $13,1 \pm 1,1$  e  $3,0 \pm 0,6$ , com diferença significativa de todos os grupos de casos em relação ao grupo-controle ( $P < 0,01$ ). O ponto de corte que melhor discriminou os grupos AR e OA foi 12 U/L. Para o grupo IAM, o ponto de corte mais discriminativo foi 4 U/L.

O desempenho da COMP na AR evidenciou especificidade de 95% (IC95% 88,7-98,4) e sensibilidade de 47,6% (IC95% 34,9-60,6). Quanto à probabilidade de desfecho AR, o LR positivo foi moderado (9,5, IC95% 3,9-23,3). Níveis de COMP acima de 12 U/L se associaram fortemente à presença de AR (OR 17,3, IC95% 5,7-55,7).

O desempenho da COMP na OA evidenciou especificidade de 95% (IC95% 88,7-98,4), e sensibilidade de 37,5% (IC95% 22,7-54,2). O LR positivo foi moderado (7,5, IC95% 2,9-19,3). Níveis de COMP acima de 12U/L se associaram fortemente à presença do desfecho OA (OR 11,4, IC95% 3,4-40,2).

O desempenho da COMP no IAM evidenciou especificidade de 82% (IC95% 73-89,0) e sensibilidade de 66,7% (IC95% 54-77,8). O LR positivo foi baixo (3,7, IC95% 2,4-5,8). Níveis de COMP abaixo de 4 U/L se associaram fortemente à ocorrência de IAM (OR 9,1, IC95% 4,2-20,1).

**Conclusões:** Níveis de COMP superiores a 12 U/L se associaram fortemente à AR e OA, e conferiram alta especificidade no diagnóstico dessas doenças. Níveis de COMP inferiores a 4 U/L se associaram definitivamente com IAM, e conferiram moderada especificidade. Níveis de COMP superiores a 12U/L cursaram com moderada probabilidade de desfecho AR e OA. Como um todo, alterações nos níveis séricos de COMP, usando-se os referidos pontos de corte, discriminaram pacientes com AR, OA e IAM de controles sadios.

**Palavras-chave:** Proteína oligomérica da matriz da cartilagem, COMP, trombospondina-5, artrite reumatóide, osteoartrite, infarto agudo do miocárdio.

## ABSTRACT

**Introduction:** The cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is a non-collagen, pentameric glycoprotein belonging to the thrombospondin family (TSPs). The COMP is involved in the structuration process of extracellular matrix, cell mobility and cytoskeletal organization. COMP expression has been proved in cartilage and vitreous humor, but also in smooth muscle and mesenchymal cells, including synoviocytes and dermal fibroblasts. COMP takes place in the structuration of cartilage by interacting with collagen I and II myofibrils. The post myocardial infarction cicatrization process, in turn, includes high expression of type I collagen and preservation of extracellular matrix, being possible a role for COMP in this circumstance.

**Objective:** To evaluate if serum COMP levels, when altered, associate to the presence of prevalent rheumatic diseases (rheumatoid arthritis, osteoarthritis) and acute myocardial infarction (AMI).

**Patients and Methods:** In this case-control study, cases comprised patients with rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA) and AMI. Patients with RA and OA were selected by database and authorized biobank with confirmed diagnosis according to the American College of Rheumatology criteria. Patients with AMI were selected also by database and authorized biobank, being diagnosis previously confirmed by Cardiologist according to classical criteria. The control group comprised blood donors consecutively selected, without rheumatic or cardiovascular complains in interview preceded by the Haemotherapeut. COMP was quantitatively assessed by immunoenzymatic assay. A 5% significance level was considered for P values. To estimate the grade of association of COMP levels with disease, odds ratios (OR) were calculated. Comparison of groups was accomplished by variance analysis. Diagnostic performance of COMP in the groups was obtained by calculating sensitivity, specificity, and likelihood ratios (LR).

**Results:** Two-hundred and sixty-nine individuals were studied (100 controls, 63 with RA, 40 with OA, and 66 with AMI). The mean age in the groups were: controls =  $48 \pm 6$  years; RA =  $54 \pm 14$  years; OA =  $65 \pm 9$  years and AMI =  $58 \pm 10$  years ( $P < 0.05$  for the AMI and OA groups compared to controls, and  $P > 0.05$  for the RA group compared to controls). The female gender predominated in the RA and OA groups, and the male gender in the control and AMI groups. The majority of individuals with RA and OA had disease for less than 10 years.

The mean COMP levels adjusted for age and sex in the control, RA, OA and AMI groups were respectively  $7.3\pm 0.5$ ,  $12.9\pm 0.7$ ,  $13.1\pm 1.1$  and  $3.0\pm 0.6$  U/L, being the difference of each group significant as compared to controls ( $P<0.01$ ). The cut-off which better discriminated the RA and OA groups was 12 U/L. For the AMI group, the most discriminative cut-off was 4 U/L.

The performance of COMP levels for RA showed specificity of 95% (IC95% 88.7-98.4) and sensitivity of 47.6% (IC95% 34.9-60.6). As to the probability of RA, the positive LR was moderate (9.5, IC95% 3.9-23.3). Levels of COMP above 12 U/L strongly associated to the presence of RA (OR 17.3, IC95% 5.7-55.7).

The performance of COMP levels for OA showed specificity of 95% (IC95% 88.7-98.4) and sensitivity of 37.5% (IC95% 22.7-54.2). The positive LR was moderate (7.5, IC95% 2.9-19.3). Levels of COMP above 12U/L strongly associated to the presence of OA (OR 11.4, IC95% 3.4-40.2).

The performance of COMP levels for AMI showed specificity of 82% (IC95% 73-8.0) and sensitivity of 66.7% (IC95% 54-77.8). The positive LR was low (3.7, IC95% 2.4-5.8). Levels of COMP below 4 U/L strongly associated to the presence of AMI (OR 9.1, IC95% 4.2-20.1).

**Conclusions:** Levels of COMP above 12 U/L strongly associated to RA and OA, and yielded high specificity for diagnosing these diseases. Levels of COMP below 4 U/L definely associated to AMI, and yielded a moderate specificity. Levels of COMP above 12 U/L indicated moderate probability of RA and OA. As a whole, abnormal COMP serum levels, utilizing the referred cut-off, discriminated patients with RA, OA and AMI in comparison to the control group.

**Keywords:** Cartilage oligomeric matrix protein (COMP, thrombospondin-5, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, acute myocardial infraction.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alguns marcadores biológicos de possível uso na avaliação da atividade da doença na artrite reumatóide. ....	36
Tabela 2 - Fatores de risco independentes para infarto agudo do miocárdio. ....	45
Tabela 3 - Força relativa do likelihood ratio (razão de verossimilhança). ....	63
Tabela 4 - Força de associação do odds ratio. ....	63
Tabela 5 - Características da amostra analisada. ....	65
Tabela 6 - Características da amostra analisada (média etária por sexo). ....	66
Tabela 7 - Tempo de doença nos grupos com doença reumática prevalente: osteoartrite (OA) e artrite reumatóide (AR). ....	66
Tabela 8 - Características do grupo com infarto agudo do miocárdio (IAM). ....	67
Tabela 9 - Frequência de COMP no grupo controle. ....	67
Tabela 10 - Níveis de COMP (U/L) no grupo controle comparado ao grupo AR. ....	70
Tabela 11 - Níveis de COMP (U/L) grupo controle comparado ao grupo OA. ....	71
Tabela 12 - Níveis de COMP (U/L) no grupo controle comparado ao grupo IAM. ....	71
Tabela 13 - Likelihood ratios (LR) dos diversos grupos diagnósticos em relação ao grupo controle para diferentes níveis de COMP. ....	72
Tabela 14 - Desempenho da COMP no diagnóstico da AR. ....	73
Tabela 15 - Desempenho da COMP no diagnóstico da OA. ....	74
Tabela 16 - Desempenho da COMP no diagnóstico do IAM. ....	75

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo esquemático da arquitetura dos domínios dos subgrupos A e B das trombospondinas.....	25
Figura 2 - Diagrama esquemático da organização molecular das subunidades das trombospondinas e suas propriedades.....	26
Figura 3 - Estrutura da COMP.....	29
Figura 4 - Vias envolvidas na inflamação e destruição na articulação reumatóide.....	33
Figura 5 - Estágios do desenvolvimento de uma placa aterosclerótica.....	47
Figura 6 - Esquema da evolução de um ateroma. ....	48
Figura 7 - a-c: estágios de mitose em miócitos humanos. Metáfase (a), cariocinese (b) e citocinese (c): fluorescência verde (iodeto de propídio).....	50
Figura 8 - Imunocoloração de uma artéria mamária interna. ....	52
Figura 9 - Curva de distribuição normal dos doadores de sangue avaliados por AnaMar™. 60	
Figura 10 - Histograma de frequências de COMP no grupo controle .....	68
Figura 11 - Valores de COMP (U/L) apresentados em gráficos de <i>boxplot</i> seguidos de estatísticas descritivas para a comparação de quatro grupos de indivíduos: controle, artrite reumatóide (AR), osteoartrite (OA) e infarto agudo do miocárdio (IAM). ....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACR: Colégio Americano de Reumatologia (“*American College of Rheumatology*”)
- ADAMTS: desintegrina metaloproteinase com desenho de trombospondina (“*disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*”)
- AFA: anticorpos anti-filagrina (“*antifilagrin antibodies*”)
- AKA: anticorpos anti-queratina (“*antikeratin antibodies*”)
- Anti: anticorpo
- AR: artrite reumatóide
- BSP: sialoproteína óssea (“*bone sialoprotein*”)
- CAD: doença arterial coronariana (“*coronary artery disease*”)
- CCP: peptídeo citrulinado cíclico (“*cytrullinated cyclic peptide*”)
- cDNA: DNA circular (“*circle desoxyribonucleic acid*”)
- CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
- CLR: repetição tipo calmodulina (“*calmodulin repeat.*”)
- COMP: proteína oligomérica da matriz da cartilagem (“*cartilage oligomeric matrix protein*”)
- DMTC: doença mista do tecido conjuntivo
- DMARD: fármaco anti-reumático modificador de doença
- EGF: fator de crescimento epidermal (“*epidermal growth factor*”)
- ECM: matriz extracelular (“*extracellular matrix*”)
- ELISA: teste imunoenzimático (“*enzyme linked immunosorbent assay*”)
- FAP: fator antiperinuclear
- GH: hormônio do crescimento (“*growth hormone*”)
- HLA: antígenos leucocitários humanos (“*human leucocyte antigen*”)
- IAM: infarto agudo do miocárdio
- ICAM : molécula de adesão intercelular (“*intercellular adhesion molecules-1*”)
- IC95%: intervalo de confiança de 95%
- Ig: imunoglobulina
- IGF-I: fator de crescimento insulina-like tipo I (“*insulin-like growth factor I*”)
- IL: interleucina
- kDa: quilodaltons
- K-L: Kellgren-Lawrence
- LES: lupus eritematoso sistêmico

LR: “*likelihood ratio*” (razão de verossimilhança)

MATN3: matrilina-3

MED: displasia epifiseal múltipla (“*Multiple Epiphyseal Dysplasia*”)

MMPs: metaloproteinases da matriz (“*matrix metalloproteinases*”)

mRNA: RNA mensageiro (“*Messenger Ribonucleic Acid*”)

OA: osteoartrite

OR: razão de chances (“*odds ratio*”)

PSACH: pseudoacondroplasia (“*Pseudoachondroplasia*”)

PCR: proteína C Reativa

TSP: trombospondina (“*thrombospondin*”)

RR: risco relativo

SAA: soroamiloide A

TGF: fator de crescimento e transformação (“*transforming growth factor*”)

TIMPs: inibidor tecidual das metaloproteinases da matriz (“*tissue inhibitors of MMPs*”)

TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa (“*tumoral necrosis factor*”)

VPN: valor preditivo negativo

VPP: valor preditivo positivo

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	22
2.1 Matriz Extracelular .....	22
2.2 Trombospondinas .....	24
2.2.1 Conceito .....	24
2.2.2 COMP/TSP-5 .....	26
2.2.3 Cinética da COMP .....	29
2.2.4 Trombospondinas em indivíduos saudáveis .....	31
2.2.5 Secreção patofisiológica da COMP/TSP-5 .....	32
2.3 Artrite Reumatóide .....	32
2.3.1 Conceito .....	32
2.3.2 Diagnóstico .....	34
2.3.3 Fatores de risco .....	34
2.3.4 Marcadores .....	34
2.3.4.1 Marcadores específicos da doença .....	35
2.3.4.1.1 Fator reumatóide .....	35
2.3.4.1.2 Anticorpos antifilagrina .....	35
2.3.4.2 Marcadores genéticos .....	37
2.3.4.3 Marcadores inflamatórios .....	37
2.3.4.3.1 Proteínas de fase aguda .....	38
2.3.5 COMP em AR .....	38
2.4 Osteoartrite .....	39
2.4.1 Conceito .....	39
2.4.2 Diagnóstico .....	40
2.4.3 Fatores de risco .....	41
2.4.3.1 Fatores de risco sistêmicos .....	41
2.4.3.2 Fatores de risco mecânicos .....	42
2.4.4 Marcadores de Osteoartrite .....	42
2.4.5 COMP em Osteoartrite .....	43
2.5 Aterosclerose e Infarto Agudo do Miocárdio .....	44
2.5.1 Fatores de risco do infarto agudo do miocárdio .....	44

2.5.2 Patobiologia da matriz extracelular do tecido cardíaco .....	45
2.5.3 Formação da placa aterosclerótica.....	46
2.5.4 Cicatrização do infarto.....	49
2.5.5 COMP em Aterosclerose .....	50
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	53
3.1 HIPÓTESE.....	54
3.1.1 Hipótese Conceitual.....	54
3.1.2 Hipótese operacional .....	54
4 OBJETIVO .....	55
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
5.1 Delineamento do Estudo.....	56
5.2 População.....	56
5.2.1 Características da População.....	56
5.2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão .....	57
5.3 Local.....	58
5.4 Período de Tempo .....	59
5.5 Metodologia .....	59
5.5.1 Dosagem da COMP .....	59
5.6 Controle do Erro Sistemático.....	61
5.6.1 Vieses de seleção.....	61
5.6.2 Vieses de aferição.....	61
5.6.3 Vieses de confusão .....	62
5.7 Análise Estatística .....	62
5.8 Ética.....	64
6 RESULTADOS .....	65
6.1 Características clínico demográficas da amostra analisada.....	65
6.2 Performance da COMP nos Controles Saudáveis Analisados.....	67
6.3 Desempenho da COMP/TSP-5 nos grupos estudados .....	68
6.4 Comportamento da COMP/TSP-5 nos grupos caso em relação ao grupo controle .....	69
6.5 <i>Likelihood ratio</i> (Razão de verossimilhança) .....	71
6.6 Desempenho da COMP nos Grupos Analisados.....	72
7 DISCUSSÃO .....	76
7.1 Possíveis interferentes analíticos: influência da cinética da COMP nos níveis séricos .	77
7.2 Possíveis interferentes analíticos: reatividade cruzada com a TSP-1 .....	79

7.3 Possíveis interferentes analíticos: fragmentos de COMP e anticorpos de captura no sistema diagnóstico (“ <i>kit</i> ”).....	79
7.4 Fatores de Confusão .....	80
7.5 COMP no Grupo Controle.....	81
7.6 COMP em Artrite Reumatóide (AR).....	82
7.7 COMP em Osteoartrite (OA).....	84
7.8 COMP em Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) .....	87
8 CONCLUSÕES .....	93
9 PERSPECTIVAS .....	94
10 REFERÊNCIAS.....	96
ANEXOS	109

## 1 INTRODUÇÃO

O tratamento precoce da artrite reumatóide (AR) pode melhorar o prognóstico da doença. Assim, é de suma importância saber o mais precocemente possível se a doença terá evolução branda ou severa (Jääntti et al., 2000; Scott, 2000). A avaliação radiológica permanece a pedra angular no acompanhamento da terapêutica em AR, mas tem desvantagem importante: grande defasagem de tempo para mostrar alterações após a intervenção terapêutica. Isto tem resultado em uma intensa busca por preditores de desfecho na AR. A necessidade de melhor monitoramento das decisões clínicas e os aspectos de custo-benefício, especialmente alto para novos agentes biológicos, como os inibidores do TNF- $\alpha$  justificam essa busca (den Broeder et al., 2002).

São muitos os fatores prognósticos associados à AR avaliados através de estudos clínicos, laboratoriais, radiológicos, genéticos e sócio-demográficos. O valor preditivo destes marcadores prognósticos é baixo e inconsistente por uma série de razões, como, por exemplo, o critério de seleção de pacientes, tempo de seguimento e medida do desfecho. Além disso, o tratamento mais efetivo da AR atingido recentemente pode modificar o valor preditivo dos marcadores prognósticos (Jääntti et al., 2000).

Assim como a AR, a osteoartrite (OA) é uma doença articular comum nas populações estudadas. Atualmente a doença é diagnosticada através de critérios clínicos e/ou radiográficos que permitem detectar a doença apenas em estágios avançados. Um achado importante no processo é a alteração do balanço normal entre a síntese e a degradação das macromoléculas da matriz na cartilagem articular e osso subcondral. Também na OA, a quantificação sérica de macromoléculas tecido-específicas ou fragmentos oferece uma ferramenta promissora para o estudo dos mecanismos patogênicos de dano tecidual (Petersson et al., 1998a).

Neste cenário, surgiu a proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP), uma proteína não colágena pertencente à família das trombospondinas (TSPs), importante na estruturação da cartilagem. Entre as vantagens potenciais da COMP como marcador biológico da artrite está sua abundância na cartilagem articular. Para o desenvolvimento de um marcador da cartilagem é crítica a compreensão de sua distribuição em outras fontes além do tecido articular (Di Cesare et al., 1997).

A COMP é uma proteína da matriz extracelular da cartilagem. Uma propriedade comum das proteínas de matriz extracelular é a sua alta expressão durante a embriogênese,

caindo após o nascimento e reaparecendo em altos níveis durante o crescimento tumoral e após injúria tecidual, indicando um importante papel dessas proteínas na migração e proliferação de células malignas, cicatrização de ferimentos e remodelagem da matriz extracelular. Essas proteínas podem regular a função celular (Schellings et al., 2004).

A presença da COMP somente no tecido articular foi questionada nos estudos de Riessen e colaboradores, que a encontraram expressa por células musculares lisas vasculares humanas de artérias normais, ateroscleróticas e restenóticas (Riessen et al., 2001). Xiao e colaboradores a encontraram expressa em hepatocarcinoma, mas não em fígado normal ou cirrótico (Xiao et al., 2004).

Assim, cabe avaliar se, estando o mRNA da COMP expresso em placa aterosclerótica, a proteína é secretada e é passível de detecção sorológica. Ela é importante fator de confusão em caso de coexistência de doença articular e aterosclerótica sendo utilizada como marcador de dano articular.

Além disso, o papel das trombospondinas na cicatrização e remodelamento do tecido cardíaco merece atenção especial. A relevância do processo de remodelamento após o infarto do miocárdio na sobrevida do paciente está bem documentada. A excessiva dilatação ventricular aumenta a mortalidade (Nian et al., 2004). A remodelagem da matriz extracelular cardíaca durante e após o infarto do miocárdio é uma tentativa de restaurar a mecânica da área infartada à distensão (Jugdutt, 2003a).

Durante os primeiros dias após o infarto o processo patológico dominante é inflamação e necrose. A fase necrótica inicia-se em poucas horas, quando o tecido no local do infarto começa a enrigecer, e termina quando o número de fibroblastos e a quantidade de novo colágeno começam a aumentar rapidamente no infarto cicatrizado (aproximadamente 7 dias após o infarto em humanos). O mecanismo de infarto durante este período crítico é ainda pouco compreendido (Holmes et al., 2005).

Experimento em modelo animal evidenciou que mais de 90% de ratos que não expressavam a trombospondina-2 morriam após o infarto do miocárdio devido à ruptura cardíaca, o que sugere que as trombospondinas são necessárias para manter uma estrutura cardíaca normal e função após injúria miocárdica (Cleutjens et al., 1999).

As alterações pós-infarto e propriedades dos miócitos ativos na matriz extracelular estão sendo investigadas. No entanto, pouca atenção vem sendo dada à ligação dos miócitos a outros componentes e à organização da matriz extracelular (Holmes et al., 2005). A remodelagem da matriz extracelular de colágeno tem um importante papel na reestruturação do ventrículo esquerdo, onde a ruptura ou composição defeituosa da matriz extracelular

promove dilatação e ruptura do ventrículo (Jungdutt, 2003a). A função da COMP na regulação e montagem das fibrilas, bem como na manutenção da rede de colágeno articular (Rosenberg et al., 1998) é conhecida, no entanto, sua presença em outros tecidos suscita interesse. Em particular, de avaliar seu comportamento na estruturação das fibras de colágeno na fase de cicatrização do infarto.

O estudo do comportamento do 5º membro da família das trombospondinas, a COMP, foi viabilizado devido à existência de grupo de pacientes com clínica bem definida (doença reumática prevalente e infarto agudo do miocárdio) e biobanco disponível. A verificação do ponto de corte em um grupo de indivíduos saudáveis foi necessária ao conhecimento dos níveis fisiológicos da COMP.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Matriz Extracelular

A matriz extracelular (ECM) tem um papel crucial na forma, migração, proliferação, diferenciação e muitas outras funções celulares altamente especializadas (Lahav, 1993). É uma sólida rede de proteínas secretadas pelas próprias células ligando os meios intra e extracelulares insolubilizando-as no espaço extracelular por ligações cruzadas (Adams, 2002; Michel, 2003). A ressolubilização ocorre pela ação de enzimas proteolíticas (Michel, 2003).

A composição e estrutura da matriz extracelular diferem de tecido a tecido, podendo sofrer contínuas mudanças no mesmo tecido e, assim, efeitos temporais e espaciais nas células que estão em contato com ele. Existe uma contínua alça de retroalimentação que governa o comportamento celular e a composição da matriz (Lahav, 1993; Maurer et al., 1996).

O contato célula-matriz liga os meios intra e extracelulares, sendo fundamental para células e tecidos de organismos multicelulares, e essencial na fisiologia tecidual normal (Adams, 2002). Para as células aderentes, o ancoramento à matriz é condição necessária para a sobrevivência (Michel, 2003).

Na matriz extracelular, a multivalência é muito importante devido à necessidade de interações com receptores da superfície celular e outras proteínas (Engel, 2004; Guo et al., 1998). A anormalidade no contato célula-matriz pode levar a doenças crônicas, o que torna fundamental a compreensão do papel biológico da adesão e motilidade celular na saúde e na doença (Adams, 2002).

As proteínas da matriz extracelular compreendem uma grande variedade de proteínas que ligam o cálcio. Os domínios que ligam cálcio e as proteínas servem para funções de estocagem de cálcio, íons envolvidos na estabilização da estrutura ou participando na catálise enzimática (Lahav, 1993; Maurer et al., 1996). Nesse contexto, os condrócitos, células musculares lisas e fibroblastos estão relacionados pela característica de serem responsáveis pelo contato da célula à matriz tecidual contrátil (Adams, 2002). Uma matriz extracelular bem organizada é necessária também para manter a resistência e organização do tecido cardíaco e está envolvida na comunicação entre diferentes células cardíacas (Schellings et al., 2004).

Há completa correlação entre síntese, ligação à membrana de proteínas produzidas endogenamente e secretadas, e o ataque das células às superfícies cobertas com

trombospondinas (TSPs). A síntese ativa de TSPs pelas células é um requerimento necessário à ligação e ataque à proteína pela célula (Lahav, 1993).

O *turnover* tecidual normal pode ser visto como um balanço entre degradação e síntese de macromoléculas que constituem a matriz extracelular. Este processo é altamente regulado por enzimas proteolíticas, as metaloproteinases da matriz (MMPs), e seus inibidores (TIMPs), os inibidores teciduais das MMPs em vários níveis, incluindo síntese, secreção, ativação e inibição. A destruição do tecido ocorre quando a degradação mediada pelas proteinases excede a síntese, processo altamente influenciado por citocinas e fatores de crescimento que estimulam a síntese da matriz bem como a produção de proteinases e/ou seus inibidores endógenos. A degradação da matriz extracelular pode ser crucial para o processo de cicatrização (Rowan, 2001; Cleutjens et al., 1995).

Muitas das proteínas de matriz extracelular mostram uma aumentada expressão no coração em resposta à injúria ou estresse, o que sugere uma função vital dessas proteínas na cicatrização do ferimento e remodelamento ventricular. Essas proteínas de matriz celular podem alterar o remodelamento cardíaco de diferentes formas. Primeiro, elas podem iniciar o desprendimento entre os cardiomiócitos e a matriz extracelular. Segundo, as proteínas de matriz extracelular podem diminuir ou aumentar em função das proteinases envolvidas no remodelamento cardíaco e suas funções em diferentes doenças cardíacas (Schellings et al., 2004).

Experimento com ratos nulos quanto à presença de proteínas de matriz celular mostrou que esses animais sobreviviam à embriogênese, contudo, mostravam uma resposta alterada à cicatrização, com alterações na resposta inflamatória, angiogênese, fibrilogênese do colágeno ou deposição à matriz (Schellings et al., 2004).

A matriz cardíaca é uma elaborada rede de proteínas interconectadas, incluindo colágeno, elastina e fibronectina, interagindo com integrinas e adesão focal de quinases à junção célula-matriz. A degradação do colágeno e produção pós-infarto constitui alteração protéica dominante na matriz miocárdica. As citocinas têm um importante papel na regulação da deposição do colágeno, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) e osteopontina (Nian et al., 2004). A matriz extracelular tem um papel crítico tanto no remodelamento precoce quanto tardio pós-infarto do miocárdio (Jugdutt, 2006).

A cartilagem articular consiste de condrócitos alojados em uma matriz estruturada. As principais macromoléculas são proteoglicanas e colágeno tipo II. O desequilíbrio entre a quebra da matriz da cartilagem e diminuição na síntese de seus componentes pelos

condrócitos resulta na destruição da cartilagem na AR. A ativação de citocinas (interleucina 1 (IL-1), TNF, interleucina 17 (IL-17), oncostatinas) estimula os condrócitos a liberar proteases destrutivas que levam à perda de proteoglicanas e destruição dos feixes de colágeno. Duas dessas macromoléculas da cartilagem detectáveis no líquido sinovial e no soro são agregam e a proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP) (Skoumal et al., 2003).

## 2.2 Trombospondinas

### 2.2.1 Conceito

As trombospondinas (TSPs) foram descritas primeiramente em 1971 e acreditava-se serem um componente das plaquetas. As TSPs são uma família de glicoproteínas homólogas com distribuição variável, com capacidade de ligar íons cálcio (Adams, 2004; Lahav, 1993). O aspecto estrutural é semelhante a um *bouquet* de flores, onde o domínio “*coiled-coil*” provê o ponto de conexão entre os três braços das TSPs 1 e 2, ou 5 braços das TSPs 3, 4 e 5. Esta estrutura é quem provavelmente promova a interação multivalente dos domínios carboxiterminais com os receptores celulares de maneira semelhante à interação de C1q com as imunoglobulinas (Engel et al., 2004). Os vários sítios de ataque possuem diferentes afinidades à superfície celular (Figuras 1 e 2) (Lahav, 1993).

Todos os membros da família do gene das trombospondinas são similares em termos de seqüência de aminoácidos do domínio tipo 3 e carboxiterminal. Cada proteína membro da família das TSPs tem uma seqüência de aminoácidos na porção 5' final que é distinta ou, como no caso da COMP, está faltando totalmente. As regiões variáveis são adequadas unicamente a interações com tipos celulares específicos, e as regiões conservadas cumprem uma função que é comum a todos os tipos de células. A TSP1 possui a capacidade de modular a migração, crescimento e proliferação celular. Estimula a proliferação de células musculares lisas e inibe o crescimento de células endoteliais (Newton et al., 1994).

Todos os membros da família das TSPs (1,2,3,4 e 5) ligam cálcio e participam do ataque celular (Adams e Lawler 2004). Estão envolvidos no crescimento, proliferação (angiogênese), mobilidade (Majack et al., 1988; Taraboletti et al., 1987; Adams e Lawler 2004) e organização do citoesqueleto celular (Lahav, 1993). A modulação da proliferação celular com efeitos

indiretos na sua função é realizada através da regulação de proteases extracelulares e ativação ou inibição de citocinas e fatores de crescimento (Adams e Lawler 2004).

As TSPs participam dos processos inflamatórios (Mansfield et al., 1990), hemostáticos e cicatrização de ferimentos (Murphy-Ullrich et al., 1992; Lahav, 1993). Na doença, há relatos da participação das TSPs no câncer tanto como suporte quanto inibição à metástase (Lahav, 1993).

