

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Medicina  
Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica**

**Perfil da Ativação Imunoinflamatória Associada às  
Síndromes Coronarianas**

**Dissertação de Mestrado**

**Autora: Karen Fontoura Prado  
Orientadora: Dra. Nadine Clausell**

**Porto Alegre, julho de 1996**

*“o que torna uma resolução tão difícil é não sabermos o que queremos  
e o quanto queremos”*

*para Mario e Mariana*

## Agradecimentos

Quando iniciamos uma jornada tendemos à concentrar nossos esforços, pensamentos e expectativas na conclusão do caminho. No entanto, é durante a caminhada que se processa a principal experiência que transforma e enriquece àqueles que a vivenciam. Muitas vezes só conseguimos perceber este fato ao olhar com distanciamento todo o conjunto. Foi o que ocorreu comigo.

Desde a decisão de cursar o mestrado, incentivada pelo sábio mestre professor Sérgio Saldanha Menna Barreto ao qual devo esta oportunidade, até a materialização desta tese passaram-se três anos durante os quais aprendi muitas lições e certamente recebi mais do que fui capaz de retribuir.

O envolvimento em obter os créditos necessários e em seguir todas as etapas teóricas da formação me impediram de apreciar, naquele momento, o grande esforço e a dedicação de todos os que integram o Curso de Pós-Graduação em Medicina-Clinica Médica em qualificar a universidade para a comunidade formando mestres, doutores, pesquisadores. Agradeço por estar inserida neste contexto.

Não foi um caminho fácil, porém sempre encontrei quem me auxiliasse a superar as dificuldades. No momento em que já havia desistido frente aos obstáculos, a Dra. Nadine Clausell propôs-se a caminhar comigo. E foi o que efetivamente fez. Mestre dedicada, competente, paciente ensinou-me muito mais do que posso perceber, mas, no meu atual entendimento, seu principal legado é o elevado senso de ética e responsabilidade que permeia todas as suas ações. Certamente esta tese é mais sua do que minha. Sou grata por esta convivência e por ela ter acreditado em mim quando nem mesmo eu acreditava.

O tempo que passei no Laboratório de Hemodinâmica do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas do Porto Alegre durante a coleta de dados, foi caracterizado pela convivência com amigos sempre dispostos a colaborar. Seu auxílio foi inestimável. Os doutores José Casco e Alexandre Quadros prestaram-me mais do que simples apoio técnico na colocação dos catetères em seio coronário, foram generosos em sua colaboração. A mesma gratidão dedico a equipe do Laboratório de Pesquisa do Hospital de Clínicas de

Porto Alegre, especialmente ao Dr. Jarbas Oliveira. Com todos estes ficou-me a boa sensação de um trabalho executado em equipe e voltado para o desejo de fazer bem feito. Da mesma forma, agradeço ao professor Jorge Pinto Ribeiro à quem recorri muitas vezes em busca de conhecimentos, experiência e auxílio técnico. Suas observações foram sempre valiosas e pertinentes.

Foi também durante este período que tive a oportunidade de sentir o conforto de ombros amigos justamente quando a ansiedade expunha minhas piores características. A Dra. Janete Brauner apoiou-me em muitos destes momentos e houve pacientemente minhas lamúrias.

Em um período tão longo e carregado de trabalho, tensões, momentos difíceis e expectativas, são submetidos a uma verdadeira prova de fogo aqueles que, por estreito convívio conosco, tem de compartilhar o caminho mesmo que não tenha sido sua a opção: Mario, obrigado pelo apoio incondicional, por ser capaz de me devolver a calma, a lucidez, o controle quando os perdi. Obrigado pelo bom humor e pela paciência. Sempre aprendi muito contigo. Para Mariana, tão pequena para entender o que se passava, peço desculpas pelos momentos de ausência, no entanto, sua existência foi um dos motivos que me impulsionou a seguir este caminho.