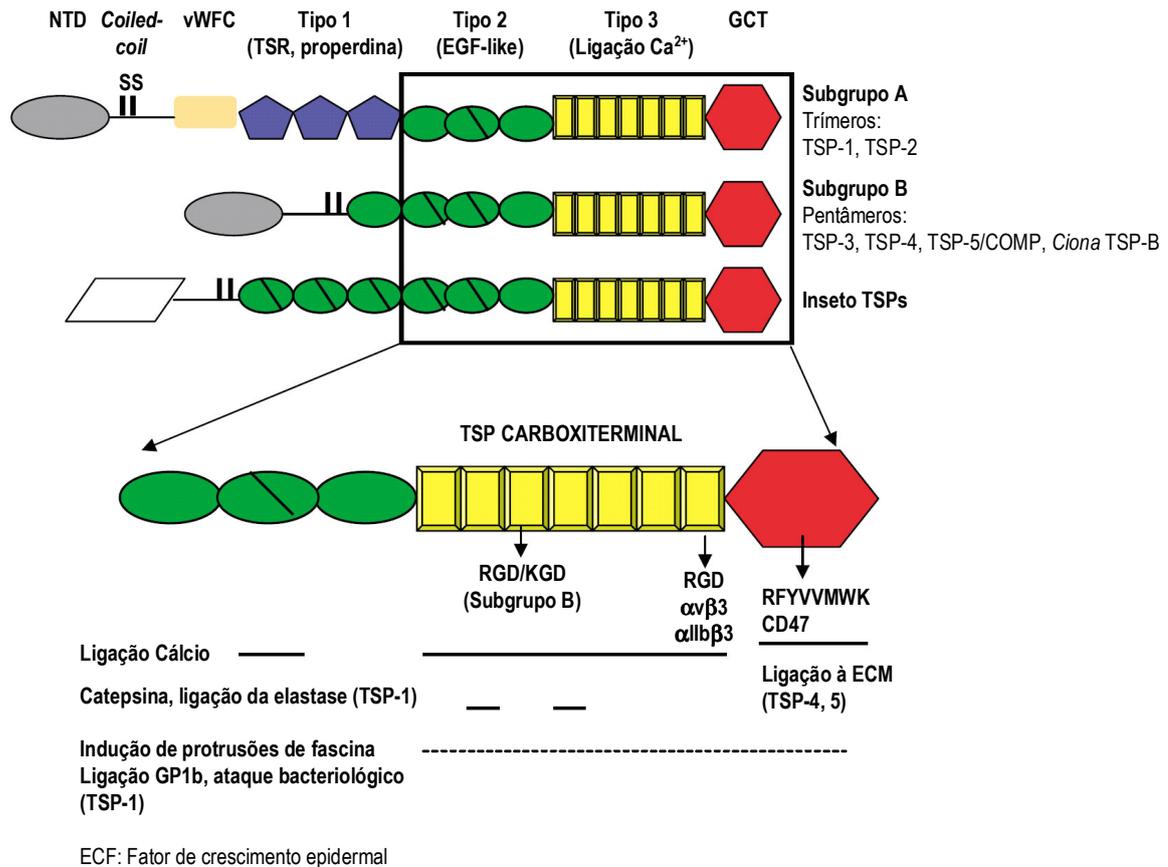
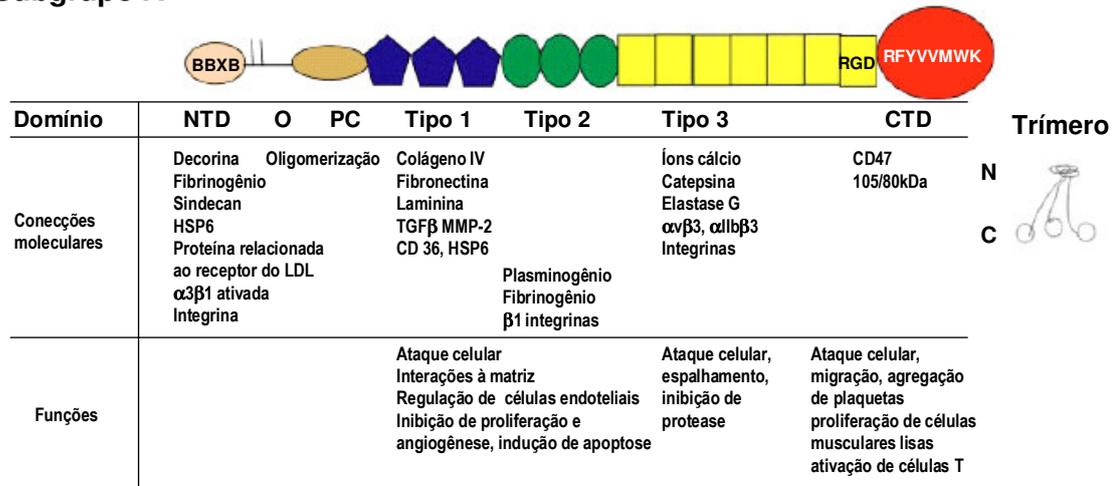


Figura 1 - Modelo esquemático da arquitetura dos domínios dos subgrupos A e B das trombospondinas.

Em versão aumentada o domínio carboxiterminal conservado. O domínio EGF indica o domínio de ligação ao cálcio. NTD, domínio aminoterminal. GTC, término carboxiglobular. Adaptado de Adams, 2004.

### Subgrupo A



### Subgrupo B

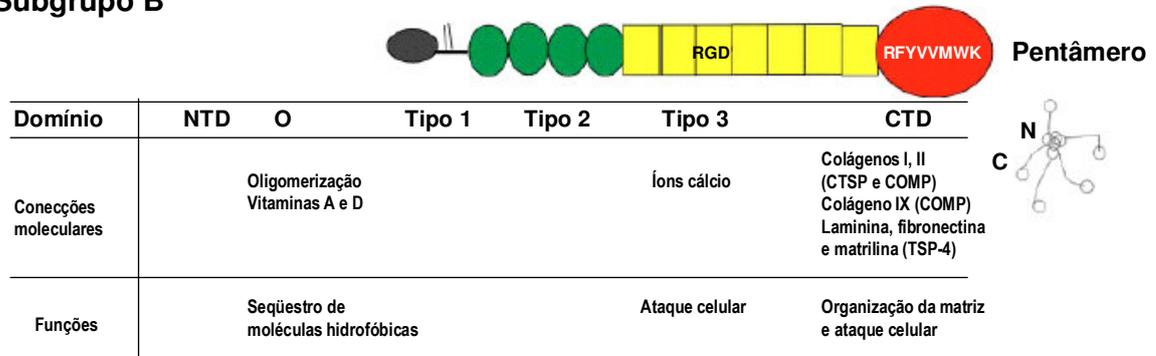


Figura 2 - Diagrama esquemático da organização molecular das subunidades das trombospondinas e suas propriedades.

Para os domínios: NTD, domínio aminoterminal; O, seqüência de oligomerização; PC, região homóloga ao procolágeno; Tipos 1, 2 e 3, os três tipos de unidades repetidas; CTD, domínio carboxiterminal. Os desenhos e ligações bem organizadas e conservadas são mostrados nas subunidades. Interações moleculares e funções que têm sido descritas dentro das subunidades são mostradas abaixo do desenho em cada domínio. Para o grupo A, a ligação do plasminogênio, fibrinogênio e  $\beta 1$ -integrinas de um modo geral tem sido localizada na região da haste central.

Adaptado de Adams, 2001.

#### 2.2.2 COMP/TSP-5

A proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP) é uma glicoproteína não colágena pentamérica de 755 aminoácidos com peso molecular de 82.700 daltons, 2460 pares de bases e um único quadro de leitura do nucleotídeo 26 a 2296. Como a hidroxiprolina não pode ser encontrada, a COMP não contém região característica do colágeno (Hedbom et al.,

1992). O homopolímero é composto por cinco subunidades idênticas ligadas por pontes dissulfeto (Oldberg et al., 1992). Cada monômero é composto de um domínio aminoterminal rico em cisteína, quatro domínios semelhantes ao fator de crescimento da epiderme (EGF), 8 repetições tipo calmodulina e um domínio globular carboxiterminal. O domínio rico em cisteína é responsável pela montagem dos monômeros em pentâmeros através de pontes dissulfeto intercadeia. A oligomerização através da formação de feixes por alfa-hélices é comum em muitas proteínas. A mesma estrutura da COMP ocorre nas TSPs 3 e 4. A porção carboxiterminal é homóloga às trombospondinas (TSPs) e pode estar envolvida na ligação a células, como condrócitos e proteínas na matriz extracelular (figura 2) (Malashkevich et al., 1996; Hedbom et al., 1992; Oldberg et al., 1992).

A análise do cDNA da COMP revelou uma proteína estruturalmente relacionada às trombospondinas, carecendo em torno de 40% dos resíduos de aminoácidos aminoterminais. A similaridade é mais pronunciada no domínio carboxiterminal e no domínio tipo 3, região da molécula que representa uma série contínua de sítios de ligação ao cálcio, onde aproximadamente 60% dos resíduos estão localizados em posições homólogas. A região tipo 2 é 41% idêntica e a COMP contém uma repetição extra, comparado às trombospondinas (Figuras 1 e 2). A sequência da COMP humana descrita por Newton e colaboradores é 90% idêntica à sequência da COMP de ratos. Similaridade comparada à identidade entre as TSPs 1 humana (94%) e de ratos (89,3%) (Newton et al., 1994). Os clones humanos, bovinos e de rato apresentaram identidade na COMP de 83%, 84% e 95% respectivamente (Fang et al., 2000).

A similaridade entre a COMP e as trombospondinas sugere que evoluíram de um gene ancestral comum e realizam funções ora similares e ora distintas entre si. A comparação das sequências de aminoácidos nos domínios 2 e 3 da COMP com a das trombospondinas mostrou que a COMP é o produto de um único gene localizado no cromossomo 19, uma banda de 8 quilobases (Oldberg et al., 1992; Newton et al., 1994; Di Cesare et al., 1994).

Williams e colaboradores realizaram estudo em 160 gêmeos homozigóticos e 349 dizigóticos onde observaram uma correlação nos níveis séricos de COMP de 0,72 (IC95%: 0,65 a 0,80) e 0,47 (IC95%: 0,39 a 0,55) respectivamente, o que equivale a uma estimativa de hereditariedade de 40% (IC95%: 20 a 60%) (Williams et al., 2006).

O gene que codifica a COMP é regulado positivamente tanto pelo hormônio do crescimento (GH) quanto pelo fator de crescimento insulina-like tipo I (IGF-I) em cultura primária de condrócitos humanos (Bjarnason et al., 2004; Tian e Stogiannidis, 2006). *In vitro* houve indução da síntese e secreção da COMP em células sinoviais e condrócitos articulares

em presença do fator de crescimento e transformação beta 1 (TGF- $\beta$ 1) (Recklies et al., 1998). Estudo com crianças pré-púberes de baixa estatura, tratadas com o hormônio do crescimento (GH), mostrou que a COMP sérica aumentava após o início do tratamento (Bjarnason et al., 2004).

Análise em microscopia eletrônica da COMP mostrou cinco unidades globulares conectadas por finas hastes flexíveis a um domínio central (Mörgelin et al., 1992). A estrutura resultante é um poro que pode atuar como um canal iônico (Malashkevich et al., 1996). Somente dois locais polares interrompem a sequência hidrofóbica do poro. Próximo à porção carboxiterminal um anel de glutaminas permite a ligação de íons cloreto. Próximo à porção aminoterminal está localizado um anel de grupos hidroxila de treoninas (Guo et al., 1998). O ancoramento da COMP à matriz da cartilagem é dependente de cátions divalentes, mostrando dependência em concentração e composição do seu ambiente iônico para ancoragem (Mörgelin et al., 1992; Kleerekoper et al., 2002).

A hidrofobicidade e geometria do canal no domínio “*coiled coil*” da COMP sugere uma ligação para retinóides, vitamina D<sub>3</sub> e outros compostos hidrofóbicos. Os retinóides (vitamina A) são importantes durante o desenvolvimento de órgãos e tecidos (atuam como fatores de crescimento em muitos tipos celulares). A vitamina D<sub>3</sub> é elemento chave ao cálcio e homeostasia óssea, tendo também função de regular a diferenciação e proliferação celular (Guo et al., 1998)

As mutações na COMP afetam não somente sua secreção, mas também a do colágeno tipo IX e matrilina-3 (MATN3), resultando em presença diminuída das três moléculas na matriz. A organização da matriz extracelular não pode ocorrer na ausência de COMP, colágeno tipo IX e MATN3. A síntese dessas três proteínas inicia-se ao mesmo tempo e estão localizadas em torno de condrócitos normais e na matriz extracelular (Hecht et al., 2005).

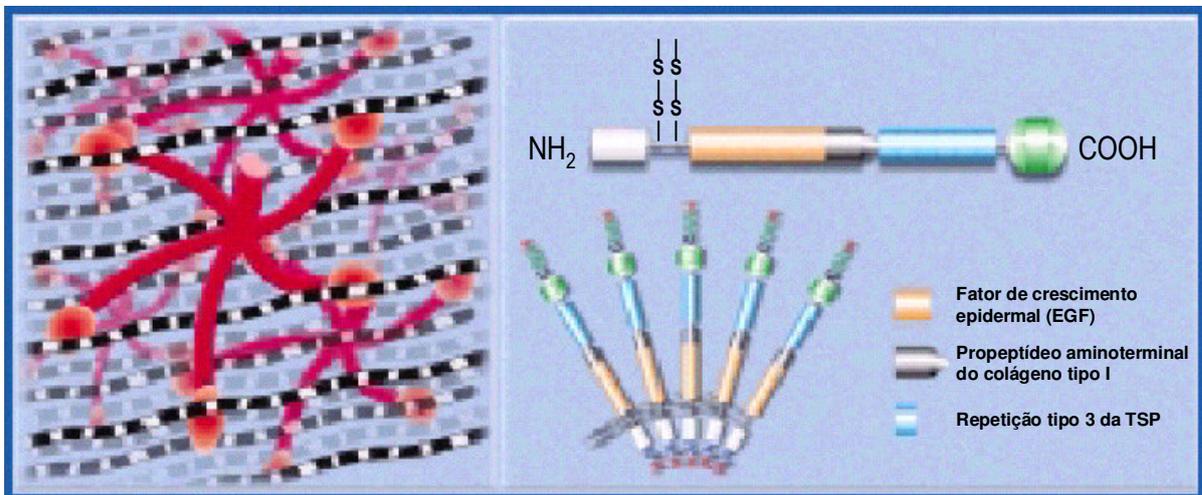
Até o momento, a evidência da expressão da COMP fora do sistema esquelético é limitada (Riessen et al., 2001).

O mRNA da COMP e a proteína foram detectados em osteoblastos da linhagem MG-63 (Di Cesare et al., 2000) e expressão da COMP em todos os tipos de cartilagem, humor vítreo nos olhos, tendões, células musculares lisas vasculares (Svensson et al., 2002) e células de vários tecidos incluindo sinoviócitos e fibroblastos da derme (Dodge et al., 1998). É encontrada em ligamentos, menisco e sinóvia (Di Cesare et al., 1994; Petersson et al., 1998b). Oldberg e colaboradores observaram uma baixa expressão do mRNA da COMP em tecido aórtico de ratos mas não perseguiram esse achado posteriormente (Oldberg et al., 1992,

Riessen et al., 2001). Em tecido de rato adulto, a COMP foi expressa também no coração (Fang et al., 2000).

Através de técnicas de hibridização *in situ* e imunohistoquímica, Xiao e colaboradores encontraram superexpressão do mRNA da COMP e localizaram a proteína no citoplasma de células de carcinoma hepatocelular (Xiao et al., 2004).

A COMP Interage com colágeno tipos I e II (figura 3), procolágeno I e II e fibronectina de maneira dependente de cátions divalentes, onde o zinco e o níquel, e não o cálcio, magnésio ou manganês, promovem a ligação. (Skoumal et al., 2003; Rosenberg et al., 1998; Di Cesare et al., 2002). Liga-se também ao colágeno tipo IX (Svensson et al., 2002).



Fibras de colágeno

Figura 3 - Estrutura da COMP.

Adaptado de AnaMar Medical™, 2004.

### 2.2.3 Cinética da COMP

A liberação da COMP a partir de cartilagem articular não se restringe a uma forma de doença articular específica. Sua concentração sérica pode refletir a liberação de todas as cartilagens, podendo não ser derivada somente das articulações (Saxne e Heinegård, 1992). O aumento na expressão da COMP em tecidos inflamatórios sugere sua regulação por citocinas (Di Cesare et al., 1999). O aumento nos níveis de COMP nos fluidos corporais pode ser indicativo de sinovite bem como erosão articular acelerada (Recklies et al., 1998).

Pouca informação está disponível a respeito da eliminação da COMP na circulação (Skoumal et al., 2003). Estudos em pacientes com AR e OA mostraram que a concentração sérica da COMP é estável durante o dia (Vilim et al., 2003; Andersson et al., 2006).

A diferença entre os níveis circulantes da COMP e de proteoglicanas pode também ser influenciada por diferentes taxas de eliminação. A COMP é liberada da cartilagem tanto durante o metabolismo normal da cartilagem quanto durante condições patológicas. Durante um dado tempo, parece haver quebra e nova síntese, com reparo tecidual. Desse modo o aumento na liberação também refletiria a substituição das moléculas perdidas. A COMP é liberada como um fragmento, mostrando que a quebra é um pré-requisito da liberação (Saxne e Heinegård, 1992).

A liberação da COMP ocorre a uma taxa constante (Neidhart et al., 1997), com um tempo de difusão dos fragmentos ao sangue de 30 minutos ou menos e um retardo metabólico em torno de 5 a 6 horas (Mündermann et al., 2005). O tempo de meia vida é estimado em torno de 7 horas. Isso significa que os altos níveis de COMP observados em certos grupos de pacientes refletem um nível muito alto de influxo da COMP proveniente dos tecidos para a circulação (Andersson et al., 2006). Sua concentração dependerá do volume de líquido sinovial (Neidhart et al., 1997) e seus níveis séricos são afetados por reguladores químicos (citocinas, metaloproteinases) ou físicos, como, por exemplo, a drenagem linfática e atividades físicas antes da coleta sanguínea. (Kersting et al., 2005; Münderman et al., 2005)

Baixos níveis de COMP podem ser encontrados em estágios avançados das doenças articulares devido à elevada diminuição do espaço articular, à degradação prévia e à perda da cartilagem ou uma diluição da proteína (Neidhart et al., 1997).

O nível sérico dos marcadores teciduais depende não somente da liberação de estruturas como osso e cartilagem, mas também da taxa de eliminação na cavidade articular e linfonodos. Outro parâmetro é o “*clearance*” sanguíneo, que, por sua vez, depende de ligação/degradação hepática ou possivelmente filtração renal. O nível sérico, assim, representa uma medida integrada, refletindo liberação da cartilagem ou estruturas ósseas bem como refletindo eliminação dos fragmentos no metabolismo (Petersson et al., 1998a).

Certas enzimas são responsáveis pela degradação da cartilagem, particularmente proteinases serina, proteinases cisteína e metaloproteinases. Ainda está sob investigação se a degradação já ocorra dentro da matriz da cartilagem por proteinases sintetizadas por células inflamatórias do tecido sinovial (penetrando na cartilagem) ou por condrócitos. O grau de degradação e a extensão da sinovite é diferente na AR e na OA (e outras artrites inflamatórias) (Neidhart et al., 1997)

Até o momento a degradação da COMP purificada tem sido apresentada como sendo consequência da digestão por várias metaloproteinases, incluindo a colagenase intersticial (MMP-1), colagenase-3 (MMP-13), estromelina-1 (MMP-3), gelatinase-B (MMP-9), MMP-19, enamelinase (MMP-20), e agreganase-1 (ADAMTS-4). Esses ensaios foram realizados utilizando digestão *in vitro* (Liu et al., 2006; Dickinson et al., 2003; Stracke et al., 2000).

Membros de desintegrina e metaloproteinase com desenho da família das trombospondinas (ADAMTS) clivam COMP. Dickinson e colaboradores demonstraram que a COMP purificada foi clivada *in vitro* por ADAMTS-4, mas não por ADAMTS-1 ou -5. (Dickinson et al., 2003).

ADAMTS-7 foi encontrada altamente expressa em tecidos músculo-esqueléticos, regulada positivamente na cartilagem e sinóvia de pacientes com artrite reumatóide. ADAMTS-7 está co-expressa em tecidos musculares e esqueléticos produtores de COMP, com uma ampla distribuição tecidual. O domínio catalítico da ADAMTS-7 digere a COMP de uma forma dose, tempo e maneira dependente, requerendo 4 repetições carboxiterminais da trombospondina. ADAMTS-7 é a primeira enzima encontrada que diretamente interage e degrada a COMP (Liu et al., 2006)

#### ***2.2.4 Trombospondinas em indivíduos saudáveis***

O nível de trombospondinas nos fluidos corporais é muito baixo. A COMP não está presente na superfície das células sanguíneas *in vivo* (Lahav, 1993). Pode ser detectada em pacientes com AR, artrite reativa, artrite crônica juvenil, OA e em indivíduos normais. A COMP e/ou seus fragmentos são rapidamente detectáveis no soro de indivíduos saudáveis mostrando que há um resíduo do metabolismo normal da cartilagem (Saxne e Heinegård, 1992).

Aumento no nível de sérico da COMP foi relatado em resposta ao exercício de corrida vigorosa em adultos saudáveis, permanecendo elevados por até uma hora após a conclusão do exercício (Neidhart et al., 2000).

### **2.2.5 Secreção patofisiológica da COMP/TSP-5**

Quando anormal, a COMP é responsável por duas displasias esqueléticas humanas autossômicas dominantes que podem resultar de mutações: a pseudocondroplasia (PSACH) e a displasia epifiseal múltipla (MED). Os indivíduos portadores apresentam pernas curtas com face e inteligência normais. Além da baixa estatura, os pacientes com PSACH têm mãos curtas, elasticidade nos ligamentos e escoliose. A PSACH é caracterizada radiograficamente por anormalidades vertebrais e epifisiais (Briggs et al., 1995; Deere et al., 1999).

Mais de 40 mutações foram identificadas, contudo a relação genótipo-fenótipo não está bem delineada (Mabuchi et al., 2003). A maior parte das mutações no gene da COMP foi identificada na repetição tipo calmodulina (CLR) (Unger e Hecht, 2001; Briggs e Chapman, 2002; Chen et al., 2000).

## **2.3 Artrite Reumatóide**

### **2.3.1 Conceito**

É uma doença inflamatória sistêmica auto-imune heterogênea com envolvimento poliarticular levando a dano irreversível da cartilagem, com prognóstico variável (Wolheim et al., 1997; Peloschek et al., 2002; den Broeder et al., 2002).

É a forma mais prevalente de artrite crônica em todos os países. Causa morte prematura, sofrimento, transtornos sociais, aumento nos custos de saúde e limitação na empregabilidade (Wollheim, 1996). O estudo de Li Xin e colaboradores aponta custos indiretos estimados em \$ 12.352,00 dólares canadenses por pessoa por ano, decorrentes principalmente devido à baixa produtividade, absenteísmo e redução no número de horas trabalhadas (Li, 2006).

A maioria dos estudos de prevalência, realizados no norte da Europa e EUA, estimam uma prevalência de 0,5-1,1%. Estudos em países do sul da Europa relatam uma prevalência de 0,3-0,7%. Em países em desenvolvimento, os relatos descrevem prevalência entre 0,1 e 0,5%. A taxa de incidência anual varia de 20 a 50 casos por 100.000 habitantes nos EUA e países do

norte europeu (Alamanos e Drosos, 2005). No Brasil a taxa de incidência estimada é de 0,5 por 100.000 habitantes por ano (Alamanos e Drosos, 2005) com prevalência de 0,46% (Senna et al., 2004).

A patogênese da doença está associada a fatores genéticos e ambientais, sendo que nenhum agente causal foi identificado (Wollheim, 1996). Fibroblastos sinoviais têm um papel chave nesse processo, favorecendo um ambiente pró-inflamatório no tecido sinovial, interagindo com o sistema imunológico e regulando a diferenciação de monócitos em osteoclastos. A hiperplasia sinovial é outra característica da AR, refletindo não somente desequilíbrio entre proliferação e apoptose, mas também migração das células no tecido sinovial. Os fibroblastos ativados podem invadir a cartilagem e o osso. A ativação sinovial é dirigida por citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-15, 16, 17, 18, 22, 23, mas também por mecanismos independentes de citocinas que envolvem o sistema imune inato (Figura 4) (Karouzakis et al., 2006).

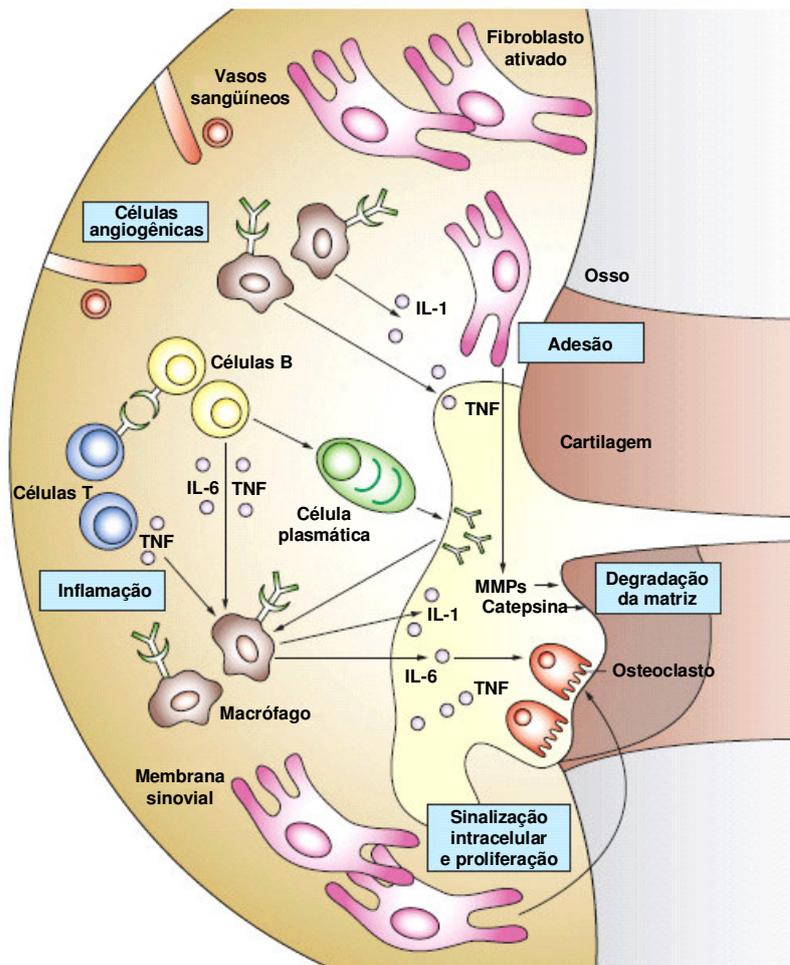


Figura 4 - Vias envolvidas na inflamação e destruição na artrose reumatóide. Adaptado de Müller-Ladner et al., 2005.

### **2.3.2 Diagnóstico**

Os critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia (*ACR – American College of Rheumatology*) (Anexo A) de 1987 são os critérios aceitos para o diagnóstico e classificação de AR (Arnett et al., 1988). O enfoque multidisciplinar do diagnóstico de entidades artríticas é baseado na demonstração da sinovite através de métodos de imagem (Larsen, 1995).

Na década passada houve os maiores avanços no tratamento da AR, onde a imagem determina se os agentes individuais ou regimes terapêuticos estão modificando favoravelmente a estrutura das articulações acometidas (Hunter e Conaghan, 2006). A radiografia convencional é insensível às alterações precoces, mas permanece como padrão-ouro para avaliar a progressão estrutural na AR ao longo do tempo (Hunter e Conaghan, 2006; Larsen, 1995).

### **2.3.3 Fatores de risco**

Há um consenso geral de que a AR é uma doença multifatorial, resultando da interação de fatores genéticos e ambientais associados à doença. Entre eles estão: fatores genéticos (incidência e prevalência em populações e grupos étnicos), idade e gênero (incidência de AR maior em mulheres que homens, de 2:1 a 3:1), fumo (associação dose dependente), fatores socioeconômicos (influenciam o curso e o desfecho), agentes infecciosos (estudos com Epstein Barr, rubéola), fatores hormonais (maior ocorrência em mulheres), nutricionais, etnia e raça (Alamanos e Drosos, 2005).

### **2.3.4 Marcadores**

Os marcadores de AR podem ser divididos em específicos da doença, nos marcadores inflamatórios e nos específicos do tecido afetado (tabela 1).

### 2.3.4.1 Marcadores específicos da doença

#### 2.3.4.1.1 Fator reumatóide

É o único auto-anticorpo incluído entre os critérios diagnósticos. Seu valor como preditor de severidade de AR (Genevay et al., 2002), bem como ferramenta para avaliar a atividade da doença (Wollheim, 1996), é controverso.

Estudo realizado por Bas S e colaboradores afirma que esse marcador é útil na prática clínica devido a sua boa sensibilidade (75% IC = 68% a 81%) e como marcador de lesão radiológica severa, principalmente em pacientes com tempo de doença superior a 12 anos (Bas et al., 2002).

Scott situa o fator reumatóide (FR) como fator prognóstico de AR mais consistente, com o subtipo IgA com melhor valor preditivo. Associado à presença de anticorpos anti-queratina ou anti-filagrina aumenta o valor de predição. A combinação de marcadores genéticos ao FR não melhoraria o valor preditivo, permanecendo inconclusivo (Scott, 2000).

#### 2.3.4.1.2 Anticorpos antifilagrina

O antígeno alvo identificado é uma pró-filagrina, abundante no epitélio bucal. A presença de anticorpos anti-filagrina (AFA) (anticorpos anti-queratina (AKA), anticorpos anti-fator perinuclear (FAP)) estão relacionados a pior prognóstico e progressão radiológica ao longo do tempo em estudos de acompanhamento por períodos superiores a 8 anos (Wollheim, 1996; Genevay et al., 2002; Bas et al., 2002). Os isotipos dominantes são IgG e IgA (Wollheim, 1996).

Os auto-anticorpos AFA, AKA e FAP se ligam a determinantes antigênicos que contém um aminoácido citrulina (Schellekens et al., 1998) formado por modificação pós-transcricional de resíduos arginina pela aginina-peptidil desaminase (Tarcza et al., 1996). Para detectar esses auto-anticorpos, Schellekens e colaboradores desenvolveram um teste imunoenzimático (ELISA), usando como antígeno uma variante cíclica do peptídeo citrulinado (CCP), peptídeo esse derivado de uma seqüência de filagrina humana (Schellekens

et al.,1998). Em estudo posterior, o mesmo grupo mostrou que os anticorpos anti-CCP (ELISA) eram extremamente específicos (98%) com sensibilidade razoável (68%) (Schellekens et al., 2000).

A sensibilidade de anticorpos anti-CCP na AR foi de 62% e especificidade de 97% em estudo realizado por Silveira IG (tese de doutorado). Nesse mesmo estudo foi observada sensibilidade de 64% para o fator reumatóide (RF) e especificidade de 90%. Quando os pacientes apresentavam positividade para ambos os testes a sensibilidade observada foi de 71% e especificidade de 99% (Silveira, 2005).

**Tabela 1 - Alguns marcadores biológicos de possível uso na avaliação da atividade da doença na artrite reumatóide.**

<b>Tipo</b>	<b>Fonte</b>	<b>Marcadores</b>
<i>Específicos à doença</i>	Linfócitos	Fator reumatóide, anticorpos anti-filagrina, anti-A2/RA33
	Genéticos	HLA DRB1, estado de sulfoxidação
<i>Inflamatórios</i>	Proteínas de fase aguda	Proteína C reativa (CRP), seromucóide (alfa1-glicoproteína ácida), haptoglobina, etc.
	Citocinas/inibidores	Interleucina-1 (IL-1), Fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Receptor de Interleucina-2 (IL-2R), Receptor Antagonista de Interleucina-1 (IL-1RA)
	Moléculas de adesão	s1CAM-1,sVCAM-1
	Ativação de granulócitos	Lactoferrina, citidina deaminase, calprotectina
<i>Tecido-Específicos</i>	Sinóvia	PIIINP, Neopterina, Ac. Hialurônico
	Cartilagem	Epítomos do Agrecan, Fragmentos de colágeno tipo II, COMP, Proteína da Matriz da Cartilagem (CMP)
	Osso	Osteocalcina, Sialoproteína Óssea, Fragmentos de Colágeno I

Adaptado de Wollheim,1996.

#### 2.3.4.2 Marcadores genéticos

Vários estudos confirmam uma forte associação entre susceptibilidade à doença e a presença de uma seqüência de aminoácidos conservada na região hipervariável do alelo DRB1 suportando a hipótese do epítipo compartilhado. A presença de uma lisina na posição 71 na terceira região hipervariável do DRB1 está associada com FR positivo e doença progressiva, enquanto uma arginina na mesma posição está associada com soronegatividade e doença menos agressiva (Wollheim, 1996).

AR é uma doença genética complexa comum, e, apesar do elemento genético significativo, nenhum gene além do HLA-DRB1 mostrou-se claramente envolvido na doença (Newton et al., 2004; Wassmuth e Wagner, 2002).

#### 2.3.4.3 Marcadores inflamatórios

A conexão entre inflamação e o desenvolvimento de destruição articular não está claro em pacientes com artrite reumatóide e outras artropatias (Fex et al., 1996). A hipótese de que inflamação e destruição articular estão estreitamente ligadas é suportada por dados recentes de estudos de imagem por ressonância magnética em articulações individuais em pacientes com AR precoce (Wick et al., 2004). Conaghan e colaboradores demonstraram que em AR inicial o dano ósseo ocorre proporcionalmente ao nível da sinovite, mas não na sua ausência (Conaghan et al., 2003).

O fator de necrose tumoral alfa é um mediador inflamatório crítico na artrite reumatóide, e assim, pode ser alvo de imunoterapia específica (Elliott et al., 1994). A associação entre inflamação e subsequente destruição articular na AR foi questionada por van der Berg e colaboradores (van der Berg, 2001).

#### 2.3.4.3.1 Proteínas de fase aguda

A proteína C reativa (PCR) é amplamente utilizada para monitorar a atividade da doença e resposta à terapia. Níveis que se mantêm elevados de CRP mostram forte associação com dano articular progressivo na AR, mas seu valor preditivo nos casos individuais é limitado (Wollheim, 1996). O tratamento com anti-TNF- $\alpha$  mostrou uma rápida e sustentada diminuição nas proteínas de fase aguda como a CRP (den Broeder et al., 2002).

#### 2.3.5 COMP em AR

A COMP apresenta-se elevada no soro e líquido sinovial no início da AR rapidamente progressiva e, ao contrário de outras moléculas da cartilagem, apresenta uma diminuição com o tempo (Forslind et al., 1992; Månsson et al., 1995; den Broeder et al., 2002). Nos casos de AR com evolução mais benigna, os níveis de COMP não se alteram (Forslind et al., 1992).

Pacientes com AR avançada têm baixa concentração de COMP comparada aos quadros iniciais. Alterações avançadas nas articulações reduzem a massa total de cartilagem (Saxne e Heinegård, 1992). Isoladamente, níveis elevados de COMP no início da doença mostraram ser o indicador mais valioso de prognóstico desfavorável (Månsson et al., 1995). Entretanto, den Broeder e colaboradores afirmam que os níveis de COMP também podem prever pequeno dano articular. Tanto o nível inicial de COMP (basal) quanto o tratamento com anti-TNF $\alpha$  estão independentemente associados com o desfecho radiológico. Em pacientes com desfecho radiológico estável os níveis séricos de moléculas de adesão intercelular (sICAM-1) permaneceram baixos e não mudaram (den Broeder et al., 2002).

Em pacientes tratados com agentes anti-TNF $\alpha$ , os níveis séricos de COMP não mudam a curto prazo. Permanecem estáveis durante as 2 primeiras semanas caindo significativamente 2 anos após o início do tratamento (den Broeder et al., 2002) com comportamento cinético independente de fase aguda (Forslind et al., 1992; Fex et al., 1997).

Pacientes tratados com fármacos bloqueadores do TNF $\alpha$  não apresentaram correlação entre níveis séricos de COMP e CRP em nenhum momento analisado. Esse estudo apresenta a

COMP sérica como marcador potencial para avaliação tecidual dos efeitos das novas modalidades de tratamento na AR (Crnkic et al., 2003).

Pacientes com média de 11 meses do início dos sintomas à entrada no estudo apresentaram níveis de COMP significativamente maiores naqueles com destruição precoce do quadril, comparados ao grupo mais benigno, com menos erosão. Ainda neste estudo, o haplótipo HLA DRB1 foi encontrado em 8/8 pacientes com destruição no quadril e 5/8 dos casos mais benignos (menos erosivos). Concluíram que os níveis de COMP eram um fator preditor com maior poder informativo de doença agressiva do que a tipagem HLA DRB1 (Wolheim et al., 1997).

Os níveis de COMP e do marcador de inflamação soroamiloide A (SAA) diminuíram significativamente ( $P < 0,04$  e  $P < 0,01$  respectivamente) após 6 meses de tratamento com o fármaco anti-reumático modificador de doença (DMARD) leflunomida, mostrando que a terapia com este fármaco pode causar efeitos positivos na degradação e inflamação da cartilagem, com redução na SAA e no ataque enzimático das metaloproteinases (MMPs) (Kullich et al., 2006).

## **2.4 Osteoartrite**

### **2.4.1 Conceito**

A osteoartrite (OA) é a doença articular mais freqüente, sendo acompanhada de dor, perda de agilidade, restrições na vida profissional e privada (Kullich W et al., 2003) e caracterizada por destruição progressiva da cartilagem articular e concomitantes mudanças no osso subcondral (Howel, 1986; Brandt, 1986).

O estudo de Li Xin e colaboradores aponta custos indiretos estimados em \$ 10.887,00 dólares canadenses por pessoa por ano, decorrentes principalmente da baixa produtividade, absenteísmo e redução no número de horas trabalhadas (Li et al., 2006).

Entre os Estados Unidos e Europa a prevalência de doença sintomática no joelho é de 6% e quadril 3%. Tendo em vista que a OA é uma doença cuja prevalência aumenta com a idade, sua freqüência no futuro aumentará proporcionalmente ao aumento da expectativa de

vida (Hedbom e Häuselmann, 2002). No Brasil a prevalência estimada é de 4,14% (Senna et al., 2004).

OA pode ser definida por sintomas ou patologia. A patologia da OA envolve toda a articulação no processo de doença, que inclui perda focal e progressiva da cartilagem articular hialina com concomitantes alterações no osso, incluindo o desenvolvimento de osteófitos marginais. As estruturas dos tecidos moles e em torno da articulação também são afetadas (Hedbom e Häuselmann, 2002).

A OA de quadril é menos comum que a de joelho, com taxas de 3-5% na população idosa (Arden e Nevitt, 2006). A prevalência de OA (a partir de evidência radiológica) aumenta significativamente com a idade, chegando a 68% em mulheres e 58% em homens com idade média maior ou igual a 65 anos (Cicutini e Spector, 1995). A taxa de incidência é 1,7 vezes maior em mulheres que em homens (IC 95%: 1,0-2,5) e a forma progressiva da doença ligeiramente maior também (RR = 1,4; IC 95%: 0,8 – 2,5) (Felson et al., 1995).

#### **2.4.2 Diagnóstico**

O critério diagnóstico mais amplamente utilizado é o do Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology – ACR*) (Altman et al., 1990; Altman et al., 1991) (Anexo B).

Atualmente a doença é diagnosticada através de critérios clínicos radiográficos que permitem a definição da doença somente em estágios avançados (Hunter e Conaghan, 2006). A avaliação radiográfica é menos adequada para o diagnóstico e progressão da OA, pelo fato de indicar alterações ósseas e só indiretamente as alterações na cartilagem (Bauer et al., 2006).

Avanços recentes no diagnóstico por imagem da OA têm proporcionado avaliar a causa da dor e as razões para a progressão da doença. No entanto, os ensaios clínicos que avaliam drogas modificadoras da doença ainda utilizam a avaliação radiográfica padronizada para monitorar as alterações na estrutura da articulação. A ressonância magnética está evoluindo rapidamente como método de monitoramento da estrutura articular. Com o tempo tende a tornar-se o método de referência (Hunter e Conaghan, 2006).

### 2.4.3 Fatores de risco

Os padrões epidemiológicos da ocorrência da OA fornecem indícios quanto à patogenia da doença.

#### 2.4.3.1 Fatores de risco sistêmicos

- a) *Idade e gênero*: aumento do risco relacionado à idade é visto em todas as articulações em que ocorre OA (Arden e Nevitt, 2006). A prevalência de OA é maior em mulheres que em homens (Felson et al., 1995)
- b) *Hormônios sexuais*: aumento da incidência de OA em mulheres após a menopausa. Sessenta e quatro por cento (64 %) (Silman e Newman, 1996) das mulheres estudadas tiveram o início dos sintomas na fase perimenopáusicas ou dentro de 5 anos do início da menopausa ou após histerectomia (Nadkar et al., 1999).
- c) *Osteoporose e densidade mineral óssea*: estudos populacionais transversais têm estabelecido que mulheres com OA de quadril ou joelho têm maior densidade mineral óssea em sítios esqueléticos tanto próximos quanto distantes da articulação com OA. A relação entre *status* esquelético e OA é complexa e difere quanto ao papel no início e curso de OA (Arden e Nevitt, 2006).
- d) *Etnicidade e raça*: taxa de OA similar entre caucasianos e afroamericanos (Arden e Nevitt, 2006).
- e) *Genética*: múltiplos genes estariam ligados à susceptibilidade à OA com influência importante na expressão da doença (Arden e Nevitt, 2006).
- f) *Nutrição*: a susceptibilidade à OA aumentaria com danos oxidativos à cartilagem e outros tecidos articulares causados por radicais livres produzidos por condrócitos. Um aumento de antioxidantes na dieta, como vitaminas C e E poderiam ter efeito protetor na OA (Arden e Nevitt, 2006).

#### 2.4.3.2 Fatores de risco mecânicos

- a) *Obesidade*: é o maior e melhor estabelecido fator de risco à OA de joelho. Precede o desenvolvimento de OA no joelho em muitos anos. A perda de peso reduz o risco de subsequente desenvolvimento de OA no joelho (Szoeki et al., 2006).
- b) *Dano agudo e carga articular repetitiva*: fraturas e deslocamentos conferem um risco muito alto de desenvolver OA posteriormente na articulação lesionada (Lequesne et al., 1997).
- c) *Deformidade articular*: anormalidades congênitas que resultem em distribuição anormal de carga nas articulações aumentam o risco de desenvolver OA na articulação afetada (Arden e Nevitt, 2006).
- d) *Resistência muscular e fraqueza*: maior força de contração muscular aumenta a carga articular durante a atividade (Arden e Nevitt, 2006). A prática de alguns esportes de campo como futebol, *rugbi* e esportes com raquetes (nível dependente) podem ser causa de OA, principalmente em quadril e joelhos. (Lequesne et al., 1997).

#### 2.4.4 Marcadores de Osteoartrite

Um dos prementes problemas na pesquisa em OA é a definição do marcador molecular que facilitará a determinação do prognóstico do paciente e a necessidade de tratamento (Otterness et al., 2001). Um único marcador pode não ser suficiente para estabelecer o diagnóstico (Otterness et al., 2000). Os biomarcadores são propostos em função da maior disponibilidade e sensibilidade em relação aos testes de imagem, principalmente no diagnóstico precoce e prognóstico da OA (Kong et al., 2006).

Medidas de imagem tais como radiografias ou ressonância magnética e a visualização direta através de artroscopia podem refletir o estado patológico avançado da OA, quando feitas em diferentes tempos, separados suficientemente entre si, normalmente 6 e 24 meses (Otterness et al., 2001).

Os marcadores podem ser medida direta da taxa de progressão da doença, ao fornecerem uma avaliação do processo metabólico em andamento na articulação. Devem oferecer uma rápida avaliação da atividade da doença. Há um grande número de marcadores

potenciais associados ao metabolismo ósseo ou da cartilagem para o monitoramento da osteoartrite: sulfato de queratan, neopeptídeo agrecan, osteocalcina, propeptídeo C do procolágeno tipo II, sialoproteína óssea, ligações cruzadas do colágeno tipo hidroxilisil piridina e lisil piridina, fragmentos do colágeno tipo II, e COMP. Os marcadores relacionados à inflamação são: TGF- $\beta$ 1, proteína C reativa ultrasensível, receptor tipo I e II do fator de necrose tumoral (TNF-RI e TNF-RII), IL-6, ácido hialurônico e proteína catiônica eosinofílica. (Otterness et al., 2001; Otterness e Swindell, 2003; Kong et al., 2006). Os biomarcadores ainda estão sendo pesquisados e estão em processo de validação apropriada para OA quanto ao seu papel prognóstico (Kong et al., 2006).

#### **2.4.5 COMP em Osteoartrite**

A OA é um processo generalizado, onde o aumento nos níveis séricos de COMP reflete o hipermetabolismo de muitas articulações (Sipe, 1995). Níveis séricos altos discriminam bem entre indivíduos com ou sem envolvimento articular (Petersson et al., 1998a).

Pacientes com OA avançada têm concentrações de COMP em líquido sinovial maiores do que pacientes com AR avançada, indicando diferenças no metabolismo da cartilagem entre esses dois grupos. (Saxne e Heinegård, 1992).

Comparando com indivíduos com radiografia do joelho normal, foi relatado aumento nos níveis séricos de COMP e sialoproteína óssea (BSP) em indivíduos com dor crônica no joelho durante o desenvolvimento de OA (Saxne e Heinegård, 1992). Resultados similares foram encontrados para COMP em um estudo de progressão radiográfica de OA de joelho estabelecida. Neste estudo, os níveis de COMP eram maiores em pacientes com ultrassom ósseo positivo (Sharif et al., 1995).

A concentração sérica de COMP em pacientes com OA no estudo realizado por Saxne mostrou-se dentro da faixa normal (Saxne e Heinegård, 1992).

Vários estudos têm avaliado o nível sérico da COMP como marcador de progressão de OA. Sharif e colaboradores e Petersson e colaboradores não encontraram correlação entre níveis séricos basais de COMP e subsequente progressão de OA durante estudo de seguimento de 5 anos em pacientes com OA de joelho estabelecida e durante 3 anos de seguimento em pacientes com OA inicial de joelho. Os dois estudos mostraram, contudo, uma

significativa correlação entre a mudança (aumento) no nível sérico da COMP durante o primeiro ano e durante intervalo de 3 anos respectivamente (Sharif et al., 1995; Petersson et al., 1998b).

Conrozier e colaboradores encontraram uma significativa correlação entre os níveis basais de COMP e a progressão radiográfica de um ano, em pacientes com OA de quadril estabelecida (Coronzier et al., 1998).

Vilím e colaboradores observaram correlação entre níveis séricos de COMP e progressão radiográfica em OA de joelho. Ao contrário dos dois estudos descritos anteriormente em OA de joelho eles não observaram associação entre alteração no nível de COMP sérica e progressão. Em vez disso, os níveis basais de COMP e os níveis ao final do estudo correlacionaram-se fortemente, indicando que a COMP pode distinguir pacientes que terão progressão daqueles que não progredirão (Vilím et al., 2002)

## **2.5 Aterosclerose e Infarto Agudo do Miocárdio**

### ***2.5.1 Fatores de risco do infarto agudo do miocárdio***

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é causado por obstrução de um ramo coronário por trombo (Downey e Cohen, 2006).

As doenças cardiovasculares são a causa mais comum de morte no mundo em homens e mulheres, onde a doença arterial coronariana (CAD) e derrame são as principais. O Brasil está passando por uma fase de transição, em que doenças degenerativas e infecciosas estão diminuindo, e doenças cardiovasculares tais como hipertensão, derrame e cardiomiopatia hipertensiva estão predominando em várias regiões do país. (Piegas et al., 2003).

O início da CAD e sua progressão a IAM está associada à presença de fatores de risco. A avaliação de fatores de risco para IAM no Brasil foi realizada no estudo AFIRMAR (“Acute Myocardial Infarction Risk Factor Assessment in Brazil”). O estudo prospectivo foi desenvolvido entre outubro de 1997 e novembro de 2000 com a participação de 104 hospitais em 51 cidades (Piegas et al., 2003). Os fatores de risco independentes para IAM estão apontados na tabela 2.

**Tabela 2 - Fatores de risco independentes para infarto agudo do miocárdio.**

<b>Fator de risco</b>	<b>Exposição</b>	<b>Odds Ratio (OR)</b>
Fumo	> 5 cigarros por dia	4,90
	< 5 cigarros por dia	2,07
Glicose Diabetes Mellitus	> 126 mg/dL	2,82
		1,70
Perímetro cintura/quadril	>0,94	2,45
	0,90 a 0,94	1,52
História familiar de CAD		2,29
LDL colesterol	100 a 120 mg/dL	2,10
	> 120 mg/dL	1,75
Hipertensão		2,09
Ingesta de álcool	até 2 dias por semana	0,75
	3 – 7 dias por semana	0,60
Renda familiar	R\$600,00 a R\$1.200,00 e educação superior	2,92
	> R\$1.200,00 e educação superior	0,68

Adaptado de Piegas et al., 2003.

Os fatores de risco independentes no Brasil mostraram um padrão de distribuição convencional (fumo, diabetes e obesidade central entre outros) com diferentes graus de associação. Muitos desses fatores são de fácil prevenção através de implantação de adequadas políticas de saúde (Piegas et al., 2003).

### ***2.5.2 Patobiologia da matriz extracelular do tecido cardíaco***

Em torno de 75% das células do coração saudável são não miocíticas, o que inclui fibroblastos (correspondem a 90 a 95% do total de células não miocíticas). As células do miocárdio são sustentadas por uma matriz consistindo de uma rede de fibras macromoleculares em uma organização tridimensional complexa que determina a integridade estrutural e funcional do coração (Jugdutt, 2003a; Jugdutt, 2003b). O colágeno é a principal proteína estrutural da matriz. Dos muitos tipos de colágeno existentes no tecido cardíaco, os principais são os colágenos tipos I (aproximadamente 85% do total) e III (aproximadamente 11% do total), proteoglicanas e glicoproteínas (Jugdutt, 2003a; Radovan et al., 2006).

Em modelo animal, a isquemia do miocárdio induzida por oclusão da artéria coronária com subsequente infarto do miocárdio leva à remodelagem morfológica e bioquímica do músculo cardíaco. Essas mudanças estão localizadas tanto no compartimento miofibrilar

quanto na matriz extracelular. O remodelamento após o infarto do miocárdio é um processo complexo ainda em estudo (Radovan et al., 2006).

### ***2.5.3 Formação da placa aterosclerótica***

A doença vascular aterosclerótica é um processo difuso e progressivo com apresentação clínica e distribuição variável que depende da circulação regional envolvida. Os fatores que podem influenciar essas diferenças incluem tamanho e estrutura da artéria afetada, fluxo regional e local, alterações na microcirculação e dano final no órgão (Faxon et al., 2004).

Fundamentalmente, o processo de inflamação regula a aterosclerose (Libby, 2002; Hansson, 2005). Particularmente, o macrófago emerge como mediador celular chave da inflamação no ateroma, e participa em todas as fases da aterogênese, incluindo início da lesão, progressão e complicação. Inicialmente recrutadas à parede arterial como monócitos, essas células transformam-se em macrófagos teciduais. Uma vez residentes, os macrófagos ingerem lipoproteínas oxidadas via receptor faxineiro multiligante, CD36 (“scavenger”), transformando-se em células espumosas, contribuindo para a expansão do ateroma. Alguns macrófagos podem morrer dentro do ateroma via necrose e/ou apoptose, levando ao desenvolvimento de um core lipídico paucicelular (Febbraio et al., 2001; Libby, 2002). Após a fagocitose dos lipídios, os macrófagos secretam proteases como catepsinas e metaloproteinases que podem degradar a matriz extracelular comprometendo a capa fibrosa. Os macrófagos também secretam várias espécies reativas de oxigênio (por exemplo, produtos das NAD[P]H oxidases ou mieloperoxidases), que podem modificar as lipoproteínas (Figura 5) (Libby, 2002).

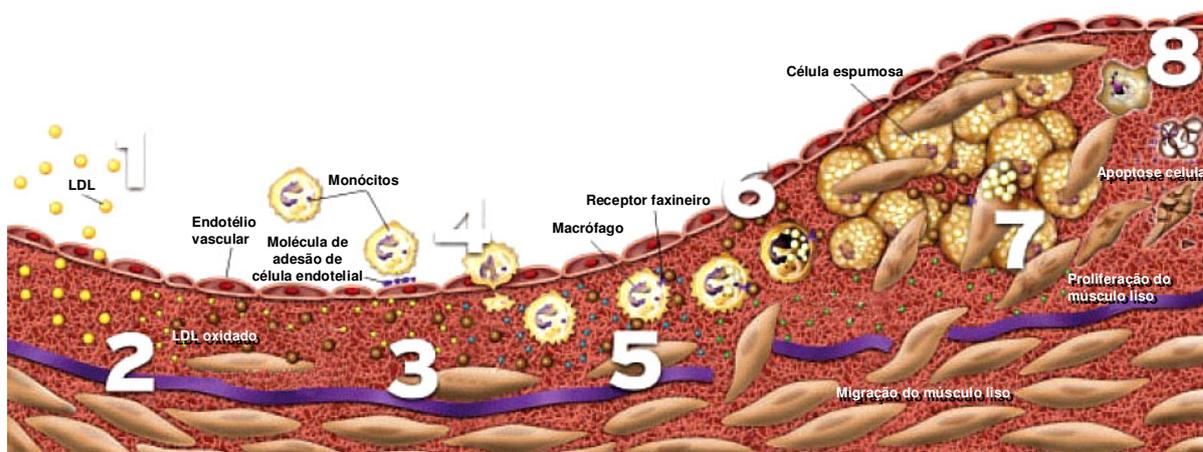


Figura 5 - Estágios do desenvolvimento de uma placa aterosclerótica.

Primeiro, o LDL penetra no subendotélio e é oxidado por macrófagos e células musculares lisas (1 e 2). A liberação de fatores de crescimento e citocinas atrai monócitos adicionais (3 e 4). O acúmulo de células espumosas e a proliferação das células musculares lisas resulta no crescimento da placa (6,7 e 8).

Adaptado de Faxon et al., 2004.

A camada íntima em adultos humanos geralmente contém células musculares lisas dispersas dentro da matriz extracelular da íntima. A lâmina interna elástica forma a barreira entre a túnica íntima e a túnica média. Esta consiste de múltiplas camadas de células musculares lisas, muito mais finamente acomodadas que na íntima difusamente espessa, e embebida em uma matriz rica em elastina bem como em colágeno. No início da aterogênese, há o recrutamento de células inflamatórias (Libby, 2002).

Há a formação de um core rico em lipídios, com o aumento da artéria em direção abluminal para acomodar a expansão da íntima. Se as condições inflamatórias prevalecem e os fatores de risco como dislipidemia persistem, o core lipídico pode crescer, e proteinases secretadas pelos leucócitos ativados podem degradar a matriz extracelular, enquanto citocinas pró-inflamatórias como o  $\text{IFN-}\gamma$  podem limitar a síntese de novo colágeno. Essas mudanças podem afinar a capa fibrosa e deixá-la friável e suscetível à ruptura. Quando a placa rompe, o sangue coagula em contato com o fator tecidual. As plaquetas ativadas pela trombina geradas da cascata da coagulação e pelo contato com o compartimento da íntima levam à formação de trombo. Se o trombo oclui o vaso ocorre o infarto agudo do miocárdio (Figura 6) (Libby, 2002).

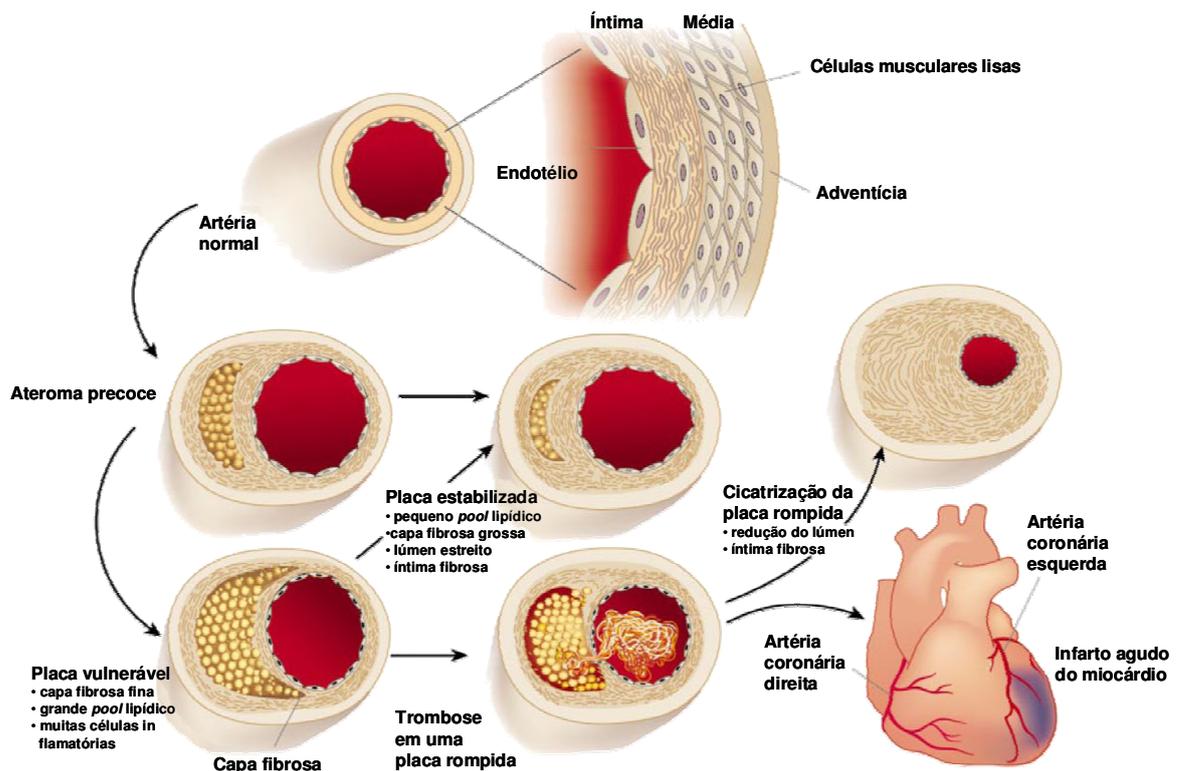


Figura 6 - Esquema da evolução de um ateroma.  
Adaptado de Libby, 2002.

O receptor CD36, importante no processo aterogênico, foi identificado como uma glicoproteína de membrana de plaquetas, até ser identificado como receptor para a trombospondina-1 (TSP-1) (Adams, 1995). Desde então, o CD36 tem sido implicado em múltiplos processos biológicos que o definem como um receptor multiligante. Em termos gerais, suas funções são estabelecidas como aquelas que executam com ou sem TSP-1, mas provavelmente esse receptor ligue outras proteínas, integrinas, proteínas do citoesqueleto e moléculas sinalizadoras em suas diversas funções (Febbraio et al., 2001).

O sítio de ligação da TSP-1 no CD36 está contido dentro de uma sequência altamente conservada nos membros da família CD36. A repetição tipo I da TSP-1 (figura 1) é o domínio que contém a sequência que liga ao receptor CD36, também encontrada em muitas outras proteínas (Febbraio et al., 2001), mas ausente na COMP.