À todos que compartilharam desta jornada, o meu agradecimento.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	iii
<b>ABREVIATURAS</b>	v
<b>LISTA de FIGURAS</b>	vi
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1. Doença aterosclerótica das artérias coronárias	1
1.1. Incidência	1
1.2. Fatores de risco	2
1.3. Classificação clínica	5
2. Aterosclerose	8
2.1. Morfologia da lesão aterosclerótica	8
2.2. Patogênese da aterosclerose	10
2.2.1. Papel do endotélio na aterogênese	11
2.2.2. Papel das moléculas de adesão na aterogênese	12
2.2.3. Papel dos monócitos, linfócitos e células musculares lisas na aterogênese	13
2.2.4. Lipídios e aterogênese	15
2.2.5. Citoquinas e aterogênese	16
3. Instabilização da placa aterosclerótica	19
3.1. Placa vulnerável	19
3.2. Papel da inflamação na instabilização da placa coronariana	20

<b>HIPÓTESE</b>	25
<b>OBJETIVOS</b>	25
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	26
1. Seleção da amostra	26
2. Coleta do material	27
3. Dosagem plasmática dos marcadores	28
4. Classificação das lesões coronarianas e análise da ventriculografia	29
5. Considerações éticas	29
6. Análise estatística	29
<b>RESULTADOS</b>	31
1. Características clínicas e angiográficas da amostra	31
1.1. Comparação das características clínicas e angiográficas entre os três grupos	32
2. Otimização metodológica do ensaio ELISA	33
3. Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ nos pacientes estudados	37
4. Concentração plasmática de IFN- $\gamma$ nos pacientes estudados	38
5. Concentração plasmática de IL-2sR nos pacientes estudados	39
6. Concentração plasmática da VCAM-1 nos pacientes estudados	45
<b>DISCUSSÃO</b>	51
Considerações metodológicas	52
Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$	54

Concentração plasmática do IL-2sR	56
Concentração plasmática da VCAM-1	58
Limitações do estudo	60
Sumário	61
<b>CONCLUSÕES</b>	62
<b>ESTUDOS COMPLEMENTARES</b>	63
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	64
<b>ANEXO 1</b>	



## RESUMO

**Introdução:** As síndromes coronarianas agudas são eventos que pontuam a evolução da doença aterosclerótica coronariana, associados à elevada morbidade e mortalidade. Embora muito se tenha avançado em relação ao conhecimento de sua fisiopatologia, diagnóstico, prevenção e tratamento, os mecanismos básicos envolvidos na fisiopatologia destes eventos permanecem apenas parcialmente esclarecidos. A instabilização e ruptura da placa aterosclerótica coronariana tem sido apontada como um dos principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia destas síndromes, e a possibilidade de um componente imunoinflamatório associado a este processo vem sendo investigada por diversos autores. No entanto, embora estudos experimentais sustentem esta hipótese, estudos clínicos neste contexto são ainda inconclusivos e contraditórios.

**Objetivos:** Caracterizar o perfil da ativação do processo inflamatório desencadeado localmente na circulação coronariana em associação à instabilização da placa aterosclerótica nas síndromes coronarianas agudas.

**Métodos:** Foram selecionados pacientes encaminhados para cineangiocoronariografia diagnóstica, sendo estes divididos em três grupos de acordo com sua classificação clínica e avaliação cineangiocoronariográfica. O grupo 1 foi composto por 8 pacientes (média de idade  $\pm$  EP  $57 \pm 9$  anos) com dor torácica e artérias coronárias epicárdicas sem lesões identificadas na cineangiocoronariografia (coronárias normais). O grupo 2 foi composto por 14 pacientes (média de idade  $\pm$  EP  $56 \pm 11$  anos) com quadro clínico de angina estável com lesão aterosclerótica coronariana (angina estável). O grupo 3 foi composto por 18 pacientes (média de idade  $\pm$  EP  $62 \pm 10$  anos) com quadro clínico de angina instável e lesão coronariana significativa (angina instável). Foi realizada coleta de sangue do seio coronário e periférico durante a cineangiocoronariografia para dosagem plasmática através do método ELISA dos mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), receptor solúvel de interleucina 2 (IL-2sR) e molécula de adesão da célula vascular tipo 1 (VCAM-1).