#### **2.5.4 Cicatrização do infarto**

O miocárdio contém aproximadamente 20 milhões de cardiomiócitos por grama de tecido. Para causar falência cardíaca, um infarto necessita matar aproximadamente 25% do ventrículo. Desse modo, o déficit na falência cardíaca induzida pelo infarto é da ordem de um bilhão de cardiomiócitos (Murry et al., 2006).

Após a morte de cardiomiócitos, há uma reação inflamatória no primeiro dia após o infarto do miocárdio (Willems et al., 1994) com migração de neutrófilos e posteriormente de monócitos provenientes da circulação (Murry et al., 2006). As células estão presentes 40 minutos após a oclusão coronariana experimental e há significativa degradação do colágeno em 24 horas em modelo animal (ratos) (Willems et al., 1994). A expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 aumentam duas vezes em aproximadamente uma semana após o infarto (Yue et al., 1998). O aumento no nível de citocinas está relacionado à subsequente deposição de colágenos tipo I e III, e o TGF- $\beta$ 3 parece ter um papel ativo na regulação da deposição de colágeno (Deten et al., 2001).

Os processos de reparo do infarto do miocárdio e de cicatrização de ferimentos têm muitos componentes comuns. Durante a fase proliferativa da cicatrização, macrófagos acumulam-se na área infartada e regulam a formação do tecido, a vascularização, liberação de fatores de crescimento, mediadores angiogênicos e proteases. Os macrófagos também estão envolvidos na supressão da injúria inflamatória, proteção de miócitos e regeneração. A inflamação e a síntese de colágeno são importantes passos que afetam o reparo cardíaco após o infarto do miocárdio. Pacientes infartados tratados com drogas antiinflamatórias apresentam aumento na incidência de expansão do miocárdio, ruptura e morte (Leor et al., 2006)

Parte do processo de remodelamento após o infarto do miocárdio também envolve a regeneração dos componentes perdidos do miocárdio, vasos sanguíneos e componentes celulares como os miócitos. O processo de remodelamento do ventrículo esquerdo é complexo e dependente do tempo. O coração pode regenerar alguns desses componentes espontaneamente e promover um remodelamento favorável (Anversa e Nadal-Cinard, 2002; Jugdutt, 2003a).

A estrutura normal do colágeno desaparece durante a primeira semana após o infarto. A extensão do dano ao colágeno relaciona-se ao grau de extensão do infarto (Whittaker et al., 1991). As células inflamatórias liberam proteases e contribuem para a remoção do tecido

necrótico. Os miofibroblastos promovem a reconstrução da nova rede de colágeno. As ações dos miofibroblastos são sistemáticas e essenciais à organização da formação da cicatriz, simultâneas às contrações rítmicas do coração. Após várias semanas, uma sólida cicatriz está formada com uma estável estrutura de colágeno com pequena celularidade, mas alguns miofibroblastos permanecem no tecido cicatrizado (Figura 7) (Willems et al., 1994).

Estudo com a ativação de macrófagos *ex vivo* tem mostrado que essas células podem ser benéficas no estágio inicial da cicatrização do infarto, mas deletéria durante a fase tardia da formação da cicatriz e remodelamento do ventrículo esquerdo. Assim, o controle da atividade dos macrófagos parece ser essencial para o reparo e controle da fibrose excessiva (Leor et al., 2006).

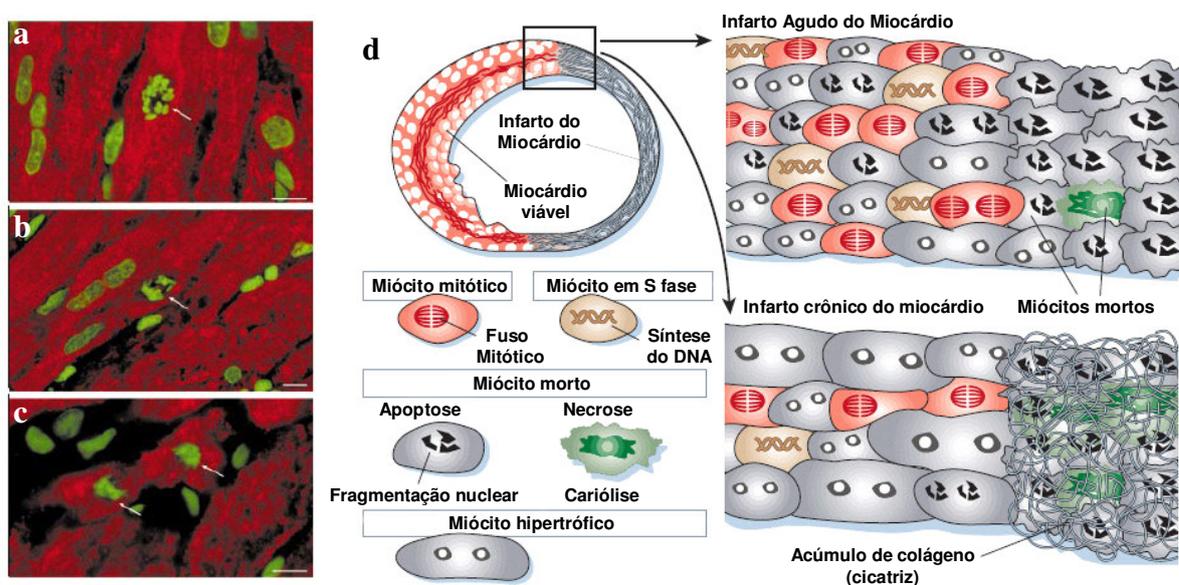


Figura 7 - a-c: estágios de mitose em miócitos humanos. Metáfase (a), cariocinese (b) e citocinese (c): fluorescência verde (iodeto de propídio). Fluorescência vermelha reflete a miosina cardíaca. (d), alterações no crescimento de miócitos no infarto agudo e crônico do miocárdio. Adaptado de Anversa e Nadal-Ginard, 2002.

### 2.5.5 COMP em Aterosclerose

Até o estudo de Riessen e colaboradores, dos membros da família das trombospondinas, somente as TSP-1 e TSP-2 haviam sido investigadas e detectadas nos tecidos vasculares (Riessen et al., 2001).

Originalmente, a TSP-1 foi isolada de alfa grânulos de plaquetas. Estudos posteriores revelaram que ela também estava expressa em uma série de outros tipos celulares, incluindo células musculares lisas, células endoteliais, fibroblastos e macrófagos (Lahav 1993), artérias humanas ateroscleróticas e restenóticas (Riessen et al.,1998). Após dano experimental em artérias, o mRNA da TSP-1 foi regulado positivamente dentro de horas (Miano et al., 1993). A TSP-2 é similar à TSP-1 estruturalmente (figuras 1 e 2), com evidência de expressão in vivo em células endoteliais de vasos sanguíneos normais bem como em células musculares lisas de artérias ateroscleróticas (Reed et al., 1995).

Riessen e colaboradores mostraram que o quinto membro da família das trombospondinas, COMP, é um componente da parede arterial humana, e produzida predominantemente por células musculares lisas. A técnica de imunohistoquímica revelou a COMP como um componente da parede arterial humana aterosclerótica e restenótica localizada em estreita proximidade às células musculares lisas e não na matriz extracelular livre. A expressão em células endoteliais foi abaixo do limiar de detecção (figura 8) (Riessen et al.,2001). A expressão do mRNA da COMP foi estimulada in vitro com soro ou TGF- $\beta$ 1 e 3, enquanto a maior expressão da TSP-1 e 2 foi em meio livre de soro não aumentada por fatores de crescimento. A COMP e a TSP-1 diferiram funcionalmente nos ensaios de ataque e migração celular. As células musculares lisas ligaram-se às superfícies cobertas com COMP e então cobriram e organizaram as fibras de estresse. A ligação foi similar ao ataque à fibronectina em termos de morfologia celular. O estudo demonstrou que a COMP pode facilitar a migração das células musculares lisas tanto na camada média normal quanto na parede aterosclerótica primária, diferindo em distribuição e propriedades funcionais em relação à TSP-1. (Riessen et al., 2001).

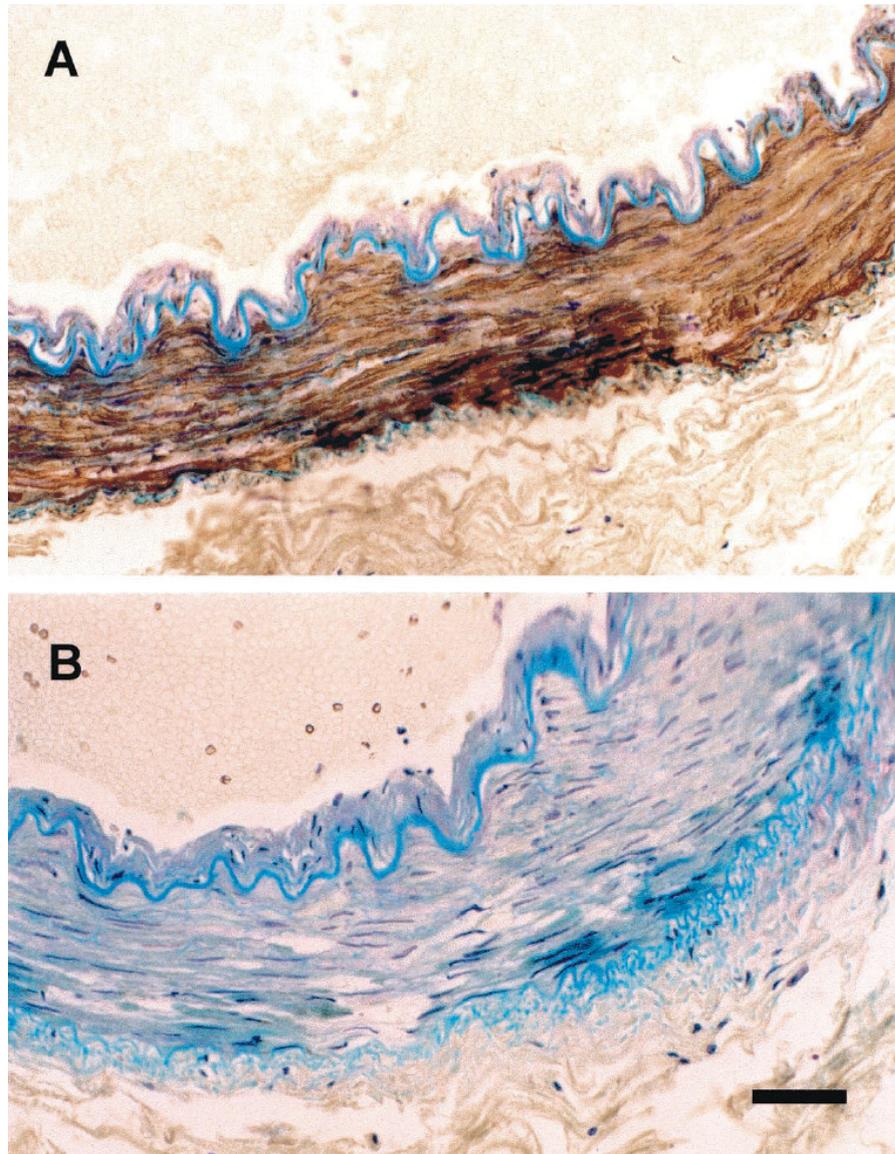


Figura 8 - Imunocoloração de uma artéria mamária interna. A) COMP/TSP-5 indicada pela presença da coloração marrom do cromogênio. B) Controle negativo utilizando soro controle preimune (COMP/TSP-5) (barra = 50  $\mu$ m). Adaptado de Riessen et al., 2001.

### 3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A) Os marcadores sorológicos disponíveis para o acompanhamento de pacientes com AR e OA não são de aceitação uniforme. A literatura recente tem sugerido a COMP como marcador de atividade de doença nestas duas entidades reumatológicas. A COMP, como membro da família das trombospondinas, é pouco estudada nestas circunstâncias.

B) A COMP é uma proteína da matriz extracelular cuja função é desconhecida. É expressa no músculo liso de artérias e em células de vários tecidos, incluindo células mesenquimais da derme. Até o momento não foi possível identificar a origem tecidual do biomarcador, impedindo uma honesta interpretação dos níveis séricos de COMP na avaliação da doença articular. É ainda desconhecida a contribuição das diferentes linhagens celulares para o resultante nível sérico da proteína.

C) Na década passada, a pesquisa por marcadores plasmáticos de remodelamento adverso do miocárdio pós-IAM foi intensificada. Um marcador plasmático capaz de identificar o risco de remodelamento adverso pode trazer benefícios a estes pacientes.

D) A COMP é uma proteína conservada durante a evolução. Há interesse na investigação do seu nível sérico em situação clínicas variadas. A avaliação dos níveis séricos de COMP em doenças reumáticas, e sua eventual associação com estas entidades, poderá fornecer dados relevantes na compreensão do comportamento biológico da proteína. As evidências apontando para a importância da preservação da matriz extracelular durante a cicatrização pós-IAM reforçam o estudo dessa proteína de matriz extracelular também nesse grupo de pacientes.

### **3.1 HIPÓTESE**

#### ***3.1.1 Hipótese Conceitual***

Alterações nos níveis séricos de COMP, se existentes, se associam à presença de doenças reumáticas mais prevalentes (AR, OA) e de IAM.

#### ***3.1.2 Hipótese operacional***

Alterações nos níveis séricos de COMP, se existentes, não se associam à presença de doenças reumáticas mais prevalentes (AR, OA) e de IAM.

#### **4 OBJETIVO**

Verificar se níveis séricos de COMP, quando alterados, se associam à presença de doenças reumáticas prevalentes (AR, OA) e de IAM.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento do Estudo

*Característica do estudo:* estudo de caso-controles.

*Variável principal (fator de exposição):* proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP).

*Desfechos:* doença reumática prevalente (AR/OA), IAM.

### 5.2 População

O estudo foi realizado no Hospital São Lucas da PUCRS. A população foi selecionada através da inclusão de pacientes com diagnóstico de AR, OA e IAM, além de indivíduos saudáveis doadores de sangue.

#### 5.2.1 Características da População

Foram selecionados 63 pacientes com diagnóstico confirmado de AR e 40 pacientes com diagnóstico de OA cadastrados no estudo “Probabilidade de artrite reumatóide a partir da testagem para fator reumatóide e anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico” com amostras disponíveis mantidas em condições adequadas de armazenagem.

Para avaliação do perfil da COMP em infarto agudo do miocárdio (IAM) foram selecionados 66 pacientes com diagnóstico confirmado, cadastrados no estudo “Anticorpos anti-beta2-glicoproteína I como fator de risco para infarto agudo do miocárdio” com amostras biológicas disponíveis em condições adequadas de armazenagem.

A população de controles normais foi constituída de 100 indivíduos saudáveis doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital São Lucas da PUCRS. Os doadores de sangue com idade igual ou superior a 40 anos foram alocados consecutivamente. Os dados foram obtidos através do questionário de pré-triagem (Anexo C) e base de dados (Anexo D). No momento da entrevista, o médico hemoterapeuta incluiu anamnese referente à presença ou história de doenças reumáticas articulares e não articulares e/ou presença de doença coronariana. Os doadores com anamnese positiva foram excluídos. Os doadores de sangue tiveram um tempo de espera mínimo de 30 minutos até a coleta da alíquota de sangue para análise.

### **5.2.2 Critérios de Inclusão e Exclusão**

*Os critérios de inclusão foram os seguintes:*

#### **Artrite Reumatóide**

- adultos com idade igual ou acima de 18 anos;
- o diagnóstico de AR ocorreu no mínimo 6 meses antes da entrada no estudo;
- pacientes com diagnóstico clínico de AR (Anexo A: Critérios de Classificação da artrite reumatóide do Colégio Americano de Reumatologia de 1988) (Arnett et.al., 1988).

#### **Osteoartrite**

- pacientes com diagnóstico clínico de OA (Anexo B: Critérios de classificação de osteoartrite do Colégio Americano de Reumatologia de 1990 e 1991) (Altman R et.al., 1990; Altman et.al., 1991).

#### **Infarto Agudo do Miocárdio**

- o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio foi realizado por cardiologistas com base na história clínica, alterações eletrocardiográficas e testes laboratoriais confirmando necrose do miocárdio (Seventh Report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure - JNC7, 2003).
- pacientes maiores de 16 anos com infarto agudo do miocárdio, que foram admitidos no Hospital São Lucas da PUCRS nos primeiros 7 dias do início dos sintomas.

#### Grupo-Controle

- doadores de sangue (aptos) do Banco de Sangue do Hospital São Lucas da PUCRS (Anexo C: questionário pré-triagem clínica para doação de sangue).
- sem queixas reumáticas ou cardiovasculares (anamnese realizada pelo médico hemoterapeuta durante a entrevista pré-doação).

#### *Os critérios de exclusão consistiram de:*

- amostras séricas com indícios de contaminação bacteriana ou fúngica;

#### Artrite Reumatóide/Osteoartrite

- pacientes com outra doença do tecido conjuntivo que não AR ou OA;

#### Infarto Agudo do Miocárdio

- endocardite infecciosa;
- neoplasias (atuais ou passadas);
- infecção pelo vírus da imunodeficiência humana ou *Treponema pallidum*;
- presença de trombose de causa hereditária conhecida;
- diagnóstico prévio de síndrome do anticorpo antifosfolípido ou outra doença do tecido conjuntivo.

#### Grupo Controle

- queixa reumática e/ou cardiovascular;
- idade inferior a 40 anos.

### **5.3 Local**

O presente estudo foi realizado a partir da coleta de dados e amostras de indivíduos saudáveis, doadores de sangue do Hospital São Lucas da PUCRS, e da análise das fichas clínicas e materiais de biobancos autorizados dos seguintes pesquisadores:

- Profa. Dra. Inês Guimarães da Silveira: “Probabilidade de artrite reumatóide a partir da testagem para fator reumatóide e anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico”. Indivíduos com diagnóstico de artrite reumatóide e artrite.

- Prof. Dr. Henrique Staub: “Anticorpos anti-beta2-glicoproteína I como fator de risco para infarto agudo do miocárdio”. Indivíduos com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio.

Os termos de autorização dos pesquisadores e procedimentos relacionados à utilização de dados e material biológico foram apresentados no projeto de pesquisa aprovado pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Anexo E) e pelo CEP-PUCRS ofício 923/05 (Anexo F).

## **5.4 Período de Tempo**

A coleta de dados do estudo teve duração total de 8 meses.

O período de inclusão dos pacientes com AR e OA transcorreu no período de 15 de abril até 15 de outubro de 2003. O material biológico foi mantido em biobanco a  $-70^{\circ}\text{C}$  (sem ciclos de congelamento e descongelamento).

O período de inclusão dos pacientes com infarto agudo do miocárdio foi de julho de 2001 a agosto de 2002. O material biológico foi mantido em biobanco a  $-70^{\circ}\text{C}$  (sem ciclos de congelamento e descongelamento).

O período de coleta de dados e amostras de doadores de sangue aptos à doação foi de 1º de outubro a 27 de dezembro de 2005. O material foi mantido em biobanco a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem (tempo inferior a 6 meses após a coleta da amostra).

## **5.5 Metodologia**

### ***5.5.1 Dosagem da COMP***

A testagem da COMP/TSP-5 foi realizada utilizando o sistema COMP ELISA AnaMar™ (Uppsala, Suécia) utilizando-se agitador IKA-Schüttler MTS (Alemanha),

lavadora ELX50 (Biotek Instruments Inc., EUA) e leitora de microplacas ELX800 (Biotek Instruments Inc., EUA).

O sistema COMP ELISA AnaMar™ é um imunoenensaio em fase sólida baseado na técnica de sanduíche direto em que dois anticorpos monoclonais são dirigidos contra determinantes antigênicos separados na molécula da COMP. Durante a incubação, a COMP na amostra reage com os anticorpos anti-COMP marcados com peroxidase e anticorpos anti-COMP ligados à placa de microtitulação. Um único passo de lavagem remove os anticorpos marcados com enzima não ligados. O conjugado ligado é detectado por uma reação com 3,3',5,5'tetrametilbenzidina. Esta reação é bloqueada pela adição de um ácido dando um ponto final colorimétrico lido espectrofotometricamente a 450 nm. O limite de detecção do sistema utilizado é  $< 0,1$  U/L e o coeficiente de variação interensaio  $< 5\%$ . A análise foi realizada conforme instruções do fabricante com curvas de calibração (padrões de COMP humana) e dois soros controle incluídos em cada microplaca. Efeito gancho para altas doses (*High Hook Effect*) não foi descrito até 200 U/L (AnaMar Medical™, 2004).

### Performance da COMP/TSP-5 proposta pelo fabricante (AnaMar Medical™)

#### Valores esperados em doadores de sangue

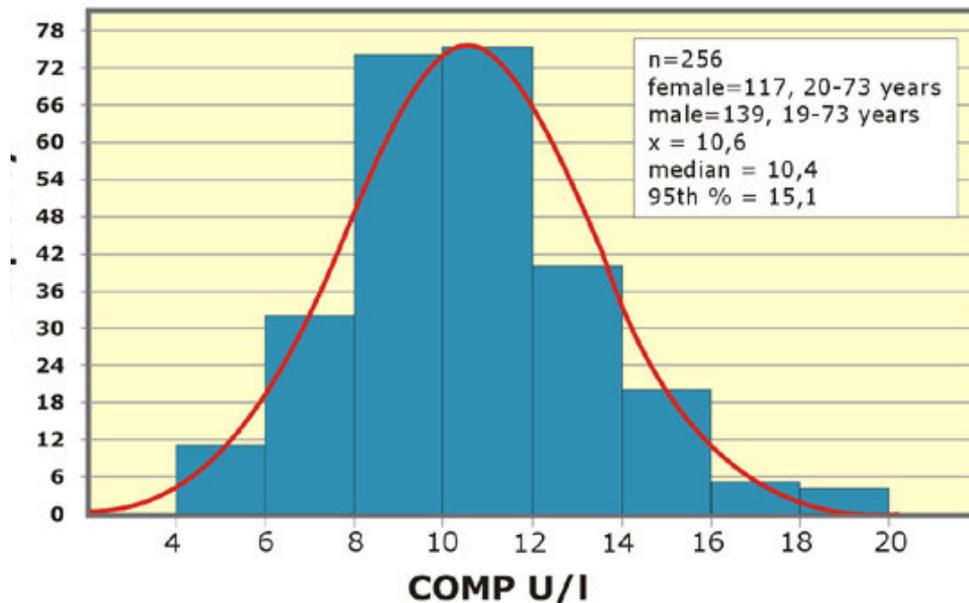


Figura 9 - Curva de distribuição normal dos doadores de sangue avaliados por AnaMar™ (AnaMar Medical™, 2004).

## 5.6 Controle do Erro Sistemático

### 5.6.1 Vieses de seleção

O controle dos vieses de seleção foi efetuado pela estrita definição de casos pelos pesquisadores colaboradores quanto aos critérios diagnósticos de AR, OA ou IAM. O grupo-controle foi entrevistado e selecionado pela equipe (3 hemoterapeutas envolvidos) do Serviço de Hemoterapia do Banco de Sangue do Hospital São Lucas atenta à anamnese especial de exclusão para o estudo. Tanto casos quanto controles provenientes do mesmo centro terciário.

A utilização de amostras de biobanco é sabidamente uma fonte de erro pontencial. No entanto, os biobancos e bases de dados que originaram os grupos casos foram montados cuidadosamente pelas equipes envolvidas e as amostras armazenadas adequadamente.

### 5.6.2 Vieses de aferição

Os vieses de aferição foram evitados, a princípio, a partir da seleção de casos com desfecho bem definido e amostras armazenadas adequadamente. Dessa forma, não houve problemas de memorização (“*recall*”). Os controles foram selecionados consecutivamente dentro de procedimento padrão por equipe técnica capacitada.

Os cuidados com a armazenagem e seleção de amostras (sem evidências de hemólise, lipemia, icterícia ou contaminação bacteriana) contribuíram para a fidedignidade das dosagens da COMP.

As análises foram realizadas conforme instruções do fabricante, com realização de curva de calibração em duplicata a cada bateria realizada. Soros controles de dois níveis (alto e baixo) foram corridos também a cada bateria para validar e monitorar o coeficiente de variação interensaio.

### 5.6.3 Vieses de confusão

Os vieses de confusão foram evitados pelo delineamento (estudo de caso-controles) de acordo com o objetivo proposto pelo estudo e análise estatística adequada.

A abordagem da influência da cinética da COMP bem como de possíveis interferentes analíticos será feita na discussão.

## 5.7 Análise Estatística

Os dados contínuos foram descritos por média e desvio-padrão, enquanto que para as variáveis categóricas foi utilizada a frequência absoluta e o percentual.

Para as comparações das variáveis quantitativas com distribuição gaussiana entre mais de 2 grupos usou-se análise de variância (ANOVA) e, aquelas envolvendo somente dois grupos optou-se pelo teste *t* de Student. Para a avaliação do efeito de confusão de idade/sexo e obtenção de médias ajustadas da COMP para esses fatores, usamos um modelo de análise de covariância seguido de teste de *post hoc* de Sidak para localização de diferenças.

Para avaliar o desempenho diagnóstico dos testes foram calculados os *likelihood ratio* (razão de verossimilhança) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Em situações nas quais não foi possível obter-se o LR devido a frequências nulas, foi utilizada a anotação “nd” (não determinável). A tabela 3 mostra os critérios de interpretação dos LR utilizada no estudo.

**Tabela 3 - Força relativa do likelihood ratio (razão de verossimilhança).**

Likelihood ratio		Interpretação
+	-	
10	< 0,1	Grande variação do pré-teste para o pós teste.
5 a 10	0,1 a 0,2	Moderada variação do pré-teste para o pós-teste.
2 a 5	0,2 a 0,5	Pequena, mas algumas vezes importante, variação na probabilidade.
1 a 2	0,5 a 1	Pequena, raramente importante, variação na probabilidade.
1	1	Probabilidade pré-teste = probabilidade pós teste.

Adaptado de Deeks e Altman, 2004.

O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ . Foram utilizados os programas MEDCALC for Windows (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium) e SPSS for Windows, versão 11.5 (SPSS Inc., Chicago, EUA) para a execução da análise dos dados.

A força de associação entre níveis de COMP e doença reumática (artrite ou osteoartrite) e infarto agudo do miocárdio foi avaliada através de “odds ratio” (razão de chances) e seus respectivos intervalos de confiança.

Abaixo (tabela 4), a escala para avaliação e interpretação da magnitude da força de associação *odds ratio* (OR) proposta por Hopkins utilizada em nosso estudo.

**Tabela 4 - Força de associação do odds ratio.**

Associação	Odds Ratio (OR)
Trivial	1,0 a 1,4
Pequena	1,5 a 3,4
Moderada	3,5 a 8,9
Grande	9,01 a 31,9
Muito Grande	32,0 a 359,0
Quase Perfeita	360,0 a $\infty$

Adaptado de Hopkins, 2000.

Devido ao desenho do nosso estudo e tamanho amostral, não avaliamos a prevalência de doença na população local. A prevalência utilizada para o cálculo dos valores preditivos

está indicada abaixo de cada tabela. A probabilidade individual (*subject probability*) modifica o valor preditivo (VP).

## **5.8 Ética**

O estudo foi realizado em conformidade com as resoluções do Conselho Nacional de Saúde. O projeto deste estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Ofício n.º 923/05-CEP, Anexo F)

O estudo utilizou amostras cadastradas em biobancos e os dados capturados das bases de dados dos projetos citados e/ou revisão de prontuários. Tendo em vista o fato de até o presente momento a literatura não indicar alterações na conduta médica em face dos níveis de COMP, foi solicitada a dispensa de apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os resultados das dosagens de COMP foram fornecidos aos pesquisadores responsáveis pelas bases de dados, procedimento aprovado pelo CEP/PUCRS.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Características clínico demográficas da amostra analisada

Nosso estudo compreendeu a análise do soro de 269 indivíduos provenientes de solicitações do ambulatório de reumatologia, emergência e internação do Hospital São Lucas da PUCRS. Os indivíduos saudáveis (grupo-controle) eram doadores de sangue do mesmo hospital.

A tabela 5 demonstra que foram alocadas mais mulheres com AR e OA, enquanto a amostra com IAM abrangiu maior número de indivíduos do sexo masculino. A amostra reproduziu a prevalência das doenças estudadas entre os sexos (tabela 5).

Em nosso meio a maioria dos doadores de sangue são jovens. A seleção de doadores com idade  $\geq 40$  anos foi realizada a fim de haver uma aproximação à faixa etária dos grupos casos. Pacientes com IAM e OA tiveram média de idade significativamente superior a do grupo-controle. Não houve diferença significativa quando se comparou média de idade de pacientes com AR e grupo-controle.

**Tabela 5 - Características da amostra analisada.**

<b>Grupo</b>	<b>Sexo Feminino (n)</b>	<b>P</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>P</b>
Controle n = 100	45 (45%)	-	48±6	-
AR n = 63	51 (81%)	<0,05	54±14	> 0,05
OA n = 40	35 (88%)	<0,05	65±9	< 0,05
IAM n = 66	20 (30%)	<0,05	58±10	< 0,05

n: número de indivíduos

Os dados são apresentados com contagem (percentual) e média  $\pm$  desvio padrão.

P: significância estatística. Teste qui quadrado.

Os valores de P referem-se aos grupos caso em relação ao grupo controle

AR: artrite reumatóide; OA: osteoartrite; IAM: infarto agudo do miocárdio.

Na análise intragrupos, não houve diferença entre as médias de idade de homens e mulheres. Entre os grupos, as médias de idade de mulheres do grupo controle e AR diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) em relação às mulheres dos grupos OA e IAM. A média etária dos

homens dos grupos casos foi significativamente maior em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ) (tabela 6).

**Tabela 6 - Características da amostra analisada (média etária por sexo).**

		<b>Controle</b> n = 100	<b>AR</b> n = 63	<b>OA</b> n = 40	<b>IAM</b> n = 66
<b>Idade (anos)</b>	Feminino	48±6 <sup>(a)</sup>	53±15 <sup>(a)</sup>	65±8 <sup>(b)</sup>	61±11 <sup>(b)</sup>
	Masculino	49±6 <sup>(a)</sup>	59±13 <sup>(b)</sup>	62±14 <sup>(b)</sup>	57±10 <sup>(b)</sup>
<b>P</b>		0,54	0,19	0,54	0,12

Os dados são apresentados com média e média ± desvio padrão.

P: significância estatística. Entre os grupos diagnósticos as letras índices não coincidentes representam diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) em teste post-hoc (Tukey).

AR: artrite reumatóide; OA: osteoartrite; IAM: infarto agudo do miocárdio.

n: número de indivíduos

A tabela 7 estratifica tempo de doença em pacientes com AR e OA. A maioria dos pacientes com OA (40%) cursavam com 5-10 anos de doença. A distribuição desta variável em pacientes com AR foi mais homogênea (aproximadamente um quarto dos pacientes para cada estratificação de tempo de doença).

**Tabela 7 - Tempo de doença nos grupos com doença reumática prevalente: osteoartrite (OA) e artrite reumatóide (AR).**

<b>Tempo de doença</b> <b>(anos)</b>	<b>OA n = 40</b>		<b>AR n = 63</b>	
	<b>n° / %</b>	<b>% corrigido</b>	<b>n° / %</b>	<b>% corrigido</b>
< 2 anos	10 (25%)	- (33,3%)	16 (25%)	- (28%)
2   5 anos	6 (15%)	- (20%)	11 (17,5%)	- (19%)
5   10 anos	12 (30%)	- (40%)	15 (24%)	- (26%)
> 10 anos	2 (5%)	- (6,7%)	15 (24%)	- (26%)
Sem dado disponível	10 (25%)	-	6 (9,5%)	-

Os dados são apresentados com contagem e percentual.

| Indica intervalos fechados à esquerda e abertos à direita.

% corrigido: percentual corrigido tomando como base o número de observações disponíveis.

n°: número de indivíduos

OA: osteoartrite; AR: artrite reumatóide

Entre os pacientes com IAM, somente 15,2% haviam tido infarto prévio. A presença de dislipidemia e tabagismo foi equitativa (cerca da metade dos pacientes). Diabetes mellitus foi diagnosticado em aproximadamente um quarto dos pacientes com IAM (tabela 8)

**Tabela 8 - Características do grupo com infarto agudo do miocárdio (IAM).**

n = 66	Dislipidemia	Diabetes mellitus	IAM prévio	Tabagismo
	n° (%)	n° (%)	n° (%)	n° (%)
Sim	31 (47,0%)	18 (27,3%)	10 (15,2%)	37 (56,1%)

Os dados são apresentados com contagem (n°) e percentual (%).

n: número de indivíduos.

IAM: infarto agudo do miocárdio.

## 6.2 Performance da COMP nos Controles Saudáveis Analisados

O teste de normalidade da COMP (Q/Q test) mostrou sobreposição de curvas entre normal esperada e valor observado em teste de qui quadrado.

A média de COMP nos 100 controles normais doadores de sangue foi de 6,9 U/L com desvio padrão de 3,0 (IC95%: 6,3 a 7,5) (Tabela 9) (Figura 10).

**Tabela 9 - Frequência de COMP no grupo controle.**

COMP (U/L)	n°	%
0  1	2	2
1  2	4	4
2  3	2	2
3  4	10	10
4  5	7	7
5  6	14	14
6  7	16	16
7  8	10	10
8  9	10	10
9  10	5	5
10  11	10	10
11  12	5	5
12  13	5	5
Total	100	100%

| : intervalo aberto à direita; | : intervalo aberto à esquerda

n: número; %: percentual

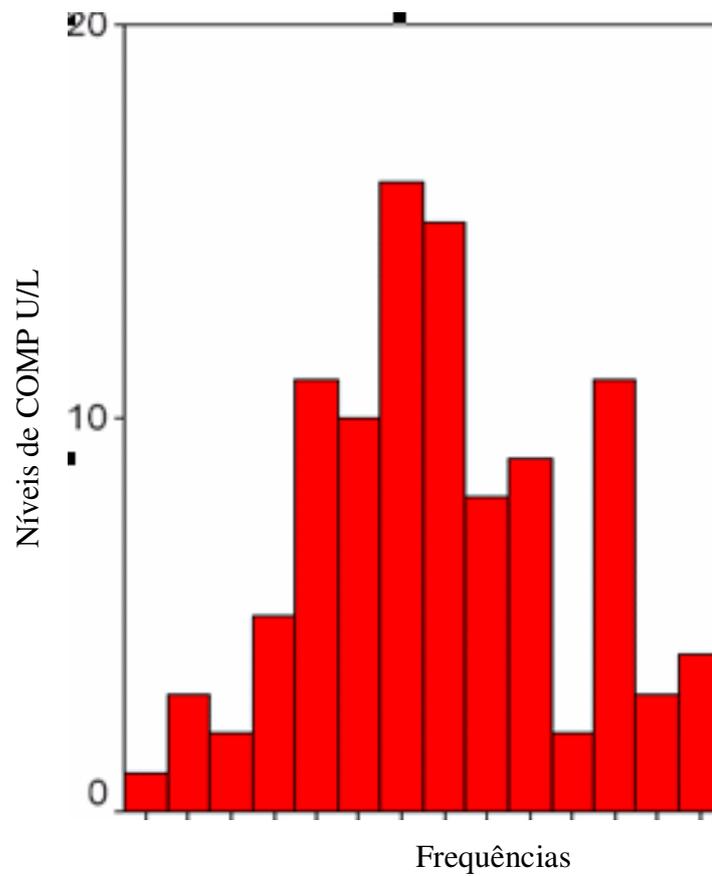
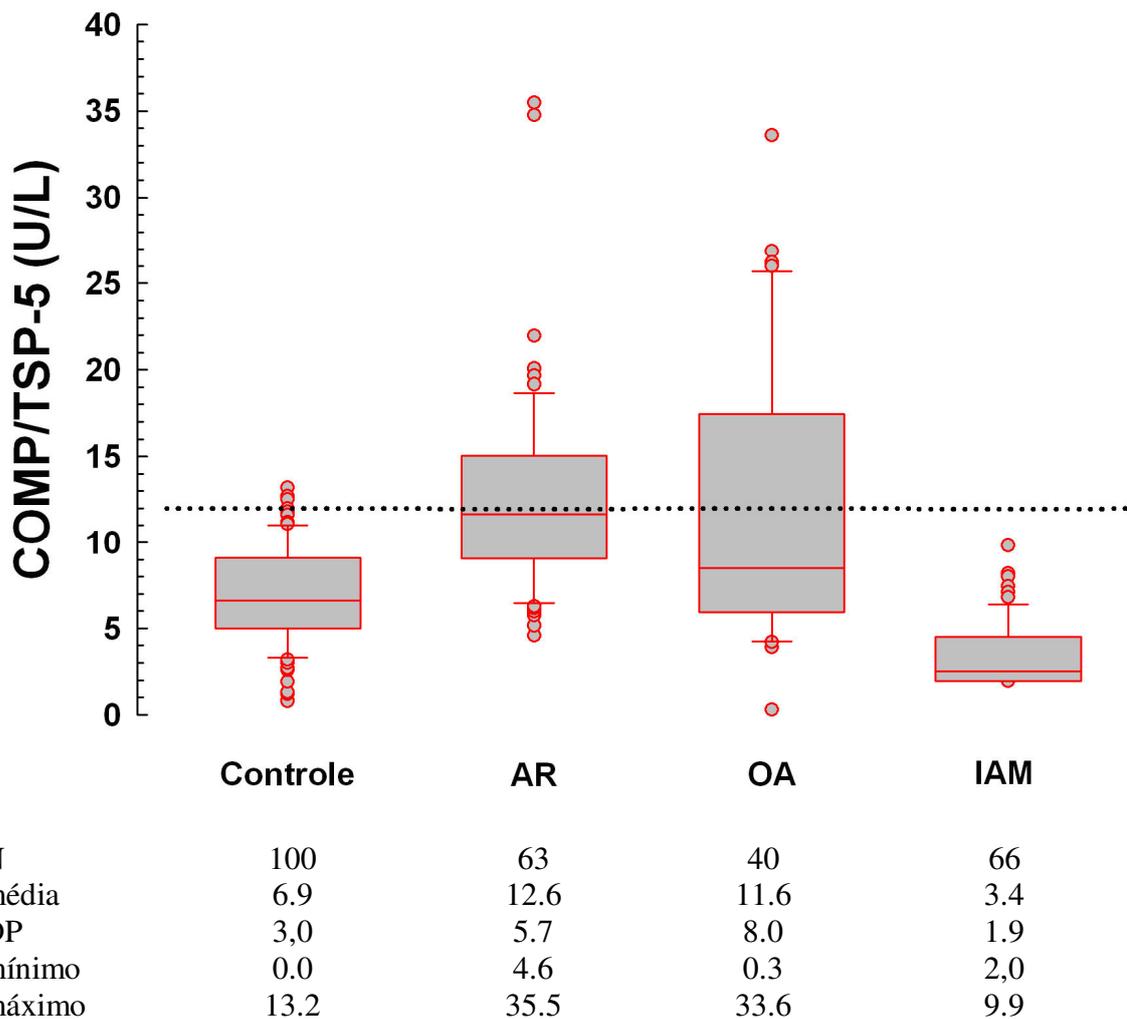


Figura 10 - Histograma de frequências de COMP no grupo controle

### 6.3 Desempenho da COMP/TSP-5 nos grupos estudados

Em gráfico *boxplot* são apresentados os valores de COMP nos grupos analisados. As médias de COMP diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) em todos os grupos caso em relação ao grupo controle (Figura 11).



As médias de COMP diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) em todos os grupos analisados em relação ao grupo controle.

Figura 11 - Valores de COMP (U/L) apresentados em gráficos de *boxplot* seguidos de estatísticas descritivas para a comparação de quatro grupos de indivíduos: controle, artrite reumatóide (AR), osteoartrite (OA) e infarto agudo do miocárdio (IAM).

#### 6.4 Comportamento da COMP/TSP-5 nos grupos caso em relação ao grupo controle

Analisamos o comportamento dos valores médios totais e por gênero de COMP para cada grupo caso em relação ao grupo controle. O modelo estatístico utilizado foi o teste de Post-hoc (Tukey ou SIDAK) para comparações múltiplas, representado nas tabelas 10,11 e 12 cada grupo de casos em relação ao grupo-controle. O valor de COMP ajustada para sexo e idade está apresentado em cada tabela.

Diferentemente do ocorrido nos grupos de casos, os níveis de COMP foram significativamente maiores em homens do que em mulheres dentro do grupo-controle.

No grupo AR não houve diferença nos níveis de COMP entre homens e mulheres. A comparação com o grupo controle mostrou que tanto as médias não ajustadas quanto as ajustadas para sexo e idade diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10 - Níveis de COMP (U/L) no grupo controle comparado ao grupo AR**

	<b>Controle n = 100</b>	<b>AR n = 63</b>	<b>P</b>
Medidas não ajustadas <sup>(1)</sup>	6,9±3,0	12,6±5,7	< 0,001
Homens	7,4±2,9	13,6±3,0	P=0,05 <sup>(3)</sup>   P=0,50 <sup>(3)</sup>
Mulheres	6,2±3,0	12,4±6,0	
Medidas após ajuste (total) <sup>(2)</sup>	7,3±0,5	12,9±0,7	< 0,001

n: número de indivíduos; P: diferença estatística;

<sup>(1)</sup> : os dados são apresentados com média ± desvio padrão. Teste post-hoc (Tukey)

<sup>(2)</sup> : ajuste obtido em modelo de análise de covariância com ajuste para idade e sexo. Valores representados como média ± erro padrão. Teste post-hoc (SIDAK)

<sup>(3)</sup> : teste t de Student

AR: artrite reumatóide

No grupo OA apesar das médias de COMP diferirem entre homens e mulheres não houve significância estatística, o que pode ser devido ao pequeno número de indivíduos do sexo masculino alocados no grupo.

Entre grupos controle e OA as médias de COMP não ajustadas ou ajustadas para sexo e idade diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11 - Níveis de COMP (U/L) grupo controle comparado ao grupo OA**

	<b>Controle n = 100</b>		<b>OA n = 40</b>	<b>P</b>
Medidas não ajustadas <sup>(1)</sup>	6,9±3,0		11,6±8,6	< 0,001
Homens	7,4±2,9	P=0,05 <sup>(3)</sup>	16,6±6,4	P=0,14 <sup>(3)</sup>
Mulheres	6,2±3,0		10,9±8,1	
Medidas após ajuste (total) <sup>(2)</sup>	7,3±0,5		13,1±1,1	< 0,001

n: número de indivíduos; P: significância estatística

<sup>(1)</sup> : os dados são apresentados com média ± desvio padrão. Teste post-hoc (Tukey )

<sup>(2)</sup> : ajuste obtido em modelo de análise de covariância com ajuste para idade e sexo. Valores representados como média ± erro padrão. Teste post-hoc (SIDAK)

<sup>(3)</sup> : teste t de Student.

OA: osteoartrite

Não houve diferença entre os níveis médios de COMP entre homens e mulheres no grupo IAM. Entre grupos controle e IAM, as médias de COMP sem ajuste ou ajustadas para sexo e idade apresentaram diferenças estatisticamente significativas (P<0,05) (Tabela 12).

**Tabela 12 - Níveis de COMP (U/L) no grupo controle comparado ao grupo IAM**

	<b>Controle n = 100</b>		<b>IAM n = 66</b>	<b>P</b>
Medidas não ajustadas <sup>(1)</sup>	6,9±3,0		3,4±1,9	< 0,001
Homens	7,4±2,9	P=0,05 <sup>(3)</sup>	3,6±2,0	P=0,26 <sup>(3)</sup>
Mulheres	6,2±3,0		3,4±1,9	
Medidas após ajuste (total) <sup>(2)</sup>	7,3±0,5		3,0±0,6	< 0,001

n: número de indivíduos; P: significância estatística

<sup>(1)</sup> : Os dados são apresentados com média ± desvio padrão. Teste de post-hoc (Tukey)

<sup>(2)</sup> : Ajuste obtido em modelo de análise de covariância com ajuste para idade e sexo. Valores representados como média ± erro padrão. Teste de post-hoc (SIDAK)

<sup>(3)</sup> : Teste t de Student

IAM: infarto agudo do miocárdio

### 6.5 Likelihood ratio (Razão de verossimilhança)

Categorizamos os níveis de COMP observados na amostra analisada calculando o *likelihood ratio* (LR). Após testar vários níveis, verificamos que o ponto de corte de 12U/L

melhor discriminou doença reumática prevalente (AR e OA) e 4 U/L melhor discriminou IAM. Níveis intermediários não modificaram a probabilidade de doença (tabela 13).

O LR mostra que níveis de COMP superiores a 12 U/L são sugestivos de AR ou OA, enquanto no grupo com IAM são os níveis inferiores a 4 U/L.

**Tabela 13 - Likelihood ratios (LR) dos diversos grupos diagnósticos em relação ao grupo controle para diferentes níveis de COMP.**

COMP (U/L)	AR n = 63		OA n = 40		IAM n = 66	
	LR	IC95 %	LR	IC95 %	LR	IC95 %
<4	<0,01	nd	0,42	0,13 a ,45	3,7	2,4 a 5,8
4   12,0	0,68	0,53 a 0,88	0,71	0,53 a 0,96	0,43	0,3 a 0,6
≥ 12,0	9,5	3,9 a 23,26	7,5	2,9 a 40,2	<0,1	nd

n: número de indivíduos

| Indica intervalos fechados à esquerda e abertos à direita.

IC95%: intervalo de confiança de 95%;

nd: não determinável

AR: artrite reumatóide; OA: osteoartrite; IAM: infarto agudo do miocárdio

Utilizando a análise de covariância verificamos que não havia efeito de confusão substancial de idade e sexo nas diferenças observadas entre os grupos. Assim, entende-se que os *likelihood ratios* apresentados não estão confundidos por sexo e idade.

Os níveis inferiores a 4 U/L mostraram-se característicos do grupo acometido por IAM na amostra analisada.

## 6.6 Desempenho da COMP nos Grupos Analisados

Não houve possibilidade de estratificação dos LRs por sexo para cada grupo devido ao tamanho amostral dos grupos analisados.

O OR de 17,3 evidencia forte associação entre níveis de COMP maiores ou iguais a 12U/L e AR. O LR+ indicou ser 9,5 vezes mais provável um resultado de COMP igual ou superior a 12 U/L em indivíduos com AR que em indivíduos sem AR. O LR-(0,55) mostra pequena (raramente importante) variação pré-teste para pós-teste nos níveis inferiores a 12 U/L. O ponto de corte escolhido evidenciou baixa sensibilidade (47,6%) e alta especificidade

(95%) no diagnóstico de AR. Ao considerarmos uma probabilidade pré-teste com base na taxa de prevalência apresentada no estudo COPCORD (*Community Oriented Program for the Control of Rheumatic Diseases: studies of rheumatic diseases in the developing world* (Muirden, 2005)) de 0,46% (Senna et al., 2004), a probabilidade pós-teste (VPP) fica em torno de 4,2%. Um menos o VPN indica a probabilidade de doença frente a um teste negativo de 0,3% (tabela 14).

**Tabela 14 - Desempenho da COMP no diagnóstico da AR**

<b>Característica do teste</b>	<b>Com AR</b>	<b>Sem AR (Controles)</b>
≥ 12 U/L	30	5
< 12U/L	33	95
Sensibilidade	47,6% (IC95%: 34,9 a 60,6)	
Especificidade	95,0% (IC95%: 88,7 a 98,4)	
Probabilidade Pós-Teste (VPP)	4,2%** ( IC95%: 1,41 a 14,9)	
1-VPN	0,3%** (IC95%: 0,4 a 0,2)	
OR	17,3 (IC95%: 5,7a 55,7)	
LR+	9,5 (IC95%: 3,9 a 23,3)	
LR-	0,55 (IC95%: 0,43 a 0,70)	

\*\* Prevalência 0,46% de AR (Senna et al., 2004)

AR: artrite reumatóide; OR: odds ratio; LR: likelihood ratio; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

IC95%: intervalo de confiança de 95%

O OR de 11,4 indica grande associação entre níveis iguais ou superiores a 12 U/L e OA.

O LR+ indicou ser 7,5 vezes mais provável um resultado de COMP maior ou igual a 12 U/L em OA que em indivíduos sem OA. O LR- (0,66) mostra pequena (raramente importante) variação pré-teste para pós-teste nos níveis inferiores a 12 U/L. Assim como em AR, o ponto de corte de 12U/L evidenciou baixa sensibilidade (37,5%) e alta especificidade (95%) diagnóstica em OA. Ao considerarmos a probabilidade pré-teste com base na taxa de prevalência apresentada no estudo COPCORD (*Community Oriented Program for the Control of Rheumatic Diseases: studies of rheumatic diseases in the developing world* (Muirden, 2005)) de 4,14% (Senna et al., 2004), a probabilidade pós-teste (VPP) fica em 24,5% (tabela 15). Um menos o valor preditivo negativo indica uma probabilidade de doença frente a um teste negativo de 3% (tabela 15) para a prevalência testada.

**Tabela 15 - Desempenho da COMP no diagnóstico da OA**

Característica do teste	Com OA	Sem OA (Controles)
≥ 12 U/L	15	5
< 12U/L	25	95
Sensibilidade	37,5% (IC95%: 22,7a 54,2)	
Especificidade	95,0% (IC95%: 88,7 a 98,4)	
Probabilidade Pós-Teste (VPP)	24,5%** (IC95%: 8 a 59,4)	
1 - VPN	3%** (IC95%: 3,6 a 2,0)	
OR	11,4 (IC95%: 3,4 a 40,2)	
LR+	7,5 (IC95%: 2,9 a 19,3)	
LR-	0,66 (IC95%: 0,52 a 0,84)	

\*\* Prevalência 4,14% OA (Senna et al., 2004)

OA: osteoartrite

IC95%: intervalo de confiança de 95%

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; OR: odds ratio; LR: likelihood ratio

No grupo IAM, o OR de 9,1 indica grande associação entre níveis de COMP < 4 U/L e infarto agudo do miocárdio.

O LR+ indica ser 3,7 vezes mais provável um resultado de COMP inferior a 4 U/L em IAM que em não infartados. O LR- (0,4) mostra que é menos provável encontrar um resultado  $\geq 4$  U/L (negativo para infarto no nosso estudo) em IAM quando comparados aos não infartados. A sensibilidade (66,7%) foi baixa e a especificidade (82%) ao ponto de corte escolhido foi moderada.

Utilizamos para cálculo de valor preditivo positivo um valor de prevalência de 15% baseado no GRACE *Study* (Global Registry of Acute Coronary Events, 1998). A probabilidade pós-teste VPP fica em torno de 39,5%. Um menos o VPN indica uma probabilidade de doença frente a um teste negativo de 7% (tabela 16).

**Tabela 16 - Desempenho da COMP no diagnóstico do IAM**

<b>Característica do teste</b>	<b>Com IAM</b>	<b>Sem IAM (Controles)</b>
< 4 U/L	44	18
$\geq 4$ U/L	22	82
Sensibilidade	66,7% (IC95%: 54,0 a 77,8%)	
Especificidade	82,0% (IC95%: 73,0 a 89,0%)	
Probabilidade Pós-Teste (VPP)	39,5%** (IC95%: 26,1 a 55,5%)	
1 – VPN (Valor Preditivo Negativo)	7% ** (IC95%: 10,1 a 4,2%)	
OR	9,1 (IC95%: 4,2 a 20,1)	
LR +	3,7 (IC95%: 2,4 a 5,8)	
LR -	0,4 (IC95%: 0,63 a 0,25)	

\*\*\* Prevalência IAM: 15% para IAM no Brasil (Global Registry of Acute Coronary Events, 1998)

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; OR: odds ratio; LR: likelihood ratio

IC95%: intervalo de confiança de 95%

IAM: infarto agudo do miocárdio

## 7 DISCUSSÃO

Nosso estudo explora a possibilidade da COMP se associar a AR, OA e IAM. A decisão pelo delineamento de caso-controle, modalidade de investigação retrospectiva, deveu-se à opção de averiguarmos o comportamento da proteína em indivíduos com desfechos já definidos. Sabidamente, estudos de caso-controle são adequados a situações onde o haja a presença e definição estrita de uma doença e onde fator de exposição não seja raro (Mortimer e Borenstein, 2006).

Desta forma, nossa análise estatística não incluiu cálculo de incidências ou prevalências. A estimativa da razão de chances (OR) aferiu se o impacto dos níveis alterados de COMP foi maior nos casos (AR, OA e IAM) do que nos controles.

A performance diagnóstica da COMP nos grupos estudados está apresentada através da sensibilidade, especificidade (características do teste que permanecem constantes em diferentes populações analisadas) (Gallagher, 1998), e valores preditivos. Em face da vulnerabilidade dos valores preditivos, pois são numericamente instáveis e dependentes da prevalência da doença (Gallagher, 1998), optamos por apresentá-los frente a prevalências descritas na literatura e focar a análise utilizando razões de verossimilhança, ou *likelihood ratios* (LR).

O LR utiliza a estabilidade da sensibilidade e da especificidade (Gallagher, 1998), e refina o cálculo de probabilidade de doença a partir de estratificação de níveis da variável de exposição (Grimes e Schulz, 2005). É uma medida semiquantitativa que indica o quanto um procedimento diagnóstico modifica a probabilidade de doença (Halkin et al., 1998).

O LR indica a probabilidade que determinada testagem positiva se associe a indivíduos com a doença, comparativamente à probabilidade de o mesmo resultado ocorrer em pessoas sem a doença (Gallagher, 1998; Deeks e Altman, 2004). Idealmente, resultados anormais deveriam ser mais típicos em indivíduos doentes que nos não-doentes (alto LR), e resultados normais serem mais freqüentes em indivíduos não-doentes do que com doença (baixo LR). LRs próximos à unidade têm pequeno efeito em decisões diagnósticas (Grimes e Schulz, 2005). Acreditamos que a inclusão da aferição de cálculo de LR possa ter contribuído para a compreensão do comportamento biológico da COMP nos nossos grupos de pacientes, como comentaremos adiante.

Vários grupos têm estudado a COMP como marcador prognóstico de lesão articular precoce. Para avaliação prognóstica nosso grupo de pesquisa tem em andamento o estudo

“Marcadores de Progressão e Atividade na Artrite Reumatóide: Fator Reumatóide, Proteína C Reativa, Velocidade de Hemossedimentação e Proteína Oligomérica da Matriz da Cartilagem. Estudo de seguimento de dois anos” (Anexo G), onde buscamos verificar se os níveis de COMP marcam precocemente lesão articular em AR.

Mesmo com vários estudos apontando o papel prognóstico da COMP em AR e OA, seu uso ainda não é corrente, permanecendo sob questionamento no “*Food and Drug Administration*” (FDA) Americano.

Pouco se sabe sobre o papel do quinto membro da família das trombospondinas. Há um questionamento quanto à especificidade articular da COMP, principalmente pelo fato de pertencer a importante e amplo grupo de proteínas de matriz extracelular (TSPs).

Neste estudo, a avaliação dos níveis séricos de COMP como teste diagnóstico serve para mensurar seu comportamento em três situações clínicas: uma inflamatória (AR), uma degradativa (OA) e outra aterosclerótica (IAM).

### **7.1 Possíveis interferentes analíticos: influência da cinética da COMP nos níveis séricos**

Andersson e colaboradores demonstraram diminuição nos níveis séricos de COMP em pacientes com AR e OA durante o sono noturno, com o pico inferior dos níveis às 5 horas da manhã. Durante o dia, a concentração sérica da COMP não variou em pacientes com AR ou OA. Dessa forma, não parece haver necessidade de padronização do momento da coleta sanguínea (Andersson et al., 2006). A utilização de materiais de biobancos não caracterizou viés cinético no nosso estudo, a princípio.

No estudo de Mündermann e colaboradores, o nível basal da COMP em indivíduos saudáveis imediatamente antes do exercício de caminhada por 30 minutos foi de  $9,98 \pm 3,38$  U/L. A dosagem utilizou o mesmo sistema diagnóstico adotado em nosso estudo (AnaMar Medical™). As mulheres apresentaram concentração média de COMP significativamente inferior aos homens ( $6,72 \pm 1,55$  U/L;  $11,59 \pm 2,35$  U/L). No nosso estudo o nível médio de COMP nas mulheres no grupo controle foi de  $6,2 \pm 3,0$  e nos homens  $7,4 \pm 2,9$ , achado também de significância. A amostra analisada por Mündermann foi pequena, 5 mulheres e 5 homens; a média de idade ( $31,9 \pm 5,9$ ) foi inferior à população saudável avaliada no nosso estudo (média 48 anos). Os autores concluíram que atividades simples, como caminhar por 30 minutos pode elevar os níveis de COMP em média 9,7% (Mündermann et al., 2005). Os controles saudáveis

alocados em nosso estudo tiveram um tempo de espera mínimo de 30 minutos antes da coleta da amostra sanguínea.

O simples percurso da residência até o local da coleta para testagem do sangue pode representar uma parte da atividade diária de caminhada em indivíduos com AR ou OA (Mündermann et al., 2005). Desse modo, a falta de controle da atividade física antes da coleta da amostra sanguínea pode alterar a concentração da COMP.

Mündermann e colaboradores sugerem que a elevação imediata na concentração da COMP após 30 minutos de exercício e durante uma corrida vigorosa reflete aumento da difusão dos fragmentos de COMP da cartilagem para a circulação devido à carga articular fisiológica cíclica na articulação. Contudo, atividades diárias como caminhadas estimulam a remodelagem da cartilagem em indivíduos normais em vez de iniciar a sua degradação (Mündermann et al., 2005).

É possível que o efeito da caminhada até o local da coleta sanguínea nos pacientes com AR e OA seja um viés no uso da COMP na prática clínica. Os pacientes com AR e OA e controles alocados no nosso estudo realizaram coleta de amostra sanguínea no Hospital São Lucas da PUCRS, onde o tempo de espera entre cadastro e punção é de no mínimo 30 minutos (dados não publicados, observação da pesquisadora). O achado está em concordância com as recomendações de Münderman e colaboradores (Mündermann et al., 2005). De fato, não há estudos que avaliem o efeito da marcha nos níveis séricos de COMP em pacientes com doença reumática estabelecida.

Kersting e colaboradores analisaram a relação entre a alteração nos níveis séricos de COMP decorrente de carga articular do joelho durante corrida e a diminuição do volume da cartilagem articular em atletas. Os níveis de COMP antes do exercício foram significativamente menores em mulheres comparados aos homens ( $6,11 \pm 2,31$  U/L e  $9,03 \pm 2,72$  U/L respectivamente,  $P = 0,0286$ ) (Kersting et al., 2005).

No nosso estudo, apesar das médias de COMP entre homens e mulheres terem diferido em todos os grupos, as diferenças não foram estatisticamente significativas (exceção ao grupo controle,  $P=0,05$ ).