**Resultados:** A distribuição de idade, sexo, fatores de risco para doença arterial coronarina, uso de medicação com ação sobre o sistema cardiovascular e número de artérias coronárias comprometidas por lesão (angina estável e angina instável) foi semelhante entre os grupos, exceto para menor prevalência de pacientes com dislipidemia no grupo 3 (angina instável) e menor prevalência de lesão em três vasos no grupo 2 (angina estável). Não foi detectada elevação da concentração plasmática média de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2sR tanto no seio coronário como na periferia nos três grupos estudados. A concentração plasmática média da VCAM-1 foi elevada nos três grupos, sendo a média  $\pm$  EP em cada grupo: grupo de

coronárias normais (periférico =  $2307,12 \pm 295,74$  ng/ml; seio coronário =  $1898,37 \pm 303,55$  ng/ml), grupo de angina estável (periférico =  $1571,00 \pm 214,12$ ; seio coronário =  $1415,50 \pm 221,05$  ng/ml) grupo de angina instável (periférico =  $1698,11 \pm 171,66$  ng/ml; seio coronário =  $1670,77 \pm 248,11$  ng/ml). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos, nem entre os valores de seio coronário e periférico dentro de cada grupo.

**Conclusão:** Neste estudo não foi demonstrado um padrão imunoinflamatório associado com o desenvolvimento de síndrome coronariana aguda, pelo menos a julgar pelos marcadores analisados. Os níveis plasmáticos elevados da VCAM-1, um indicador de ativação do endotélio vascular, foram similares entre os três grupos e tanto em seio coronário como na periferia. Especulamos que este achado possa representar isquemia miocárdica subjacente nestes pacientes, não contemplada pela classificação clínica corrente da doença arterial coronariana.

**Palavras-chave:** doença aterosclerótica coronariana; inflamação; moléculas de adesão.

## ABSTRACT

**Background:** The development of acute coronary syndromes is associated with high morbidity and mortality within the spectrum of coronary artery disease. Although much was learned on its pathophysiology, diagnosis, prevention and management, the basic mechanisms underlying these events remain only partially understood. Rupture and plaque instabilization are thought to play an important role in the development of acute coronary syndromes and the possibility that an immunoinflammatory process could be associated is currently under intense investigation. Several experimental studies do point to this direction albeit few clinical studies available in this field are still inconclusive and controversial.

**Objectives:** To characterize the pattern of immunoinflammatory activation originated primarily in the coronary circulation associated with the development of acute coronary syndromes.

**Methods:** Patients referred for diagnostic cardiac catheterization were studied and divided in to three groups according to their clinical status and coronary anatomy. Group one consisted of eight patients (mean age  $57 \pm 9$  SE ) presenting with chest pain without significant epicardial coronary artery lesions on coronary arteriography (NC). Group two consisted of fourteen patients (mean age  $56 \pm 11$  SE) presenting with stable angina and significant coronary artery lesions (SA). Group three consisted of 18 patients (mean age  $62 \pm 10$  SE) presenting with unstable angina and coronary artery lesions (UA). Blood samples were drawn from the coronary sinus (CS) and a peripheral venous site (P) at the time of cardiac catheterization to measure by ELISA plasma levels of inflammatory markers such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), soluble receptor for interleukin-2 (IL-2sR) and soluble vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1).

**Results:** Sex, age, risk factors for coronary disease, use of cardiovascular medications and coronary anatomy (SA and UA) were similar among the groups studied, except for a lower prevalence of dyslipidemia in the UA group and lower prevalence of three vessel disease in the SA group. Levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-2sR were within the normal range in the three groups, both in CS and P samples. Plasma levels for VCAM-1, however, were elevated in the three groups: CN group P =  $2307,12 \pm 295,74$  ng/ml, SC =  $1898,37 \pm 303,55$  ng/ml; SA group P =  $1571,00 \pm 214,12$  ng/ml, SC =  $1415,50 \pm 221,05$  ng/ml; UA group P =  $1698,11 \pm 171,66$  ng/ml, SC =  $1670,77 \pm 248,11$  ng/ml. There was no statistically significant difference among the groups and within each group regarding CS an P sites for the VCAM-1 levels observed.

**Conclusions:** In this study we could not demonstrate an immunoinflammatory pattern associated with the development of acute coronary syndromes, at least as judged by the markers we chose to examine. The elevated levels observed for VCAM-1, an indication of vascular endothelial activation, were similar among the three groups and in the CS and P sites. We speculate that this finding may represent subjacent myocardial ischemic burden present in these patients not contemplated by current clinical classification of coronary artery disease.

**Key words:** Coronary artery disease; inflammation; adhesion molecules.

## ABREVIATURAS

<b>LDL:</b>	lipoproteína de baixa densidade
<b>HDL:</b>	lipoproteína de alta densidade
<b>VCAM-1</b>	molécula de adesão da célula vascular tipo 1
<b>ICAM-1</b>	molécula de adesão intercelular tipo 1
<b>IL-1</b>	interleucina 1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>MHC</b>	complexo maior de histocompatibilidade
<b>IL-2R</b>	receptor de interleucina 2
<b>PDGF</b>	fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>FGF</b>	fator de crescimento de fibroblastos
<b>IL-2</b>	interleucina 2
<b>IL-2sR</b>	receptor solúvel de interleucina 2
<b>CPK-MB</b>	creatina fosfoquinase fração MB
<b>CN</b>	coronárias normais
<b>AE</b>	angina estável
<b>AI</b>	angina instável
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético

## LISTA de FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1- Curva padrão teste da concentração plasmática de IL-2sR	36
2- Curva padrão teste da concentração plasmática de TNF- $\alpha$	37
3- Curva padrão da concentração plasmática de TNF- $\alpha$	38
4- Curva padrão da concentração plasmática de IFN- $\gamma$	39
5- Curva padrão da concentração plasmática do IL-2sR	41
6- Gráfico da concentração periférica do IL-2sR	42
7- Gráfico da concentração do IL-2sR no seio coronário	43
8- Gráfico da concentração plasmática do IL-2sR	44
9- Curva padrão da concentração plasmática de VCAM-1	46
10- Gráfico da concentração periférica da VCAM-1	47
11- Gráfico da concentração média da VCAM-1 no seio coronário	48
12- Gráfico da concentração plasmática da VCAM-1	49

## INTRODUÇÃO

### 1- Doença Aterosclerótica das Artérias Coronárias

#### 1.1- Incidência

A doença aterosclerótica das artérias coronárias representa um dos principais focos de atenção da cardiologia atual devido ao grande impacto produzido por suas manifestações na morbidade e mortalidade das populações em geral. Embora nas últimas décadas grandes avanços tenham sido feitos no conhecimento de sua fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e prevenção, a aterosclerose coronariana ainda é a principal causa de morte entre indivíduos adultos nos países ocidentais (1).