## 7.2 Possíveis interferentes analíticos: reatividade cruzada com a TSP-1

Embora a família das trombospondinas exiba a porção carboxiterminal idêntica, o estudo realizado por Neidhart e colaboradores não evidenciou reatividade cruzada de anticorpos policlonais com a trombospondina humana 1 (TSP-1) recombinante ou interferência de fator reumatóide. Neste mesmo estudo, Neidhart e colaboradores não demonstraram nenhuma diferença entre homens e mulheres (Neidhart et al., 1997). Dessa forma, os anticorpos utilizados nos sistemas diagnósticos para a dosagem da COMP parecem não se ligar cruzadamente à TSP-1 e não sofrer influência do fator reumatóide (interferente comum nos testes de ELISA para anticorpos) em amostras de pacientes com AR.

## 7.3 Possíveis interferentes analíticos: fragmentos de COMP e anticorpos de captura no sistema diagnóstico (“kit”)

O papel exato da COMP na regulação no metabolismo do tecido articular não está totalmente compreendido, mas entende-se que a COMP intacta e os fragmentos de COMP alcançam o líquido sinovial e migram para a circulação sanguínea através da cápsula articular. O kit de ELISA utilizado em nosso estudo não é capaz de diferenciar entre as várias formas de fragmentos da COMP (Kersting et al., 2005). No entanto, o fato do sistema de detecção da COMP pelo sistema ELISA AnaMar™ basear-se em dois anticorpos monoclonais contra determinantes antigênicos diferentes melhora sua performance e sensibilidade.

Jordan JM e colaboradores avaliaram a diferença na detecção da COMP sérica utilizando ELISA com um anticorpo monoclonal (17-C10) ou dois anticorpos monoclonais (17-C10 e 16-F12), obtendo melhor desempenho do segundo (Jordan et al., 2003).

O anticorpo monoclonal 16-F12 (anticorpo de captura) reconhece o domínio aminoterminal enquanto o anticorpo 17-C10 reconhece o domínio EGF-like. Esses anticorpos não competem pela ligação com a COMP (Vilím V 2002). O anticorpo 12-C4 reconhece o domínio carboxiterminal (Vilím et al., 2003).

O sistema COMP ELISA AnaMar™ utiliza anticorpos monoclonais de captura e revelação contra seqüências diferentes na molécula da COMP. Após contato com o fabricante não recebemos a confirmação de que os dois anticorpos monoclonais sejam os mesmos

descritos por Jordan e colaboradores. Acreditamos, porém, que a AnaMar™ provavelmente empregue a tecnologia 17-C10 e 16-F12, visto que os grupos de pesquisa suecos (local de origem da empresa) são referências nos estudos de marcadores tecido-específicos em doenças reumáticas.

#### **7.4 Fatores de Confusão**

Clark AG e colaboradores, analisando o nível sérico de COMP de 143 indivíduos com indícios radiográficos de OA e 148 controles (indivíduos sem indício radiográfico de OA) por ELISA (anticorpo 17-C10), observaram que o nível sérico médio de COMP no grupo controle em população não afetada aumenta com a idade, fenômeno particularmente observado em mulheres (Clark et al., 1999)

Jordan e colaboradores e Mundermann e colaboradores descreveram valores de COMP mais altos em homens caucasianos comparativamente a mulheres, bem como uma correlação positiva com o índice de massa corporal (Jordan et al., 2003; Muendermann et al., 2005). O estudo de Jordan e colaboradores faz parte do estudo prospectivo do “The Johnston County Osteoarthritis Project “ que avalia a ocorrência e progressão de OA de joelho e quadril em uma população rural multiétnica do estado americano da Carolina do Norte. Nesse estudo, no qual 379 afroamericanos e 390 caucasianos foram avaliados, a associação entre o LnCOMP e idade foi demonstrada. A força da associação estatística entre o LnCOMP e idade não foi afetada pelo ajuste para achados radiológicos, índice de massa corporal, altura, grupo étnico, sexo ou outras articulações sintomáticas. Depreende-se então que outros fatores não examinados previamente devam ser responsáveis pela associação (Jordan et al., 2003).

Mazzuca e colaboradores, ao estudarem 132 indivíduos em coorte que analisa fatores de risco para OA tibiofemural, relataram OR para alterações radiográficas precoces em OA de joelho 3 vezes maior em afroamericanos comparativamente a caucasianos. O achado de Mazzuca e colaboradores divergiu em relação ao de Jordan e colaboradores (“The Johnston County Osteoarthritis Project “). As diferenças raciais em relação à presença de OA podem estar refletindo uma maior densidade óssea observada em negros em relação a outras raças. Altos níveis de densidade óssea foram associados a um aumento no risco de incidência de OA de joelho (Mazzuca et al., 2006).

No nosso estudo, a diferença entre níveis de COMP entre homens e mulheres foi significativa ( $P=0,05$ ) no grupo controles, mas não nos pacientes com AR, OA e IAM. Não dispomos de detalhamento quanto à raça dos 269 indivíduos alocados no nosso estudo nos diversos grupos. No entanto, foi notório o predomínio de caucasianos. O ajuste para idade e sexo favoreceu a diferença entre as médias nos três grupos casos em relação ao grupo controle.

Em um estudo envolvendo 48 pacientes com OA sintomática de joelho (Kellgren-Lawrence (KL) graus I-III) Vilím e colaboradores observaram que somente a idade afetou os níveis de COMP. Outros potenciais fatores de confusão (gênero, índice de massa corporal, duração da OA, níveis de PCR, grau de K-L e presença de sinovite na entrada do estudo e OA em articulações menores) não tiveram um efeito significativo (Vilím et al., 2002). Se níveis séricos de COMP estão associados com o metabolismo da glicose, composição corporal, status hormonal, densidade óssea e outros fatores associados ao índice de massa corporal, ainda não está esclarecido (Jordan et al., 2003). Desse modo, entendemos que ao não realizarmos ajustes para os fatores de confusão descritos acima, não tivemos prejuízos relevantes em nossas observações.

Sharif e colaboradores, em coorte de pacientes com OA de joelho, consideraram idade, gênero e índice de massa corporal como fatores de confusão. Após ajuste, as diferenças entre os grupos permaneciam significativas, o que sugere que o aumento na concentração de COMP observada no grupo com OA tibiofemural é real e não artefactual (Sharif et al., 2006). No nosso estudo o ajuste para sexo e idade gerou resultados semelhantes aos de Sharif e colaboradores. Salientamos que estes resultados foram observados em todos os grupos por nós estudados (AR, OA e IAM).

Não dispusemos do índice de massa corporal do grupo OA no momento da coleta (por se tratar de análise em biobanco), mas entendemos que a utilização de dado obtido em prontuário seria um fator de confusão mais considerável.

## **7.5 COMP no Grupo Controle**

A média de COMP nos 100 controles normais (doadores de sangue) foi de 6,9 U/L com desvio padrão de 3,0 (IC95%: 6,3 a 7,5). O fabricante do sistema diagnóstico utilizado, COMP ELISA AnaMar™ encontrou média de COMP de 10,6 U/L em 256 doadores de

sangue suecos analisados (117 mulheres e 139 homens), com faixa etária variando dos 19 aos 73 anos. No Brasil, a idade limite superior para doação de sangue é de 65 anos.

O assessor estatístico, cegado quando ao ponto de corte proposto pelo fabricante, após categorização dos níveis de COMP nos controles saudáveis avaliou como 12 U/L o valor que melhor discriminava indivíduos controle daqueles com doenças reumáticas prevalentes. Havendo reprodução literal do valor proposto pelo fabricante a partir do qual haveria risco de dano articular (AnaMar™ COMP ELISA, 2004). O grupo-controle utilizado pelo fabricante na padronização do ensaio também era de doadores de sangue, mas de diferente origem populacional.

## **7.6 COMP em Artrite Reumatóide (AR)**

O moderno tratamento da AR está mudando em direção à terapia agressiva anti-reumática na fase inicial da doença, o que faz com que testes diagnósticos com alta especificidade sejam desejáveis (Schellekens et al., 2000). No nosso estudo a dosagem da COMP mostrou excelente especificidade no ponto de corte estabelecido de 12U/L, em concordância com a premissa de Schellekens e colaboradores.

O LR+ mostrou que é 9,5 vezes mais provável um nível de COMP > 12 U/L em um paciente com AR do que em um sem AR. O LR- indica que a chance de um resultado <12 U/L ser encontrado em um paciente com AR é de 0,55.

Nosso ponto de corte para AR mostrou forte associação entre níveis superiores a 12 U/L e AR (OR=17,3), baixa sensibilidade (47,6%), porém excelente especificidade (95%). A probabilidade pós-teste calculada (VPP) com base em prevalência de 0,46% foi baixa (4,2%). Um odds pré-teste baseado na probabilidade individual de AR pode melhorar o VPP.

A especificidade da COMP em relação a outras doenças do colágeno foi descrita por Skoumal e colaboradores, que após avaliar os níveis de COMP em pacientes com AR, artrite psoriática, artrite reativa, síndrome de Raynaud, escleroderma, lupus eritematoso sistêmico, vasculite e Síndrome de Sjögren descreveram a COMP como um marcador altamente específico para processos degradativos da cartilagem (Skoumal et al., 2004).

Comparativamente a controles saudáveis, os níveis séricos de COMP dos pacientes com AR se mostraram significativamente elevados ( $P < 0,001$ ), achado similar ao estudo de Neidhart e colaboradores. Esses autores avaliaram níveis séricos da proteína em 35 controles

(COMP  $1,7 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$ ) e em 41 indivíduos com AR (COMP  $7,2 \pm 3,7\mu\text{g/mL}$ )( $P<0,05$ ) (Neidhart et al., 1997).

Wisłowska e Jabłonska ao compararem níveis de COMP em 30 pacientes com AR (97% mulheres) e 30 com OA (86% mulheres), o nível médio de COMP na AR foi de  $10,4\pm 3,6\text{U/L}$  (achados em OA serão abordados na seção OA da discussão). O grupo AR tinha uma média de idade de 60 anos e tempo médio de doença de 14 anos (2 a 46 anos). Houve correlação de nível de COMP com idade dos pacientes com AR ( $P<0,005$ ) e escore de atividade de doença ( $P<0,01$ ). Níveis alterados de COMP constituíram variável de significância independente do estágio de doença, número de articulações afetadas, duração da rigidez matinal, duração da doença ou título no teste de Waaler Rose (Wisłowska e Jabłonska, 2005a).

No nosso estudo, a média não ajustada de COMP no grupo AR foi de  $12,6 \text{ U/L}$ , achado muito próximo ao encontrado por Skoumal e colaboradores. Nosso grupo AR é composto de 81% de mulheres; 66,6% cursaram com menos de 10 anos de doença. As características do nosso grupo AR em termos de proporção no número de mulheres, tempo de doença e níveis médios de COMP são muito semelhantes àquelas que outros grupos têm descrito (Wisłowska e Jabłonska, 2005a; Skoumal et al., 2003; Neidhart et al., 1997).

Skoumal e colaboradores descreveram correlação positiva ( $P=,007$ ;  $r=0,34$ ) entre os níveis basais de COMP e deterioração da cartilagem articular avaliadas pelo escore de Larsen em um grupo de 62 pacientes com AR acompanhados por 5 anos. Os níveis de COMP no grupo variaram de  $5,2$  a  $29,7 \text{ U/L}$ , com média de  $11,7 \text{ U/L}$ . A diferença entre os níveis séricos de COMP da 1ª. e 5ª. visita não foi significativa ( $P<0,16$ ). Ainda nesse estudo, uma baixa correlação de níveis de COMP com níveis de PCR ( $P<0,03$ ;  $r=0,27$ ) e VSG ( $P< 0,01$ ;  $r=0,32$ ) foi relatada. Após um período de observação de dois anos foi evidenciada uma diferença significativa ( $P<0,05$ ) na progressão do escore delta de Larsen em relação aos níveis séricos de COMP no momento de entrada (“baseline”) no estudo: níveis séricos baixos (grupo 1: COMP  $8,5 \pm 0,6 \text{ U/L}$ ; escore delta Larsen 2 anos:  $8,1 \pm 11,2$ ), intermediários (grupo 2: COMP  $10,6 \pm 0,8 \text{ U/L}$ ; escore delta Larsen 2 anos:  $10,3 \pm 9,8$ ) e altos (grupo 3: COMP  $15,0 \pm 1,5 \text{ U/L}$ ; escore delta Larsen 2 anos:  $17,1 \pm 10,6$ ) (Skoumal et al., 2003). No nosso estudo os 63 pacientes com AR apresentaram nível sérico médio de COMP de  $12,6 \pm 5,7 \text{ U/L}$  com uma variação de  $4,6$  a  $35,5 \text{ U/L}$ . O dado foi significativo em relação a controles sadios ( $P<0,001$ ). Quarenta e sete por cento (47,6%) dos pacientes com AR apresentavam níveis de COMP  $> 12 \text{ U/L}$ . O LR+  $9,5$  foi indicativo de moderada probabilidade de desfecho

AR para níveis de COMP acima de 12U/L. Níveis de COMP acima de 12 U/L se associaram fortemente à presença de AR, como indica o OR de 17,3.

Skoumal e colaboradores, em um grupo de 12 pacientes com AR (idade média de 57anos) e 5 com artrite reativa (idade média de 42 anos), avaliaram a influência de tratamento intravenoso com esteróides nos níveis de COMP. O tratamento intravenoso com esteróides em pacientes com AR levou a uma significativa diminuição nos níveis de COMP. A COMP parece ser um marcador útil para monitoramento de resposta terapêutica em pacientes com AR (Skoumal et.al., 2006).

Ao avaliar alterações no *turnover* da cartilagem após tratamento intra-articular com glicocorticóides em pacientes com AR, (indivíduos que permaneciam em repouso após injeção do medicamento comparados aos que não permaneciam em repouso), Weitoft e colaboradores reportaram níveis basais de COMP de  $13,5\pm 3,9$ U/L e  $12,7\pm 4,5$ U/L respectivamente. Após tratamento, o nível de COMP diminuiu significativamente ( $P<0,01$ ) em ambos os grupos. A redução persistiu por duas semanas, sendo mais pronunciada no grupo com repouso. O tratamento que reduza somente a inflamação sem influenciar a patologia da cartilagem não influencia o nível de COMP (Weitoft et.al., 2005).

Estudos recentes indicam que a terapia biológica anti-TNF com adalimumab tem efeito positivo no desfecho radiológico da AR. Esta intervenção tem também efeitos rápidos nos marcadores biológicos da cartilagem, de *turnover* sinovial e de ativação endotelial de fase aguda, mas não nos níveis de COMP. O achado fortalece a importância da COMP como um marcador seletivo da cartilagem. Apesar do tratamento sustentado anti-TNF- $\alpha$ , somente níveis basais de COMP e, em menor extensão de sICAM-1, foram prognósticos do curso radiológico (den Broeder et.al., 2002).

Em nosso estudo, não avaliamos marcadores de fase aguda nos pacientes com AR, ou a progressão radiológica destes pacientes. Não foi objetivo do nosso estudo verificar o efeito farmacoterapêutico nos níveis de COMP. Os pacientes com AR estudados permaneceram com o esquema terapêutico habitual durante o período de coleta.

## **7.7 COMP em Osteoartrite (OA)**

Há um foco na pesquisa e desenvolvimento de indicadores mais sensíveis de OA para utilizar “junto com” ou “em substituição a” tradicional ferramenta radiográfica. Estudos

preliminares sugerem que tanto os novos biomarcadores quanto a análise de imagem por ressonância magnética são sensíveis para alterações iniciais na OA. Os biomarcadores são definidos com o objetivo de indicar um processo biológico normal, patológico ou a resposta à intervenção terapêutica (Bauer et.al., 2006).

O ponto de corte que melhor diferenciou os indivíduos dos grupos de casos dos controles saudáveis (12 U/L) conferiu baixa sensibilidade à COMP no diagnóstico de OA (37,5%), porém uma excelente especificidade (95%). A probabilidade pós-teste (VPP) com base em uma prevalência de 4,14% foi de 24,5%. Houve uma forte associação entre níveis de COMP superiores a 12U/L e OA (OR=11,4). No nosso estudo, o ponto de corte escolhido não modifica substancialmente a probabilidade pré-teste para pós-teste, no entanto, exibiu excelente capacidade de exclusão de indivíduos não doentes.

A sensibilidade e a especificidade, embora medidas independentes da prevalência da doença, não são úteis para determinar a probabilidade com que um teste negativo ou positivo indicaria indivíduos com ou sem OA. O LR+ indica quantas vezes é mais provável um teste positivo ( $\geq 12$ U/L) indicar a doença em questão. No nosso estudo o LR+ de 7,5 mostrou que o teste possui moderada variação da possibilidade pré-teste de OA para pós-teste.

Como *odds* pré-teste utilizamos um dado de prevalência citado na literatura. Levando em consideração a probabilidade pré-teste individual (“*subject probability*”), observamos que o ponto de corte sugerido no nosso estudo pode ser ferramenta útil na caracterização de quadro de OA.

No nosso estudo, os níveis séricos de COMP no grupo OA mostraram-se significativamente elevados em relação ao grupo controle saudável ( $P < 0,001$ ). A média etária desses pacientes também foi significativamente maior que os indivíduos saudáveis ( $P < 0,01$ ). A média de COMP nos homens foi superior a das mulheres, porém sem significância estatística ( $P = 0,14$ ), o que pode ser decorrente da diferença no número de homens em relação ao número de mulheres com OA alocados no estudo. Desse modo, não foi possível realizar uma análise estratificada por sexo. Após ajuste para idade e sexo, a diferença em relação ao grupo controle manteve a significância ( $P < 0,01$ ), com o ajuste favorecendo a diferença entre as médias.

Sharif e colaboradores, em coorte de pacientes com OA de joelhos, relataram nível basal de COMP ajustado para idade, sexo e índice de massa corporal de 12,99 U/L (12,4 a 13,6) em pacientes com OA tibiofemural e 10,78 (10,1 a 11,4) com OA patelofemural ( $P = 0,001$ ) (Sharif et.al., 2006). Em nosso estudo os níveis de COMP ajustados para idade e sexo foram de  $13,1 \pm 1,1$  U/L.

Como relatado em outros estudos, o soro de pacientes com OA ou AR ou outras formas de artrite inflamatória mostram COMP sérica elevada comparada aos controles (Saxne et.al., 1993; Sharif et.al., 1995; Forslind et.al., 1992). Clark e colaboradores também encontraram níveis séricos de COMP significativamente mais altos no grupo com OA em relação ao grupo controle ( $P=0,0093$ ), e também não observaram diferença significativa nos níveis séricos de COMP por gênero (Clark et.al., 1999).

Dragomir e colaboradores avaliaram níveis séricos de COMP em pacientes com sinais e sintomas de OA e em pacientes sem evidência radiográfica de OA de joelho ou quadril. Verificaram que o LnCOMP se correlacionou positivamente com a idade ( $r=0,35; P<0,01$ ) mas não com o índice de massa corporal ( $r=0,03; P=0,691$ ) ou gênero ( $P=0,326$ ). Os dados assim permaneceram após análise multivariada, de onde se depreende que a COMP pode ser um marcador útil de patologia pré-radiográfica, em particular de quadril (Dragomir et.al., 2002).

Garnero e colaboradores, analisando uma série de marcadores bioquímicos do *turnover* da cartilagem em pacientes com OA, confirmaram níveis de COMP maiores que em controles pareados por idade ( $P<0,0001$ ) (Garnero et.al., 2001).

Kumm e colaboradores observaram significativa diferença ( $P=0,0001$ ) nos níveis de COMP de 59 homens e 99 mulheres com OA (12,0 U/L e 9,8U/L respectivamente) avaliados. Segundo os autores, a variável gênero deveria ser mais valorizada quando se estuda níveis séricos de COMP (Kumm et.al., 2006).

Meulenbelt I e colaboradores reportaram incidência familiar considerável de níveis altos de COMP e N-telopeptídeo do colágeno tipo IIA, sugerindo que esses marcadores possam estar sob influência genética na OA (Meulenbelt et al., 2006).

Um estudo realizado em 160 gêmeos homozigóticos e 349 dizigóticos concluiu que fatores hereditários influenciam os níveis séricos de COMP. No entanto, os fatores genéticos parecem operar em um estágio inicial nas vias etiológicas que influenciam o desenvolvimento de OA radiologicamente detectável (Williams et al., 2006)

Mazières e colaboradores procuraram identificar quais marcadores poderiam ser preditores de progressão da doença artrósica. Os autores avaliaram 333 pacientes com deterioração funcional intensa (espaço articular  $< 2\text{mm}$ ). Nesse grupo, o nível basal médio de COMP foi de  $10,7\pm 2,7$  U/L. O risco relativo do biomarcador em influenciar a progressão da doença (análise univariada após ajuste para idade, sexo, índice de massa corporal e tratamento) foi baixo (0,826, IC95% 0,613-1,112) para COMP  $> 11,4$  U/L. O telopeptídeo de ligação cruzada carboxiterminal do colágeno tipo II urinário (uCTXII) e o ácido hialurônico

sérico se mostraram melhores preditores de progressão estrutural de OA de quadril (Mazières et al., 2005).

Wisłowska e Jabłonska, em estudo que comparava COMP de 30 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e 30 com OA de joelho encontraram níveis médios de  $11,3 \pm 3,7$  e  $10,4 \pm 2,7$  U/L respectivamente ( $P > 0,05$ ). Não observaram correlação entre níveis de COMP e idade, duração da doença e valores de outros testes laboratoriais (como velocidade de eritrossedimentação, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos, plaquetas, fosfatase alcalina, proteína, cálcio e fósforo) (Wisłowska e Jabłonska, 2005b). O grupo OA estudado por Wisłowska e Jabłonska é composto por 86% de mulheres com média de idade de 67 anos e com tempo médio de doença de 9 anos. Nosso grupo OA, semelhantemente, é composto por 88% de mulheres com idade média de 65 anos e 70% dos pacientes com tempo de doença disponível tinham menos de 10 anos de evolução.

No nosso estudo, o ajuste para idade e sexo favoreceu ainda mais a diferença observada, com um grupo OA mais velho e constituído por um maior número de mulheres. A dosagem de COMP mostra ter uma boa reprodutibilidade, com vários grupos em diferentes locais do mundo observando níveis de COMP bastante semelhantes.

A influência da idade nos níveis de COMP em pacientes com OA certamente merece avaliação em séries maiores.

## **7.8 COMP em Infarto Agudo do Miocárdio (IAM)**

O ponto de corte para COMP que melhor diferenciou indivíduos com IAM de controles saudáveis foi 4 U/L em nosso estudo. Houve forte associação ( $OR=9,1$ ) entre níveis de COMP inferiores a 4 U/L e IAM. O ponto de corte adotado mostrou sensibilidade razoável (66,7%), especificidade moderada (82%) e probabilidade pós-teste baixa (39,5%), considerando prevalência de 15%. Confirmamos nossa hipótese conceitual. Os níveis séricos da COMP são alterados em pacientes com IAM comparativamente a controles sadios, porém significativamente inferiores.

O LR+ de 3,7 mostra que o nível de COMP  $< 4/L$  pode ocasionalmente ser importante na avaliação diagnóstica. A chance de observarmos um resultado  $< 4 U/L$  é 3,7 vezes maior em um infartado do que em um não-infartado, considerando-se que os infartados com doença reumática foram excluídos do estudo. A probabilidade de doença frente a um teste negativo

(1-VPN) no ponto de corte escolhido para IAM é de apenas 7% (considerando prevalência de 15%).

De interesse, Mündermann e colaboradores observaram uma alteração fisiológica média da COMP de 9,7% devido a exercício (Mündermann et.al., 2005). Levando-se em consideração o fato de pacientes infartados estarem em repouso, os níveis de COMP continuariam significativamente diminuídos em relação aos controles saudáveis, o que demonstra que o achado não se deve ao repouso e sim a um papel fisiológico que a COMP esteja executando nesses pacientes.

O ajuste para sexo e idade não só manteve a significância ( $P < 0,01$ ) como a favoreceu, aumentando a diferença entre as médias. Muitas das macromoléculas da cartilagem não são restritas a esse tecido e estão presentes em outros locais onde exercem funções similares (Svensson et.al., 2001). Não postulamos que a COMP represente ferramenta diagnóstica para IAM. No entanto, o achado merece considerações referentes ao possível papel que esse membro da família das trombospondinas possa estar desempenhando no evento IAM. A função normal da COMP/TSP-5 no tecido conjuntivo permanece controversa (Chen et.al., 2005).

O reparo cardíaco após o IAM é iniciado pela indução de inflamação aguda (Willems et.al., 1994). Após o infarto e o extravasamento de proteínas plasmáticas há a formação de uma matriz fibrilar provisória que suporta a migração e a infiltração de células inflamatórias (Dobaczewski et.al., 2006).

Após, há a lise da matriz provisória por enzimas proteolíticas, passo crucial na cicatrização do infarto, seguida de rápida reposição de matriz derivada de células, contendo fibronectina e ácido aradônico depositadas por fibroblastos. Em ratos não reperfundidos esse processo ocorre em 4 a 7 dias após o infarto. A fibronectina controla e organiza a composição da matriz extracelular pela regulação da deposição do colágeno tipo I e trombospondinas (Dobaczewski et.al., 2006; Sottile e Hocking, 2002) Uma das propriedades da COMP é interagir com a fibronectina. O acúmulo de colágeno é suporte mecânico do miocárdio injuriado. (Dobaczewski et.al., 2006)

A marginação de leucócitos contribui para a remoção do tecido necrótico através da liberação de enzimas proteolíticas e produção de mediadores fibrogênicos e angiogênicos, importantes para a formação do tecido cicatricial, o que gera a fase proliferativa da reparação pós-infarto (Willems et.al., 1994; Frangosiannis et.al., 2000; Frangosiannis et.al., 2005).

Nesse estágio do processo de reparo, a angiogênese é um evento proeminente, e é acompanhada pela proliferação de fibroblastos fenotipicamente modulados capazes de

produzir grandes quantidades de proteínas de matriz extracelular (Willems et.al., 1994; Frangosiannis et.al., 2000; Frangosiannis et.al., 2005).

Nessa fase, o conteúdo celular do infarto diminui, as estruturas vasculares regridem e as fibras de colágeno se ligam cruzadamente, levando à formação de uma cicatriz composta de densos feixes de colágeno (principalmente I e III) (Frangosiannis et.al., 2005). Rosenberg e colaboradores demonstraram que a COMP é uma proteína que atua na formação das fibrilas de colágeno tipo I e II. Assim, uma das funções da COMP é influenciar na organização das fibrilas colágenas, contribuindo para a estruturação e função tecidual (Rosenberg et.al., 1998).

O colágeno tipo I é o colágeno mais abundante. É encontrado na pele, ossos, tendões e muitos outros tecidos (Svensson et.al., 2001). Aproximadamente 85% do colágeno miocárdico é tipo I (Jugdutt, 2003a). Assim sendo, postulamos que os níveis baixos (inferiores aos fisiológicos) da COMP em IAM observados no nosso estudo possam indicar a participação ativa da proteína na cicatrização da área infartada.

Um aumento na formação de ligações cruzadas na rede de colágeno (uma das propriedades da COMP) contribui para a distensão tensional do tecido cardíaco (Michel et.al., 2003).

O estudo de Rissen e colaboradores sugeriu que a COMP pode facilitar a migração das células musculares lisas tanto na média normal quanto na parede aterosclerótica primária, e que suas propriedades diferem em distribuição e função comparativamente à TSP-1 (Riessen et.al., 2001).

Frangogiannis e colaboradores sugerem que a zona de bordo do infarto pode ser capaz de modular o processo de cicatrização através de seu conteúdo único de matriz extracelular. A expressão seletiva de TSP-1 na zona de bordo do infarto pode servir como barreira, limitando a expansão de tecido de granulação e protegendo o miocárdio não-infartado da remodelagem fibrótica. A TSP-1 pode localmente suprimir a síntese de citocinas inflamatórias e quimiocinas através de seus efeitos de ativação do TGF- $\beta$  (Frangogiannis et.al., 2005).

O papel da TSP-1 no reparo pós-IAM está bem descrito. Ela não tem um papel crucial na homeostase cardíaca, contudo, após o infarto, a sua ausência na zona de bordo do infarto pode fazer com que o processo inflamatório se expanda à zona não-infartada, gerando fibrose e remodelamento contínuo do miocárdio. Os efeitos da TSP-1 na limitação da inflamação e processo fibrótico pode ser devido à ativação do TGF- $\beta$  e seus efeitos angiostáticos. A ativação do TGF- $\beta$  é mediada por uma sequência presente na repetição tipo 1 da TSP-1 (ausente na COMP/TSP-5). (Frangogiannis et.al., 2005)

O TGF tem um importante papel na produção de colágeno (Nakajima H 2000). É o mediador chave na regulação de muitos eventos associados à cicatrização do IAM (Bujak e Frangogiannis, 2006). Suprime a síntese de quimiocinas por células endoteliais e leucócitos enquanto promove deposição da matriz extracelular (Frangogiannis 2006). Animais com deleção de TGF têm a deposição do colágeno reduzida de forma idade dependente (Nakajima et.al., 2000). O TGF- $\beta$  tem um importante papel na regulação do remodelamento cardíaco hipertrófica, associada à deposição aumentada de matriz extracelular e proliferação de fibroblastos (Bujak e Frangogiannis, 2006). Como Riessen demonstrou no seu estudo, a expressão do mRNA da COMP/TSP-5 é muito estimulada por TGF- $\beta$ 1 e 3.

O conhecimento do papel das trombospondinas e das proteínas de matriz extracelular nos mecanismos de dano e reparo tecidual, como ocorre na lesão aterosclerótica e no infarto, ainda oferece campo a muitos estudos. A análise da árvore filogenética do gene da família das TSPs mostra que os genes são altamente conservados, o que sugere uma função exclusiva ou importante. É possível que suas regiões variáveis sejam adequadas à interação com tipos celulares específicos, e que as regiões conservadas sirvam a uma função comum a todos os tipos celulares (Di Cesare et.al., 2002).