Estima-se que cerca de 1,5 milhão de infartos agudos do miocárdio ocorram anualmente nos Estados Unidos, e que pelo menos 500.000 destes infartos resultem em morte (2). No entanto, a terapia trombolítica, considerada como um dos maiores avanços terapêuticos para o infarto agudo do miocárdio, previne apenas 5% das mortes agudamente, uma vez que, a maioria destas mortes ocorre súbitamente antes que qualquer tratamento possa ser administrado (3). No Brasil, as doenças cardiovasculares representam um terço de todas as mortes (34% em 1990). Embora a informação epidemiológica para todo o Brasil seja incompleta, existem dados de várias regiões e cidades. Por exemplo, no estado de São Paulo, entre 1970 e 1992, a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares ajustada para a idade, diminuiu 33,6% em homens e 40,6% em mulheres. Apesar deste fato, as taxas de mortalidade cumulativa por doença cardiovascular para pessoas entre 45 e 64 anos de idade em São Paulo, Curitiba, Porto Alegre e Rio de Janeiro são mais elevadas que no Reino Unido e quase tão elevadas como na Europa do Leste. A morte por infarto agudo do miocárdio em homens de 35 a 44 anos de idade em todo o Brasil é três vezes maior que nos Estados Unidos e Canadá (4).

Estes fatos demonstram que um melhor entendimento da fisiopatologia das síndromes coronarianas agudas pode contribuir para prevenção e tratamento mais efetivos destes graves eventos.

## 1.2- Fatores de risco

Os fatores de risco para aterosclerose têm sido identificados em estudos epidemiológicos que relacionam sua presença com a incidência da doença clinicamente manifesta (5). Entre os fatores de risco modificáveis os mais consistentemente associados ao aumento da incidência da doença aterosclerótica coronariana e de suas seqüelas são hiperlipidemia, hipertensão arterial sistêmica, hábito de fumar e diabete melito (6). Idade, sexo e história familiar estão entre os principais fatores de risco não modificáveis associados à cardiopatia isquêmica (7).

Os lipídios da dieta são considerados como um dos mais importantes agentes ambientais da aterosclerose. No entanto, a contribuição específica do colesterol, gorduras saturadas, gorduras polinsaturadas e triglicerídios totais na aterosclerose ainda não está totalmente esclarecida. Estudos recentes têm demonstrado associação entre os níveis plasmáticos de colesterol e a incidência e prevalência de doença das artérias coronárias em determinadas populações (8, 9). Além disso, a redução do colesterol através da modificação de hábitos alimentares ou através de medicamentos, têm trazido resultados positivos na redução da aterosclerose e suas seqüelas em alguns estudos (10, 11). No entanto, a grande variação individual entre a ingesta de gorduras na dieta, o colesterol plasmático e as manifestações clínicas relacionadas iguais concentrações plasmáticas de colesterol, sugerem que o colesterol da dieta afete a incidência da aterosclerose não apenas pelo seu valor absoluto, mas também por alteração do perfil das lipoproteínas plasmáticas e, possivelmente, pela alteração estrutural ou funcional destas lipoproteínas (12).

O aumento do colesterol na dieta geralmente resulta no aumento da concentração plasmática da lipoproteína de baixa densidade (LDL) com uma menor elevação da



lipoproteína de alta densidade (HDL) (13). Embora o papel destas duas lipoproteínas na aterogênese não seja completamente entendido, a elevação da HDL parece ser protetora, enquanto a elevação da LDL parece ser adversa. As modificações estruturais e bioquímicas da LDL, principalmente por sua oxidação, parecem desempenhar um papel fundamental no potencial aterogênico desta partícula (12). A forma pela qual estas alterações no metabolismo das gorduras afeta o desenvolvimento da aterosclerose a nível celular e molecular permanece apenas parcialmente elucidada. O aumento da concentração plasmática da molécula de adesão da célula vascular tipo 1 (VCAM-1) em pacientes dislipidêmicos e a indução da expressão desta molécula nas células endoteliais em modelos experimentais de dislipidemia têm sido identificado como um dos possíveis mecanismos pelos quais as lipoproteínas participam da formação das lesões ateroscleróticas (14).

A influência da elevação dos níveis pressóricos sobre a formação da lesão aterosclerótica é pouco entendida. A hipertrofia das células musculares lisas da média e a hiperplasia intimal ocorrem em modelos animais de hipertensão experimentalmente induzida e em artérias de indivíduos com hipertensão, sugerindo uma interrelação entre os mecanismos que induzem a proliferação muscular lisa e a contração muscular lisa (15). Neste sentido, angiotensina II, fenilefrina, serotonina e endotelina I, elementos presentes na hipertensão arterial sistêmica, parecem ser capazes de estimular a proliferação de células musculares lisas (12). Estudos multicêntricos de redução farmacológica da pressão arterial sistêmica evidenciaram uma redução de 21% na mortalidade para todas as causas vasculares e de 14% no grupo de pacientes randomizado para uso de medicamentos (diuréticos e beta bloqueadores) (16). No entanto, esta redução de 14% em relação à cardiopatia isquêmica não é o resultado esperado a partir das projeções da associação de risco entre hipertensão arterial sistêmica e cardiopatia isquêmica. Este fato têm sido atribuído, pelo menos em parte, aos efeitos adversos das drogas utilizadas para tratamento da hipertensão arterial sistêmica sobre a tolerância à glicose, nível plasmático de lipídios e resistência à insulina (17).

O diabetes melito tem sua associação com o aumento da incidência da aterosclerose bem estabelecida (18). No entanto, existe pouca informação sobre a base celular das alterações que ocorrem no diabetes e as interações responsáveis pela formação da lesão aterosclerótica. Estudos desenvolvidos por Guillausseau e colaboradores, demonstraram que plaquetas de pacientes diabéticos liberam maior quantidade de fator de crescimento derivado de plaquetas do que as plaquetas de indivíduos não diabéticos (19). Além deste fato, os produtos de glicosilação avançada que acumulam-se nos tecidos de pacientes diabéticos podem ser responsáveis por alterações celulares que induzem aterogênese. Estudos experimentais demonstraram que tais produtos podem, por exemplo, ser quimiotáticos para monócitos *in vitro* (20). Além disso, a hiperinsulinemia, achado comum em pacientes diabéticos, pode potencializar, pelo menos *in vitro*, o efeito proliferativo dos fatores de crescimento e estimular a captação da LDL pelas células musculares lisas, bem como, aumentar a síntese de colesterol (21). Talvez a relativa falta de dados mais concretos sobre a associação entre doença aterosclerótica e diabetes seja devida, pelo menos em parte, à dificuldade em se desenvolver modelos experimentais de diabetes melito adequados para o estudo da aterosclerose.

O hábito de fumar está epidemiologicamente associado ao aumento da incidência de aterosclerose (5). No entanto, os eventos celulares e moleculares associados ao uso de cigarros são ainda essencialmente desconhecidos. O aumento dos radicais livres de oxigênio no plasma, a diminuição do nível sérico da LDH e alterações dos fatores de coagulação em fumantes, têm sido propostos como possíveis estimuladores da formação de lesões ateroscleróticas nestes indivíduos (22). Como no diabetes, não existe um modelo animal satisfatório para o estudo desta associação.

Embora a forma pela qual os fatores de risco promovam a formação da lesão aterosclerótica ainda não esteja completamente elucidada, estudos recentes demonstrando disfunção endotelial associada à dislipidemia, diabetes melito, hipertensão arterial sistêmica

e hábito de fumar, sugerem que a disfunção endotelial possa constituir-se em evento inicial comum a estes fatores de risco em relação à gênese da aterosclerose (15, 20, 23, 24).

### **1.3- Classificação clínica da doença aterosclerótica coronariana**

O espectro clínico da doença aterosclerótica das artérias coronárias é abrangente, envolvendo desde quadros com sintomas indefinidos ou ausentes, até quadros com sintomas pronunciados e agudos. Estas manifestações clínicas são tardias em relação ao início da doença, que evolui silenciosamente por décadas (6). Entre estes quadros clínicos, são de particular interesse a angina estável e as síndromes coronarianas agudas representadas pela angina instável, infarto agudo do miocárdio e morte súbita.