No coração normal adulto a TSP-1 não é normalmente expressa, contudo, sua expressão é regulada positivamente em modelos experimentais de infarto (Frangogiannis, 2006)

Parece que a COMP desempenha um papel relevante no processo de cicatrização da área infartada. Em humanos, no estágio final da falência cardíaca por cardiomiopatia isquêmica, o colágeno, as proteínas do citoesqueleto e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) estão aumentados, mas as ligações cruzadas no colágeno (uma das funções da COMP) estão diminuídas, o que favorece a dilatação do ventrículo esquerdo (Weber, 1997).

Várias moléculas endógenas que afetam a síntese de colágeno estão positivamente reguladas após o infarto, e vários agentes que normalmente são usados terapeuticamente no IAM afetam a síntese de colágeno. Estes agentes exercem efeito antifibrótico que potencialmente pode alterar o remodelamento da ECM no infarto (Jugdutt, 2003a), onde a COMP pode estar envolvida. Não foi objetivo de nosso estudo avaliar o efeito desses fármacos na síntese da COMP nos indivíduos infartados.

Metade dos pacientes admitidos em um hospital devido a IAM e 80% dos que vão a óbito têm mais de 65 anos. A idade está associada à uma reduzida deposição de componentes inespecíficos da matriz extracelular, a uma regulação positiva da angiogênese e a uma

resposta alterada aos ferimentos. A idade também se associa a uma diminuição da disponibilidade do NO vascular, a um aumento na elastase e da degeneração da matriz. Assim, numerosos determinantes potenciais da cicatrização do infarto estão associados à idade, mas seu papel não foi detalhadamente estudado. Fatores como gênero, infarto prévio e localização do infarto podem ter contribuído paralelamente aos efeitos idade-dependentes (Ertl e Frantz, 2005).

A média de idade dos pacientes infartados em nosso estudo não diferiu significativamente entre homens e mulheres, e somente 15% dos pacientes haviam tido infarto prévio.

No IAM a necrose é clinicamente evidente em termos de sintomas, sinais eletrocardiográficos e elevação nos biomarcadores de dano celular, reconhecida como uma forma de morte celular durante as primeiras 24 – 48 horas. A apoptose é geralmente silenciosa e frequentemente não-reconhecida. No entanto, estudos experimentais têm mostrado que a apoptose é a principal forma de morte celular durante o IAM. Está presente no miocárdio sobrevivente por semanas a anos após o evento. A apoptose é 30 vezes mais comum que a necrose; é também demonstrável 7 dias após um evento cirúrgico, o que não ocorre com a necrose (Abbate et.al., 2006).

Três a 7 dias após o IAM ocorrem as principais mudanças na geometria tecidual. O remodelamento cardíaco, no entanto, não se limita aos primeiros 7 dias (Abbate et.al., 2006). No nosso estudo, os pacientes selecionados tinham até 7 dias de evolução pós infarto, fase crítica na alteração geométrica do ventrículo e remodelamento. Potencialmente, este seria o período onde a necessidade de estruturação de fibrilas colágenas e controle do processo inflamatório pode estar envolvendo as trombospondinas.

Um infarto ainda recente, em fase de cicatrização, é um substrato mais favorável para reparo baseado em terapia celular do que uma cicatriz já estabelecida em um ventrículo dilatado (Murry et.al., 2006). Os eventos celulares e moleculares associados à cicatrização do infarto influenciam diretamente o remodelamento ventricular e o prognóstico do paciente infartado (Bujak e Frangogiannis, 2006). Muitos pacientes com infarto evoluem bem com o tratamento tradicional e não necessitam de intervenções avançadas (Murry et.al., 2006).

Nosso estudo é embrionário em termos da relação entre níveis séricos de COMP e IAM. A depleção de níveis de COMP nesse grupo de pacientes é intrigante. Se a alteração fisiológica nos níveis de COMP possa estar associada à fase de cicatrização do IAM, seria interessante em próximos estudos avaliar a cinética da proteína ao longo do período pós-

infarto juntamente com outros potenciais marcadores de remodelamento e cicatrização pós-IAM.

Por fim, é pertinente que consideremos as limitações de nosso estudo. Em termos práticos, nosso delineamento de caso-controles não contemplou análises multivariadas, e sim fundamentalmente uni ou bi-variadas.

A literatura mostra que AR, OA e IAM afetam principalmente indivíduos em faixa etária superior à média dos doadores de sangue no nosso meio. O fato justifica termos selecionado doadores de sangue com idade superior a 40 anos. O pareamento ideal de sexo e idade não foi obtido nos grupos controle e casos, embora o ajuste estatístico para estas variáveis tenha sido procedido.

Outro fator limitante de nosso trabalho diz respeito ao não-estudo das variáveis de confusão para IAM no grupo-controle, o que teria contribuído mais detalhadamente para a análise do binômio níveis de COMP-IAM.

A seleção de doadores de sangue em delineamentos de caso-controles é certamente problemática. Embora não tenhamos estudado cada variável de confusão para IAM no grupo-controle, o cuidado na anamnese para exclusão de doença cardíaca prévia pode ter atenuado em parte esta dificuldade. Os cuidados de anamnese para exclusão de doenças reumáticas no grupo-controle foram também similares. Cuidados de anamnese com doadores de banco de sangue não foram unanimemente descritos em estudos com COMP que utilizaram delineamentos semelhantes. Tais cuidados com o grupo-controle nos permitiram avaliar o ponto de corte na nossa população nos mesmos moldes realizados pelo grupo sueco quando da padronização do ensaio.

Outro fator a ser considerado diz respeito à utilização de biobancos no grupo IAM. Globalmente, as amostras foram coletadas entre o primeiro e sétimo dia do evento, mas não foi possível obter data e hora de coleta para cada indivíduo deste grupo, o que seria o ideal. No entanto, nossa avaliação abrangeu as fases inflamatória e proliferativa do IAM, situações em que há a produção e estruturação da matriz extracelular. A avaliação dos níveis da COMP/TSP-5 na fase de maturação do IAM deverá ser procedida em estudos vindouros.

A função renal e o fator diluição não foi aferida no grupo IAM, outra limitação do nosso estudo.

Não foi nosso objetivo a comparação dos níveis de COMP com dados radiológicos e proteínas de fase aguda em pacientes com AR e OA. A averiguação da COMP como parâmetro de fase aguda nestas populações deverá ser motivo de outros estudos em nosso grupo.

## 8 CONCLUSÕES

1. Níveis de COMP superiores a 12 U/L se associaram fortemente à presença de AR e OA, e conferiram alta especificidade;

2. Níveis de COMP inferiores a 4 U/L se associaram definitivamente à ocorrência de IAM, e exibiram moderada especificidade;

3. Níveis de COMP superiores a 12 U/L cursaram com moderada probabilidade dos desfechos AR e OA;

4. Como um todo, níveis de COMP utilizando-se os referidos pontos de corte discriminaram pacientes com AR, OA e IAM de controles sadios.

## 9 PERSPECTIVAS

A pesquisa dos contatos célula-matriz é uma área nova e estimulante. A compreensão da constituição molecular e regulação de todas as formas de contato com a matriz provavelmente revelará novas possibilidades de aplicação biomédica. A adesão celular é necessária para a sobrevivência de células normais, e, assim, intervenções estratégicas que alterem a locomoção celular ou a orientação, sem bloquear totalmente o ataque célula-matriz, poderão ser úteis na promoção do processo cicatricial. Além disso, a adesão celular é relevante na reestruturação tecidual da cartilagem, na regeneração de nervos ou no manejo de doenças crônicas como aterosclerose, AR ou hepatopatias.

De interesse, nosso grupo investigou os níveis séricos de COMP em dez pacientes com hepatite C com graus de fibrose de 2 a 4, com idade entre 30 e 65 anos e sem doença reumatológica. Três desses pacientes apresentaram níveis superiores a 12 U/L (a saber, 14,8, 16,1 e 30,0 U/L) (dados a serem publicados). Também de interesse, investigamos os níveis de COMP em 14 pacientes com tumor cerebral primário e metastático (idade de 17 a 62 anos), sem doença reumatológica. Nesse grupo, um paciente com glioblastoma multiforme (COMP = 15,5 U/L) e outro com astrocitoma de baixo grau (COMP = 27,0 U/L) apresentaram COMP > 12U/L (dados não publicados). A quantificação de níveis de COMP em pacientes com tumores parte da premissa de que a superexpressão da TSP-1 se associa a reduções do crescimento tumoral e ao índice de vascularização de alguns neoplasmas. Os dados acima em hepatopatias e tumores ratificam a idéia sobre o amplo e intrigante comportamento biológico da COMP.

Sabe-se que a estruturação excessiva da ECM, vista, por exemplo, na cardiomiopatia dilatada pós-IAM, pode contribuir para a disfunção diastólica e desfecho desfavorável desta afecção. Nesta circunstância, drogas antifibróticas poderiam vir a serem úteis terapêuticamente. Há evidente alteração na biodisponibilidade da proteína nos pacientes infartados. Novos estudos poderão definir o papel da dosagem sérica da COMP como instrumento de avaliação da estrutura cicatricial pós-IAM.

Apesar de vários estudos demonstrarem um papel relevante da COMP na biologia da cartilagem e de outros tecidos, ainda não há consenso quanto à utilidade da quantificação sérica desta proteína na prática clínica. O conhecimento do papel biológico da COMP no tecido vascular é ainda incipiente, assim como sua função no processo cicatricial *senso lato*. Estudos futuros envolvendo pacientes com doenças reumáticas, aterosclerose,

hepatopatias e neoplasias poderão trazer novas luzes no conhecimento da função biológica da COMP.

## 10 REFERÊNCIAS

- Abbate A, Bussani R, Amin MS, Vetovec GW, Baldi A. Acute myocardial infarction and heart failure: role of apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:1834-40.
- Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:961-8.
- Adams JC. Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *J Cell Sci.* 1995;108:1977-90.
- Adams JC. Functions of the conserved carboxy-terminal cassette in cell-extracellular matrix interactions and signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1102-14.
- Adams JC. Molecular organization of cell-matrix contacts: essential multiprotein assemblies in cell and tissue function. *Expert Rev Mol Med.* 2002;2002:1-24.
- Adams JC. Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:25-51.
- Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2005;4:130-6.
- Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 1991;50:8-13.
- Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum.* 1990;33:1601-10.
- AnaMar Medical™ [homepage na Internet]. Göteborg: 2006. COMP ELISA® 14-1006-71. Directions for use. Enzyme Immunoassay. [atualizado 2004 Oct.]:[p.3-12] 2040/06 Disponível em: <http://www.anamar.com/Biomarkers/CartilageMarkers/COMPELISA/AnaMarBrux.pdf>
- Andersson ML, Petersson IF, Karlsson KE, Jonsson EN, Mansson B, Heinegard D, et al. Diurnal variation in serum levels of cartilage oligomeric matrix protein in patients with knee osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:1490-4.
- Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodeling. *Nature.* 2002;415:240-3.
- Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20:3-25.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:315-24.

Bas S, Perneger TV, Seitz M, Tiercy JM, Roux-Lombard P, Guerne PA. Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41:809-14.

Bauer DC, Hunter DJ, Abramson SB, Attur M, Corr M, Felson D, et al. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14:723-7.

Bjarnason R, Andersson B, Kim HS, Olsson B, Swolin-Eide D, Wickelgren R, et al. Cartilage oligomeric matrix protein increases in serum after the start of growth hormone treatment in prepubertal children. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2004;89:5156-60.

Brandt KD, Fife RS. Ageing in relation to the pathogenesis of osteoarthritis. *Clin Rheum Dis.* 1986;12:117-30.

Briggs MD, Chapman KL. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations. *Hum Mutat.* 2002;19:465-78.

Briggs MD, Hoffman SM, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, et al. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat Genet.* 1995;10:330-6.

Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF- $\beta$  signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* No prelo 2006. doi:101016/j.cardiores.2006.10.002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?ob=ArticleURL&udi=B6T14-4M2GGWX-1&coverDate=10%2F07%2F2006&alid=509905389&rdoc=1&fmt=&orig=search&qd=1&cdi=4880&sort=d&view=c&acct=C000037098&version=1&urlVersion=0&userid=685977&md5=251efc9d1e22606133befe61e10416c7>

Chen FH, Thomas AO, Hecht JT, Goldring MB, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin-5 supports chondrocyte attachment through interaction with integrins. *J Biol Chem.* 2005;280:32655-61.

Chen H, Deere M, Hecht JT, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein is a calcium binding protein and a mutation in its type 3 repeats causes conformational changes. *J Biol Chem.* 2000;34:26538-44.

Cicutini FM, Speeter TD. Osteoarthritis in the aged. *Epidemiological issues and optimal management. Drugs Aging.* 1995;6:409-20.

Clark AG, Jordan JM, Vilim V, Renner JB, Dragomir AD, Luta G, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2356-64.

Cleutjens JP, Huynen F, Smits JFM, Bornstein P, Daemen MJAP. Thrombospondin-2 deficiency in mice results in cardiac rupture early after myocardial infarction. *Circ Res.* 1999;100:156[Suppl].

Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:1281-92.

Conaghan PG, O'Connor P, McGonagle D, Astin P, Wakefield RJ, Gibbon WW, et al. Elucidation of the relationship between synovitis and bone damage: a randomized magnetic resonance imaging study of individual joints in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:64-71.

Conrozier T, Saxne T, Fan CS, Mathieu P, Tron AM, Heinegard D, et al. Serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein in hip osteoarthritis: a one year prospective study. *Ann Rheum Dis.* 1998;57:527-32.

Crnkic M, Mansson B, Larsson L, Geborek P, Heinegard D, Saxne T. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) decreases in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab or etanercept. *Arthritis Res Ther.* 2003;5:R181-5.

Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ.* 2004;329:168-9.

Deere M, Sanford T, Francomano CA, Daniels K, Hecht JT. Identification of nine novel mutations in cartilage oligomeric matrix protein in patients with pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Am J Med Genet.* 1999;85:486-90.

den Broeder AA, Joosten LA, Saxne T, Heinegard D, Fenner H, Miltenburg AM, et al. Long term anti-tumour necrosis factor alpha monotherapy in rheumatoid arthritis: effect on radiological course and prognostic value of markers of cartilage turnover and endothelial activation. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:311-8.

Deten A, Holzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:1191-207.

Di Cesare P, Fang C, Leslie MP, Tulli H, Perris R, Carlson CS. Expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by embryonic and adult osteoblasts. *J Orthop Res.* 2000;18:712-20.

Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, Chen FS, Leslie M, Perris R. Expression of cartilage oligomeric matrix protein by human synovium. *FEBS Lett.* 1997;412:249-52.

Di Cesare PE, Chen FS, Moergelin M, Carlson CS, Leslie MP, Perris R, et al. Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biol.* 2002;21:461-70.

Di Cesare PE, Fang C, Leslie MP, Della Valle CJ, Gold JM, Tulli H, et al. Localization and expression of cartilage oligomeric matrix protein by human rheumatoid and osteoarthritic synovium a cartilage. *J Orthop Res.* 1999;17:437-45.

DiCesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett.* 1994;354:237-40.

Dickinson SC, Vankemmelbeke MR, Buttle DJ, Rosenberg K, Heinegård D, Hollander AP. Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. *Matrix Biol.* 2003;22:267-78.

Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, Ren G, Entman ML, Frangogiannis NG. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res.* 2006;324:475-88.

Dodge GR, Hawkins D, Boesler E, Sakai L, Jimenez SA. Production of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by cultured human dermal and synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998;6:435-40.

Downey JM, Cohen M. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis.* 2006;48:363-71.

Dragomir AD, Kraus VB, Renner JB, Luta G, Clark A, Vilim V, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein and clinical signs and symptoms of potential pre-radiographic hip and knee pathology. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10:667-91.

Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Kalden JR, Antoni C, Smolen JS, et al. Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1994;344:1105-10.

Engel J. Role of oligomerization domains in thrombospondins and other extracellular matrix proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:997-1004.

Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2005;66:22-32.

Fang C, Carlsson CS, Leslie MP, Tulli H, Stolerman E, Perris R, et al. Molecular cloning, sequencing, and tissue and developmental expression of mouse cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *J Orthop Res.* 2000;18:593-603.

Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference. Writing Group III: pathophysiology. *Circulation.* 2004;109:2617-25.

Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001;108:785-91.

Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman BN, Aliabadi P, et al. The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum.* 1995;38:1500-5.

Fex E, Eberhardt K, Saxne T. Tissue-derived macromolecules and markers of inflammation in serum in early rheumatoid arthritis: relationship to development of joint destruction in hands and feet. *Br J Rheumatol*. 1997;36:1161-5.

Fex E, Jonsson K, Johnson U, Eberhardt K. Development of radiographic damage during the first 5-6 yr of rheumatoid arthritis. A prospective follow-up study of a Swedish cohort. *Br J Rheumatol*. 1996;35:1106-15.

Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein: a prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*. 1992;31:593-8.

Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol*. 2000;165:2798-808.

Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A, et al. Critical role of endogenous Thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation*. 2005;111:2935-42.

Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1907-39.

Gallagher EJ. Clinical utility of likelihood ratios. *Ann Emerg Med*. 1998;31:391-7.

Garnero P, Piperno M, Gineyts E, Christgau S, Delmas PD, Vignon E. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:619-26.

Genevay S, Haydem G, Verpillat P, Meyer O. An eight year prospective study of outcome prediction by antiperinuclear factor and antikeratin antibodies at onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:734-6.

Global Registry of Acute Coronary Events. GRACE registry [base de dados na Internet]. Boston: University of Massachusetts School of medicine. c1998 [atualizada em 2006 July; acesso em 2006 out 22]. Disponível em: <http://www.outcomes-umassmed.org/grace/>

Grimes DA, Schulz KF. Refining clinical diagnosis with likelihood ratios. *Lancet*. 2005;365:1500-5.

Guo Y, Bozic D, Malashkevich VN, Kammerer R A, Schulthess T. All-*trans* retinol, vitamin D and other hydrophobic compounds bind in the axial pore of the five-stranded coiled-coil domain of cartilage oligomeric matrix protein. *EMBO J*. 1998;17:5265-72.

Halkin A, Reichman J, Schwaber M, Paltiel O, Brezis M. Likelihood ratios: getting diagnostic testing into perspective. *Q J Med*. 1998;91:247-58.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.

Hecht JT, Hayes E, Haynes R, Cole WG. COMP mutations, chondrocyte function and cartilage matrix. *Matrix Biol.* 2005;23:525-33.

Hedbom E, Antonsson, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, et al. Cartilage Matrix Proteins: an acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem.* 1992;267:6132-6.

Hedbom E, Häuselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:45-53.

Holmes JW, Borg TK, Covell JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng.* 2005;7:233-53.

Hopkins WG. A scale of magnitudes for effect statistics. In: A new view of statistics [monografia na Internet]. Oslo: Internet Society for Sport Science; 2000. [atualizado 2006 Aug 7; citado 2006 ago 16]. Disponível em: <http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>

Howell DS. Pathogenesis of osteoarthritis. *Am J Med.* 1986;80(4B):24-8.

Hunter DJ, Conaghan PG. Imaging outcomes and their role indetermining outcomes in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18:157-62.

Jantti JK, Kaarela K, Luukkainen RK, Kautiainen HJ. Prediction of 20-year outcome at onset of seropositive rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2000;18:387-90.

Jordan JM, Luta G, Stabler T, Renner JB, Dragomir AD, Vilim V, et al. Ethnic and sex differences in serum levels of cartilage oligomeric matrix protein: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum.* 2003;48:675-81.

Jugdutt BI. Matrix metalloproteinases as markers of adverse remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2006;12:73-6.

Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation.* 2003a;108:1395-403.

Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2003b;3:1-30.

Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett.* 2006;106:8-13.

Kersting UG, Stubendorff JJ, Schmidt MC, Bruggemann GP. Changes in knee cartilage volume and serum COMP concentration after running exercise. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:925-34.

Kleerekoper Q, Hechti J, Putkey JA. Disease-causing mutations in cartilage oligomeric matrix protein cause an unstructured Ca<sup>2+</sup> binding domain. *J Biol Chem.* 2002;277:10581-9.

Kong SY, Stabler TV, Criscione LG, Elliott AL, Jordan JM, Kraus VB. Diurnal variation of serum and urine biomarkers in patients with radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2496-504.

Kulich W, Niksic F, Studnicka-Benke A, Klein G. Measurements of the cartilage breakdown marker COMP during nimesulide therapy os osteoarthritis. *Arzt + Praxis.* 2003;57:234-240.

Kulich WC, Mur E, Aglas F, Niksic F, Czerwenka C. Inhibitory effects of leflunomide therapy on the activity of matrixmetalloproteinase-9 and the release of cartilage oligomeric matrix protein in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:155-60.

Kumm, J, Tamm A, Veske K, Lintrop M, Tamm A. Associations between cartilage oligomeric matrix protein and several articular tissues in early knee joint osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:1308-9.

Lahav J. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1182:1-14.

Larsen A. How to apply Larsen score in evaluating radiographs of rheumatoid arthritis in long-term studies. *J Rheumatol.* 1995;22:1974-5.

Leor J, Rozen L, Zuloff-Shani A, Feinberg MS, Amsalem Y, Barbash IM, et al. Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation.* 2006;114:94-100.

Lequesne MG, Dang N, Lane NE. Sports practice and osteoarthritis of the limbs. *Osteoarthritis Cartilage.* 1997;5:75-86.

Li Xin, Gignac MAM, Anis AH, The indirect costs of arthritis resulting from unemployment, reduced performance, and occupational changes while at work. *Med Care.* 2006;44:304-10.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-74.

Liu C, Kong W, Ilalov K, Yu S, Xu K, Prazak L, et al. ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB J.* 2006;20:e129-e140.

Mabuchi A, Manabe N, Haga N, Kitoh H, Ikeda T, Kawaji H, et al. Novel types of COMP mutations and genotype-phenotype association in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum Genet.* 2003;112:84-90.

Majack RA, Goodman LV, Dixit VM. Cell Surface Thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Biol.* 1988;106:415-22.

Malashkevich VN, Kammerer RA, Efimov VP, Schultess T, Engel J. The crystal structure of a five-stranded coiled-coil in COMP: a prototype ion channel? *Science.* 1996;274:761-5.

Mansfield PJ, Boxer LA, Suchard SJ. Thrombospondin stimulates motility of human neutrophils. *J Cell Biol.* 1990;111:3077-86.

Månsson B, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole AR, et al. Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest.* 1995;95:1071-7.

Maurer P, Hohenester E, Engel J. Extracellular calcium-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:609-17.

Mazières B, Garnero P, Gueguen A, Abbal M, Berdah L, Lequesne M, et al. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH cohort. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:354-9.

Mazzuca SA, Brandt KD, Katz BP, Ding Y, Lane KA, Buckwalter KA. Risk factors for early radiographic changes of tibiofemoral osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* No prelo 2006. Disponível em: <http://ard.bmj.com/cgi/rapidpdf/ard.2006.055905v1>

Meulenbelt I, Kloppenburg M, Kroon HM, Houwing-Duistermaat JJ, Garnero P, Le Graverand H, et al. Clusters of biochemical markers are associated with radiographic subtypes of osteoarthritis (OA) in subject with familial OA at multiple sites. The GARP study. *Osteoarthritis Cartilage.* No prelo 2006, doi:10.1016/j.joca.2006.09.007 Disponível em: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WP3-4M4KR7C-3&\\_coverDate=10%2F17%2F2006&\\_alid=509894697&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_qd=1&\\_cdi=6979&\\_sort=d&\\_view=c&\\_acct=C000037098&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=685977&\\_md5=223bab3acab1eeb4d1a420b0db8a2362](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WP3-4M4KR7C-3&_coverDate=10%2F17%2F2006&_alid=509894697&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=6979&_sort=d&_view=c&_acct=C000037098&_version=1&_urlVersion=0&_userid=685977&_md5=223bab3acab1eeb4d1a420b0db8a2362)

Miano JM, Vlassic N, Tota RR, Stemerman MB. Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury: a putative in vivo mechanism for autocrine growth. *Atheroscler Thromb.* 1993;13:211-9.

Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2146-54.

Mörgelin M, Heinegard D, Engel J, Paulsson M. Electron microscopy of native cartilage oligomeric matrix protein purified from the Swarm rat chondrosarcoma reveals a five-armed structure. *J Biol Chem.* 1992;267:6137-41.

Mortimer JA, Borenstein AR. Tools of the epidemiologist. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2006;20(3 Suppl 2):S35-41.

Muirden KD. Community Oriented Program for the Control of Rheumatic Diseases: studies of rheumatic diseases in the developing world. *Curr Opin Rheumatol.* 2005;17:153-6.

Muller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2005;1:102-10.

Mündermann A, Dyrby CO, Andriacchi TP, King KB. Serum concentration of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is sensitive to physiological cyclic loading in healthy adults. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:34-8.

Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Höök M. Transforming growth factor- $\beta$  complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell*. 1992;3:181-8.

Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:1777-85.

Nadkar MY, Samant RS, Vaidya SS, Gorges NE. Relationship between osteoarthritis of knee an menopause. *J Assoc Physicians India*. 1999; 47:1161-3.

Nakajima H, Nakajima HO, Salcher O, Dittie AS, Dembowsky K, Jing S, et.al. Atrial but not ventricular fibrosis in mice expressing a mutant transforming growth factor-beta(1) transgene in the heart. *Circ Res*. 2000;86:571-9.

Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, Di Cesare PE, Michel BA, Häuselmann HJ. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol*. 1997;36:1151-60.

Neidhart M, Müller-Ladner U, Frey W, Bosserhoff AK, Colombani PC, Frey-Rindova P, et.al. Increased serum levels of non-collagenous matrix proteins (cartilage oligomeric matrix protein and melanoma inhibitory activity) in marathon runners. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8:222-9.

Newton G, Weremowicz S, Morton CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. Characterization of human and mouse cartilage oligomeric matrix protein. *Genomics*. 1994;24:435-9.

Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP, Brown MA. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. 2004;5:151-7.

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*. 2004;94:1543-53.

Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem*. 1992;267:22346-50.

Otterness IG, Swindell AC, Zimmerer RO, Poole AR, Ionescu M, Weiner E. An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis: segregation of the markers into clusters and distinguishing osteoarthritis at baseline. *Osteoarthritis Cartilage*. 2000;8:180-5.

Otterness IG, Swindell AC. Criteria for selection and application of molecular markers for clinical studies of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003;11:153-8.

Otterness IG, Weinert E, Swindell AC, Zimmerer RO, Ionescu M, Poole AR. An analysis of 14 molecular markers for monitoring osteoarthritis: relationship of the markers to clinical end-points. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9:224-31.

Peloschek P, Bogl K, Sailer J, Wick M, Graninger W, Robinson S, et al. The RoentgenCoach-Rheumatology--a novel tool to enhance efficacy of radiological scoring of rheumatoid arthritis. Results of experimental scoring of 72 cases. *Acta Orthop Scand Suppl*. 2002;73(suppl 305):58-62.

Petersson IF, Boegård T, Dahlström J, Svensson B, Heinegård D, Saxne T. Bone scan and serum markers of bone and cartilage in patients with knee pain and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998a;6:33-9.

Petersson IF, Boegård T, Svensson B, Heinegård D, Saxne T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee. *Br J Rheumatol*. 1998b;37:46-50.

Piegas LS, Avezum A, Pereira JC, Neto JM, Hoepfner C, Farran JA, et al. AFIRMAR study investigators. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. *Am Heart J*. 2003;146:331-8.

Posey KL, Davies S, Bels ES, Haynes R, Sandell LJ, Hecht JT. In vivo human Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) promoter activity. *Matrix Biol*. 2005;24:539-49.

Radovan J, Vaclav P, Petr W, Jan C, Michal A, Richard P, et al. Changes of collagen metabolism predict the left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2006;293:71-8.

Recklies AD, Baillargeon L, White C. Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 1998;41:997-1006.

Reed MJ, Iruela-Arispe L, O'Brien ER, Truong T, LaBell T, Bornstein P, et al. Expression of thrombospondins by endothelial cells: injury is correlated with TSP-1. *Am J Pathol*. 1995;147:1068-80.

Riessen R, Fenchel M, Chen H, Axel DI, Karsch KR, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein (Thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:47-54.

Riessen R, Kearney M, Lawler J, Isner JM. Immunolocalization of thrombospondin-1 in human atherosclerotic and restenotic arteries. *Am Heart J*. 1998;135:357-64.

Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegård D. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem*. 1998;273:20397-403.

Rowan A. Cartilage catabolism in arthritis: factors that influence homeostasis. *Expert Rev Mol Med*. 2001;2001:1-20.

Saxne T, Glennas A, Kvien TK, Melby K, Heinegård D. Release of cartilage macromolecules into the synovial fluid in patients with acute and prolonged phases of reactive arthritis. *Arthritis Rheum*. 1993;36:20-5.

Saxne T, Heinegård D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol*. 1992;31:583-91.

Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1998;101:273-81.

Schellekens GA, Visser H, Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000;43:155-63.

Schellings MWM, Pinto YM, Heymans S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res.* 2004;64:24-31.

Scott DL. Prognostic factors in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2000;39(suppl.1):24-9.

Senna ER, Barros ALP, Silva EO, Costa IAF, Pereira LVB, Mesquita, R, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COMPCORD approach. *J Rheumatol.* 2004;31:594-7.

Seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC7): resetting the hypertension sails. *Hypertension.* 2003;41:1178-9.

Sharif M, Granell R, Johansen J, Clarke S, Elson C, Kirwan JR. Serum cartilage oligomeric matrix protein and other biomarker profiles in tibiofemoral and patellofemoral osteoarthritis of the knee. *Rheumatology.* 2006;45:522-6.

Sharif M, Saxne T, Shepstone L, Kirwan JR, Elson CJ, Dieppe PA. Relationship between serum cartilage oligomeric matrix protein levels and disease progression in osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol.* 1995;34:306-10.

Silman AJ, Newman J. Obstetric and gynaecological factors in susceptibility to peripheral joint osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1996;55:671-3.

Silveira IG . Probabilidade de artrite reumatóide a partir da testagem para fator reumatóide e anticorpos anti-peptídeo citrulinado cíclico [tese]. Porto Alegre(RS): PUCRS; 2005.

Sipe JD. Acute-phase proteins in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1995;25:75-86.

Skoumal M, Haberhauer G, Feyertag J, Kittl EM, Bauer K, Dunky A. Serum level of cartilage oligomeric matrix protein (COMP): a rapid decrease in patients with active rheumatoid arthritis undergoing intravenous steroid treatment. *Rheumatol Int.* 2006;26:1001-4.

Skoumal M, Haberhauer G, Feyertag J, Kittl EM, Bauer K, Dunky A. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein are elevated in rheumatoid arthritis, but not in inflammatory rheumatic diseases such as psoriatic arthritis, reactive arthritis, Raynaud's syndrome, scleroderma, systemic lupus erythematosus, vasculitis and Sjögren's syndrome. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:73-4.

Skoumal M, Kolarz G, Klingler A. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein. A predicting factor and a valuable parameter for disease management in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2003;32:156-61.

Sottile J, Hocking DC. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell*. 2002;13:3546-59.

Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendás AM, Llano E, et al. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Lett*. 2000;478:52-6.

Svensson L, Aszodi A, Heinegard D, Hunziker EB, Reinholt FP, Fassler R, et al. Cartilage oligomeric matrix protein-deficient mice have normal skeletal development. *Mol Cell Biol*. 2002;22:4366-71.

Svensson L, Oldberg Å, Heinegård D. Collagen binding proteins. *Osteoarthritis Cartilage*. 2001;9(suppl A):S23-S28.

Szoek CE, Cicuttini FM, Guthrie JR, Clark MS, Dennerstein L. Factors affecting the prevalence of osteoarthritis in healthy middle-aged women: data from the longitudinal Melbourne Women's Midlife Health Project. *Bone*. 2006;39:1149-55.

Taraboletti G, Roberts DD, Liotta LA. Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *J Cell Biol*. 1987;105:2409-15.

Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem*. 1996;271:30709-16.

Tian H, Stogiannidis I. Up-regulation of cartilage oligomeric matrix protein gene expression by insulin-like growth factor-I revealed by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2006;38:677-82.

Unger S, Hecht JT. Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: New etiologic developments. *Am J Med Genet*. 2001;106:244-50.

van den Berg WB. Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2001;30(5 Suppl 2):7-16.

Vilím V, Olejárová, Macháček, Gatterová J, Kraust VB, Pavelka K. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) correlate with radiographic progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10:707-13.

Vilim V, Voburka Z, Vytasek R, Senolt L, Tchetverikov I, Kraus VB, et al. Monoclonal antibodies to human cartilage oligomeric matrix protein: epitope mapping and characterization of sandwich ELISA. *Clin Chim Acta*. 2003;328:59-69.

Wassmuth R, Wagner U. Prognostic use of human leukocyte antigen genotyping for rheumatoid arthritis susceptibility, disease course, and clinical stratification. *Rheum Dis Clin North Am*. 2002;28:17-37.

Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*. 1997;96:4065-82.

Weitoft T, Larsson A, Saxne T, Rönnblom L. Changes of cartilage and bone markers after intra-articular glucocorticoid treatment with and without postinjection rest in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1750-3.

Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation.* 1991;84:2123-34.

Wick MC, Lindblad S, Klareskog L, Van Vollenhoven RF. Relationship between inflammation and joint destruction in early rheumatoid arthritis: a mathematical description. *Ann Rheum Dis.* 2004;63:848-52.

Willems IE, Havenith MG, De Mey JG, Daemen MJ. The alpha smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol.* 1994;145:868-75.

Williams FM, Andrew T, Saxne T, Heinegar D, Spector TD, MacGregor AJ. The heritable determinants of cartilage oligomeric matrix protein. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2147-51.

Wislowska M, Jablonska B. Cartilage oligomeric matrix protein in serum in systemic lupus erythematosus and knee osteoarthritis: preliminary communication. *Rheumatol Int.* 2005b;25:373-8.

Wislowska M, Jablonska B. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol.* 2005a;24:278-84.

Wollheim FA, Eberhardt KB, Johnson U, Saxne T. HLA DRB1\* typing and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) as predictors of joint destruction in recent-onset rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1997;36:847-9.

Wollheim FA. Predictors of joint damage in rheumatoid arthritis. *APMIS.* 1996;104:81-93.

Xiao Yi, Keeff J, Guo J, Gazdhar A, Liao Q, Di Cesare PE, et al. Cartilage oligomeric matrix protein expression in hepatocellular carcinoma and the cirrhotic liver. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:296-302.

Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS. Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *Am J Physiol.* 1998;275(1 Pt 2):H250-8.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DE DOENÇA PARA AR DO COLÉGIO AMERICANO DE REUMATOLOGIA (ACR)

(Arnett et.al., 1988)

- 1) Rigidez matinal em torno das articulações por até 1 hora antes da melhora máxima.
- 2) Inchaço (artrite) dos tecidos moles de 3 ou mais grupos articulares observadas por um médico.
- 3) Inchaço (artrite) de articulações de punhos, interfalangeanas, metacarpofalangeanas.
- 4) Inchaço (artrite) simétrica.
- 5) Nódulos reumatóides
- 6) Presença de fator reumatóide
- 7) Erosões radiográficas e/ou osteopenia periarticular em articulações das mãos e/ou dos pulsos.

Critérios 1-4 devem estar presentes por pelo menos 6 semanas.

AR é definida pela presença de 4 ou mais critérios, sem qualificações (clássica, definida, provável) ou lista de exclusões.

## ANEXO B

### CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DE DOENÇA PARA OSTEOARTRITE DO COLÉGIO AMERICANO DE REUMATOLOGIA (ACR)

(Altman R et.al., 1990; Altman et.al., 1991)

#### *Mãos:*

1. Dor nas mãos, doloridas ou enrijecidas por muitos dias ou mês anterior
2. Aumento dos tecidos duros de duas ou mais de dez articulações selecionadas.
3. Articulação metacarpofalangeana inchada em duas ou mais articulações.
4. Aumento de tecido duro em duas ou mais articulações interfalangeanas distais.
5. Deformidade de um ou mais de dez articulações das mãos selecionadas.

\* OA se os itens presentes são: 1,2,3,4 ou 1,2,5,6

#### *Quadril*

1. Dor no quadril por muitos dias ou mês anterior
2. VSG  $\leq$  20mm/h (laboratório)
3. Radiografia femural e/ou acetabular com osteófitos.
4. Radiografia com estreitamento do espaço articular no quadril.

\* OA se os itens presentes são: 1,2,3 ou 1,2,4 ou 1,3,4

#### *Joelho*

##### Achados clínicos:

1. Dor no joelho por muitos dias ou mês anterior
2. *Crepitus* na articulação com movimento ativo
3. Rigidez matinal  $\leq$  30 minutos de duração
4. Idade  $\geq$  38 anos
5. Aumento ósseo no joelho ao exame

\* OA se os itens presentes são: 1,2,3,4 ou 1,2,5 ou 1,4,5.

##### Achados clínicos e radiográficos

1. Dor no joelho por muitos dias ou mês anterior
2. Osteófitos na margem articular (radiografia)
3. Líquido sinovial típico de AO (laboratório)

4. Idade  $\geq 40$  anos
5. Rigidez matinal  $\leq 30$  minutos de duração
6. *Crepitus* na articulação com movimento ativo

\* OA se os itens presentes são: 1,2 ou 1,3,5,6 ou 1,4,5,6.

## ANEXO C

**Questionário de Pré-Triagem Clínica para doação de Sangue no Serviço de Hemoterapia do Hospital São Lucas da PUCRS**

<b>Questões</b>		<b>Sim</b>	<b>Não</b>
1	Você já doou sangue? Quando foi a última vez?		
2	Quantas vezes doou nos últimos 12 meses? (0) (1) (2) (3) (4) (5)		
3	Foi impedido de doar sangue alguma vez ou sentiu-se mal após alguma doação?		
4	Dormiu na noite passada?		
5	Há quanto tempo foi sua última refeição?	<b>Hs</b>	
6	Bebeu alguma bebida alcoólica nas últimas 24 horas?		
7	Costuma beber bebidas alcoólicas todos os dias?		
8	Tomou algum medicamento para dor de cabeça, nos últimos 7 dias?		
9	Teve diarreia na última semana?		
10	Teve algum problema de saúde nos últimos 30 dias, incluindo-se gripe, resfriado, amigdalite, sinusite, labirintite?		
11	Tem asma, bronquite ou outro tipo de alergia?		
12	Fez alguma vacina nos últimos 12 meses? Qual?		
13	Perdeu peso nos últimos 3 meses? Quanto?		
14	Tem apresentado feridas ou manchas brancas na boca e língua?		
15	Notou aparecimento de manchas na pele ou ínguas (gânglios)?		
16	Nos últimos 15 dias, teve algum ferimento, abscesso ou furúnculo na pele?		
17	Você fez alguma tatuagem, acupuntura, colocou brinco ou <i>piercing</i> nos últimos 12 meses?		
18	Você teve gonorréia, sífilis ou outra doença sexualmente transmissível?		
19	Você teve contato sexual com parceiro(a) ocasional ou desconhecido nos últimos 12 meses, sem preservativo?		
20	Você teve contato sexual com prostitutas, garotas ou garotos de programa nos últimos 12 meses?		
21	Você deu ou recebeu dinheiro ou drogas em troca de relações sexuais nos últimos 12 meses?		
22	Você usou drogas (tóxicos) injetáveis alguma vez?		
23	Só para doadores do sexo masculino: você teve contato sexual com outro homem nos últimos 12 meses?		
24	Você tem vírus da AIDS, de hepatite B, de hepatite C ou HTLV-I?		
25	Você fez tratamento com hemodiálise ou recebeu transfusão de sangue nos últimos 12 meses?		
26	Teve contato sexual, nos últimos 12 meses, com pessoa enquadrada em alguma das situações incluídas nas questões 19 a 25?		
27	Você esteve preso/detido nos últimos 12 meses?		



**ANEXO D****Ficha de coleta de dados**

Nome (nº doador):----- alíquota no biobanco nº:-----

Registro:-----Idade:-----

Sexo: ( ) 0 – Masculino ( ) 1 – Feminino

( ) **AR**

Tempo de doença: ----- meses COMP: -----U/L

( ) **OA**

Tempo de doença:-----meses COMP: -----U/L

( ) **IAM**

Dislipidemia ( ) 0 Não ( ) 1 Sim

Diabetes ( ) 0 Não ( ) 1 Sim

Infarto prévio ( ) 0 Não ( ) 1 Sim

Tabagismo ( ) 0 Não ( ) 1 Sim

COMP: ----- U/L

( ) **Controle (Banco de Sangue)**

COMP: ----- U/L

## ANEXO E

**Cópia do ofício 209/05 aprovação do projeto de tese pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.**



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA



209/05-PG

Porto Alegre, 27 de julho de 2005.

A Pós-Graduanda  
Ana Lígia Bender  
N/Universidade

Prezada Pós-Graduanda:

Comunicamos que a proposta de tese intitulada "Proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP/Trombospondina 5) em doenças reumáticas e extra-articulares" foi **aprovada** pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

Informamos que a mesma deve ser encaminhada ao comitê de Ética em Pesquisa, através do CINAPE, 2º andar do HSL, ramal 2687. Em anexo, cópia da avaliação.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Renato Machado Fiori  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Medicina e Ciências da Saúde em exercício

**C/c: Prof. Dr. Henrique Luiz Staub**

**ANEXO F**

**Cópia do ofício 923/05 do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS  
aprovação do projeto “Proteína oligomérica da matriz da cartilagem  
(COMP/Trombospondina-5) em doenças reumáticas e extra-articulares” .**



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 923/05-CEP

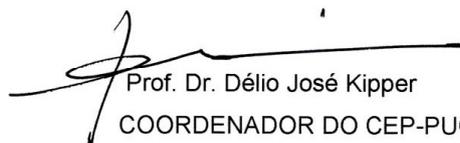
Porto Alegre, 28 de setembro de 2005.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: “Proteína oligomérica da matriz da cartilagem (Comp/trombospondina 5) em doenças reumáticas e extra-articulares”.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Délio José Kipper  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Dout Ana Ligia Bender  
N/Universidade

## ANEXO G

**Cópia do ofício 799/03 - Aprovação no CEP/PUCRS do projeto “ Marcadores de progressão e atividade na artrite reumatóide: fator reumatóide, proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação e proteína oligomérica da matriz da cartilagem. Estudo de seguimento de dois anos”.**



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 799/03-CEP

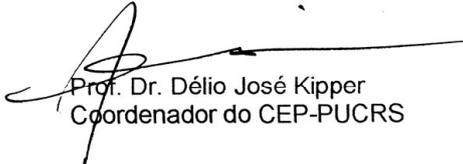
Porto Alegre, 02 de dezembro de 2003.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: “Marcadores de progressão e atividade na artrite reumatóide: fator reumatóide, proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação e proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP): estudo de seguimento de 2 anos”.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Délio José Kipper  
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Dout Ana Ligia Bender  
N/Universidade

## ANEXO H

*Artigo a ser submetido à revista Cardiovascular Pathology*

## **Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP/TSP-5) in Acute Myocardial Infarction**

Ana Lígia Bender<sup>a</sup>, Inês Guimaraes da Silveira<sup>b</sup>, Luis Carlos Bodanese<sup>c</sup>, Carlos Alberto von Mühlen<sup>b</sup>, Henrique Luiz Staub<sup>b\*</sup>.

<sup>a</sup> Faculty of Pharmacy, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup> Department of Rheumatology, Faculty of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Department of Cardiology, Faculty of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil

---

*Introduction:* Thrombospondins (TSP) are a family of extracellular proteins involved in tissue genesis and remodeling. The cartilage oligomeric matrix protein (COMP)/TSP-5 is detected in normal as well as atherosclerotic and restenotic human arteries. It may play a role in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells at atheroma sites. In this study, we set up to averiguate the association, if any, of an eventually altered COMP/TSP-5 serum level with acute myocardial infarction (AMI).

*Methods:* This case-control study assessed the levels of COMP/TSP-5 in 66 patients with AMI and 100 healthy controls. Samples were collected in the first seven days after the ischaemic event. Serum COMP/TSP-5 was assayed by ELISA (COMP ELISA AnaMar Medical™, Lund, Sweeden). To estimate the grade of association of COMP/TSP-5 levels with disease, odds ratios (OR) were calculated. Comparison of groups was accomplished by variance analysis. Diagnostic performance of COMP in the groups was obtained by calculating sensitivity, specificity, and likelihood ratios (LR).

*Results and Conclusion:* The cutoff value of 4 U/L better differentiated the AMI cases of healthy controls. A strong association of COMP/TSP-5 levels below 4 U/L with AMI was observed (OR=9.1; 95%CI 4.2-20.1). A sensitivity of 66.7 % and a specificity of 82 % were obtained for the proposed cutoff. The positive LR for levels below 4 U/L was small (3.7; 95%CI 2.4-5.8). The clinical and pathological meaning of low COMP/TSP-5 serum levels in AMI have yet to be clarified.

*Key Words:* Cartilage oligomeric matriz protein (COMP), thrombospondin-5, acute myocardial infarction.

*Correspondence to:*

\*Henrique Luiz Staub

Rheumatology Department

São Lucas Hospital

Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 6690/220 – CEP 90610-000 – Porto Alegre – Brazil

E-mail: henriquestaub@terra.com.br

## 1. Introduction

The thrombospondins (TSP) comprise a family of extracellular, calcium-binding proteins that modulate the cellular phenotype during tissue genesis and remodeling. Up to date, five members of this family have been identified and each member has a specific spatial and temporal pattern of expression during development. TSP-1 and 2 (subgroup A TSP) contain a sequence similarity with procollagen, whereas the subgroup B proteins (TSP 3 and 4) and the cartilage oligomeric matrix protein (COMP) lack this sequence<sup>1</sup>.

The level of TSP in body fluids is linked to the growth of primary tumors and to metastasis, to malaria infection, and to development of the atherosclerotic plaque<sup>2</sup>. COMP (TSP-5) is a member of the thrombospondin family of extracellular matrix proteins<sup>3</sup>. It is expressed in cartilage, tendon, vitreous, and vascular smooth muscle cells. The protein binds in a zinc-dependent fashion to collagen type I, II and IX<sup>3,4</sup>.

Increased levels of COMP/TSP-5 have been found in active arthritis, in osteoarthritis (OA), and after cartilage injury. Furthermore, COMP/TSP-5 is known as a marker for early cartilage destruction, and is elevated in patients with rapidly destructive rheumatoid arthritis (RA)<sup>5,6</sup>. The protein is highly homologous to the carboxyl-terminal half of thrombospondin. The 84 aminoterminal sequence is unique for COMP/TSP-5<sup>3</sup>, nevertheless.

COMP/TSP-5 was detected in normal as well as in atherosclerotic and restenotic human arteries with immunohistochemistry. The majority of COMP/TSP-5 was expressed in close proximity to vascular smooth muscle cells. COMP/TSP-5 might play a role in adhesion and migration of vascular smooth muscle cells during atherogenesis<sup>7</sup>.

The physiopathological role of COMP/TSP-5 in acute ischaemic events such as acute myocardial infarction (AMI) is still unknown. In this study we set up to evaluate the COMP/TSP-5 serum levels in patients with AMI and controls. The possibility that abnormal COMP/TSP-5 levels associate to AMI was also warranted.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Subjects.

This case-control study assessed the levels of COMP in patients with AMI and healthy controls. The cases comprised patients older than 16 years with AMI, not selected by sex or race. Diagnosis of AMI was established by a Cardiologist according to previously reported algorithms, clinical history, serial electrocardiographic alterations, and laboratory tests confirming myocardial necrosis<sup>8</sup>, and yet the cardiologist continued to ignore the results of COMP/TSP-5 levels. Samples were collected in the first seven days after the ischaemic event. Patient or his legal representative provided written informed consent

The exclusion criteria for AMI cases were as follows: a) rheumatic disorders such as RA and OA; b) infective endocarditis; c) tumours (current or past); c) infection by the human immunodeficiency virus or *treponema pallidum*; d) presence of known hereditary causes of thrombosis, such as homocystinuria or mutation of factor V (Leiden); and e) previous diagnosis of antiphospholipid syndrome (APS) or another disease of the connective tissue.

The control group comprised 100 healthy blood donors older than 40 years, with no rheumatic or cardiovascular complains in medical history.

### 2.2 Method

Serum was obtained from the routinely drawn blood samples, centrifuged immediately. The samples were kept at -70° C prior to the measuring of COMP/TSP-5. Serum COMP/TSP-5 was assayed by ELISA (COMP ELISA AnaMar Medical™, Lund, Sweden) with a solid-phase, two site enzyme immunoassay, based on the direct “sandwich” technique in which two monoclonal antibodies are directed against separate antigenic determinants of the COMP/TSP-5 molecule. The ELISA test was performed according to the manufacturers’ instructions<sup>9</sup>.

A 5% significance level was adopted. Chi square tests were used comparing categorical variables, and the Student *t* test were used for comparing continuous variables. Likelihood ratios (LR) with 95% confidence interval (95%CI) were calculated; the relative power of LR were used according to the Deeks scale<sup>10</sup>: positive LR greater than 10 or negative LR less than 1 may have a very substantial impact on clinical decisionmaking through meaningful revision of disease probability; positive LR of 2 to 10 or negative LR of .5 to .1, reside in between and may occasionally be clinically important. Odds ratios (OR) with 95%CI were calculated and adjusted for age and sex. The Hopkins scale for OR was used as follows: OR between 1 and 1,5 was considered very low; between 1.5 and 3.5 was

considered low; between 3.5 and 9.0 was considered moderate; between 9.0 and 32 was considered strong; and above 32 was considered very strong. Analyses were obtained by SPSS for Windows, version 11.5 (SPSS Inc., Chicago, EUA) and MEDCALC for Windows (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

This study was approved by the local ethics committee.

### 3. Results

Risk factors for patients with AMI included diabetes mellitus (27.3%), hypercholesterolemia (47%), smoking (56.1%) and previous AMI (15.2%). Demographic characteristics and COMP/TSP-5 levels of cases and controls, as well as COMP/TSP-5 levels, are shown in Table 1. The female gender was more frequent in controls than cases, and AMI patients were older. After adjustment for age and sex, COMP/TSP-5 levels were significantly lower in patients with AMI as compared to controls ( $P < 0.001$ ).

**Table 1: Demographic characteristics and COMP/TSP-5 levels in controls and acute myocardial infarction groups (AMI)**

	Control n = 100	AMI n = 66	P
<b>Gender</b>			
Female (n)	45 (45%)	20 (30%)	<0.05
<b>Age (years)</b>	45±6	58±6	<0.05
<b>COMP/TSP-5 (U/L)</b>	7.3±0.5	3.0±0.6	<0.01

n: number of individuals; P: statistic significance

The COMP values were obtained using model of covariance with adjustment for age and gender, and the values are presented as mean ± standard error in post-hoc test (SIDAK)

After stratification of COMP/TSP-5 levels and calculation of LR, we found that a cutoff of 4 U/L better discriminated the AMI group from controls. A moderate specificity and a smaller sensitivity were observed for AMI utilizing the proposed cutoff. The 9.1 OR (95% CI 4.2-20.1) indicated a strong association of COMP/TSP-5 levels below 4 U/L with AMI. The 3.7 positive LR indicated to be 3.7 times more probable a COMP/TSP-5 level below 4 U/L in AMI than controls. The negative LR (0.4), in turn, showed that was less probable a result above 4 U/L in AMI when compared to controls. To calculate the positive predictive value (PPV), we utilized a 15% AMI prevalence based on the GRACE Study (*Global*

*Registry of Acute Coronary Events*)<sup>11</sup>. The post-test probability (PPV) stood around 39.5%. One minus the negative predictive value (NPV) indicated a probability of disease of 7% if COMP/TSP-5 tested negative. Table 2 summarizes these data.

**Table 2. Diagnostic performance of COMP/TSP-5 in AMI diagnostic**

Test Characteristic	Cases (AMI)	Controls (Blood donors)
< 4 U/L	44	18
≥4 U/L	22	82
Sensitivity	66.7 % (95% CI 54-77.8 %)	
Specificity	82.0 % (95% CI 73- 89 %)	
Positive Predictive Value	39.5 %** (95% CI 26.1-55.5 %)	
1- NPV (Negative Predictive Value)	7 % ** (95% CI 10.1-4.2 %)	
OR	9.1 (95% CI 4.2- 20.1)	
Positive LR	3.7 (95% CI: 2.4-5.8)	
Negative LR	0.4 (95% CI 0.63-0.25)	

\*\*\* Pre-test probability of AMI based in a 15% Brazil prevalence (“*Global Registry of Acute Coronary Events*” – GRACE Study)<sup>11</sup>

OR: odds ratio; LR: likelihood ratio

95%CI: confidence interval

AMI: acute myocardial infarction

#### 4. Discussion

Knowledge of the role of TSP in atherosclerotic disorders is yet incipient. Testing of TSP such as COMP/TSP-5 in sera of patients with AMI is also recent. We evaluated COMP/TSP-5 levels in AMI patients and controls using a newer enzymatic immunoassay. Our data showed that a cutoff value of 4 U/L better differentiated the individuals with AMI from healthy controls. After adjustment for gender and age, the lower COMP/TSP-5 levels of AMI patients remained significant as compared to blood donors ( $P < 0.01$ ).

For the utilized cutoff, specificity (82%) was much better than the sensitivity (66.7%). A low post-test probability (39.5 %) was found, however. By considering the OR, a strong association of low COMP/TSP-5 levels with AMI was documented. The case-control design does not allow us to define if low COMP/TSP-5 levels have a cause effect on AMI appearance.

The positive LR of 3.7 showed that the COMP/TSP-5 levels < 4 U/L could occasionally be important for diagnosis of AMI. In another words, the chance of detecting a COMP/TSP-5 titer < 4 U/L was 3.7 times greater in patients with AMI than without AMI. The probability of disease if COMP/TSP-5 titered above the cutoff was, considering a 15% AMI prevalence, not higher than 7%.

Once high levels of COMP/TSP-5 levels can be detected in patients with RA or OA<sup>5,12,13,14</sup> patients with AMI and concomitant RA/OA were excluded of our study, so avoiding a confusion bias for greater COMP/TSP-5 levels. AMI patients with confirmed inherited thrombophilia or APS were also excluded, once atherosclerotic patients were prioritized. Selection of the blood donors in a case-control design is usually problematic. In our study, blood donors with previous or concomitant rheumatic disease, as well as cardiovascular disorders, were excluded by medical history.

Mündermann *et al* have reported a mean physiological variation of 9.7% in COMP/TSP levels after exercise<sup>15</sup>. This was not applicable to our patients with AMI, who were resting in bed, or to controls, whose blood was collected after a half-hour rest period. Yet, COMP/TSP-5 levels were uniformly lower in the AMI group as compared to blood donors.

Many cartilage macromolecules as TSP are distributed to other tissues, where they might have similar functions<sup>16</sup>. The physiological actions of COMP/TSP-5 in connective tissue remain controversial, but they are probably linked to tissue genesis and remodeling<sup>18</sup>. Of note, COMP/TSP-5 is expressed in normal, but also in atherosclerotic or restenotic human arteries. It could be involved in adhesion and migration of vascular smooth muscle cells to atheroma sites<sup>7</sup>.

This is a preliminary study looking at the association of COMP/TSP-5 levels with AMI. The depletion of COMP/TSP-5 levels in this group of patients is intriguing. It could be related to a high protein expression in a damaged tissue undergoing scarring process, but this is only hypothetical. Deficient COMP/TSP-5 synthesis is an alternative possibility.

In our study, the AMI samples were collected in the first seven days after the event. We did not stratify patients by time after event. Considering the inflammatory, proliferative and maturation histological phases after AMI<sup>17</sup>, probably our design did not contemplate the latter. Thus, the interpretation of our data should be limited to the inflammatory and proliferation cycles after an AMI., where crucial changes of the extracellular matrix structure take place. For the future, it will be worthy a detailed kinetics evaluation of COMP/TSP-5 and other remodeling markers for longer periods after the AMI event.

In summary, COMP/TSP-5 levels as measured by a newer enzymatic immunoassay were clearly abnormal in AMI patients. Our data indicate that low levels of COMP/TSP-5 levels are associated with the early phase of an AMI. The clinical and pathological significance of this finding should be clarified in forthcoming studies.

## REFERENCES

- 1) Adams JC. Functions of the conserved carboxy-terminal cassette in cell-extracellular matrix interactions and signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:1102:14.
- 2) Lahav J. The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1182:1-14.
- 3) Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem.* 1992;267:22346-50.
- 4) Svensson L, Aszodi A, Heinegard D, Hunziker EB, Reinholt FP, Fassler R, et al. Cartilage oligomeric matrix protein-deficient mice have normal skeletal development. *Mol Cell Biol.* 2002;22:4366-71.
- 5) den Broeder AA, Joosten LA, Saxne T, Heinegard D, Fenner H, Miltenburg AM, et al. Long term anti-tumour necrosis factor alpha monotherapy in rheumatoid arthritis: effect on radiological course and prognostic value of markers of cartilage turnover and endothelial activation. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:311-8.
- 6) Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, Di Cesare PE, Michel BA, Häuselmann HJ. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol.* 1997;36:1151-60
- 7) Riessen R, Fenchel M, Chen H, Axel DI, Karsch KR, Lawler J. Cartilage oligomeric matrix protein (Thrombospondin-5) is expressed by human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:47-54.
- 8) Seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC7): resetting the hypertension sails. *Hypertension.* 2003;41:1178-9.
- 9) AnaMar Medical™ [homepage na Internet]. Göteborg: 2006. COMP ELISA® 14-1006-71. Directions for use. Enzyme Immunoassay. [update in 2004 Oct.]:[p.3-12] 2040/06 In: <http://www.anamar.com/Biomarkers/CartilagMarkers/COMPELISA/AnaMarBrux.pdf>
- 10) Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ.* 2004;329:168-9.
- 11) Global Registry of Acute Coronary Events. GRACE registry [base de dados na Internet]. Boston: University of Massachusetts School of medicine. c1998 [update in 2006 July; acesso em 2006 out 22]. In: <http://www.outcomes-umassmed.org/grace/> ..
- 12) Saxne T, Heinegard D. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol.* 1992;31:583-91.
- 13) Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein: a prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1992;31:593-8.

- 14) Månsson B, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole AR, et al. Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest.* 1995;95:1071-7.
- 15) Mündermann A, Dyrby CO, Andriacchi TP, King KB. Serum concentration of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is sensitive to physiological cyclic loading in healthy adults. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:34-8.
- 16) Svensson L, Oldberg Å, Heinegård D. Collagen binding proteins. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9(suppl A):S23-S28.
- 17) Abbate A, Bussani R, Amin MS, Vetovec GW, Baldi A. Acute myocardial infarction and heart failure: role of apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:1834-40.