A angina estável tem sido classicamente caracterizada pela presença de dor ou desconforto no tórax e áreas adjacentes, causada por isquemia miocárdica e associada a distúrbio da função miocárdica, porém sem necrose do miocárdio (25). O limiar e a duração da dor são geralmente previsíveis. Estímulos que aumentem a demanda de oxigênio para o miocárdio, tais como exercício ou estresse emocional, tipicamente induzem o sintoma. No entanto, outros mecanismos podem contribuir para indução de isquemia na angina estável, tais como vasoconstrição e trombose sobrepostas à lesão coronariana (26). Além disso, episódios de isquemia assintomáticos em pacientes com angina clinicamente estável, têm sido descritos durante monitorização destes pacientes com eletrocardiograma ambulatorial (27).

A angina instável compreende uma variedade de apresentações clínicas associadas a graves episódios de isquemia miocárdica com potencial evolução para necrose do músculo cardíaco. Estes episódios são causados por obstrução do fluxo coronário produzida por diferentes mecanismos fisiopatológicos, incluindo ruptura de uma placa coronariana ateromatosa, agregação plaquetária, formação de trombo e aumento do tônus vasomotor (28, 29). Para categorizar a população heterogênea de pacientes com angina instável, Braunwald propôs uma classificação baseada na gravidade da apresentação clínica, nas

circunstâncias nas quais a angina instável ocorre e pela presença ou ausência de alterações eletrocardiográficas transitórias concomitantes (30). A classe I é chamada angina de recente começo, grave ou acelerada. Compreende pacientes com angina há menos de dois meses, intensa ou ocorrendo três ou mais vezes por dia ou angina que é distintamente mais freqüente e precipitada por menor esforço. Nesta classe, nenhum episódio de dor em repouso poderá ter ocorrido nos últimos dois meses. A classe II corresponde a angina em repouso ou subaguda. Compreende pacientes com um ou mais episódios de dor em repouso durante o mês precedente, porém não dentro das 48 horas precedentes. A classe III é a angina em repouso ou aguda que é caracterizada por um ou mais episódios de dor em repouso nas 48 horas precedentes.

As circunstâncias clínicas nas quais ocorre a angina também se dividem em três classes. A classe A é caracterizada pela presença de uma condição extrínseca ao leito vascular coronário que intensifica a isquemia miocárdica, como por exemplo: anemia, infecção, taquicardia. A classe B é caracterizada por angina instável primária. A classe C é caracterizada por angina pós-infarto agudo do miocárdio (ocorrendo dentro de duas semanas após infarto documentado).

A classificação proposta por Braunwald é largamente utilizada na prática médica e tem demonstrado ser um instrumento apropriado para estratificação de risco e prognóstico para as síndromes coronarianas agudas (31). No entanto, a angina instável é um estado dinâmico, intermediário entre a angina estável e o infarto agudo do miocárdio e, nem sempre, a classificação clínica tem sido suficiente para distinguir estes estados (32, 33).

O infarto agudo do miocárdio representa o estágio de evolução da doença aterosclerótica das artérias coronárias no qual a interrupção do fluxo sangüíneo é suficiente para causar necrose do músculo cardíaco. As manifestações clínicas são variáveis, porém geralmente ocorre dor torácica prolongada (mais de uma hora de duração), intensa, acompanhada de mal estar geral, náuseas, vômitos e sudorese. O eletrocardiograma apresenta alterações agudas que refletem a necrose em evolução. O músculo cardíaco em

sofrimento libera enzimas na circulação e a elevação do nível sérico da fração MB da creatina fosfoquinase é característica (34). Os mecanismos celulares responsáveis pelo infarto agudo do miocárdio e pela angina instável, são provavelmente os mesmos (2). Os achados patológicos de ruptura da placa coronariana e trombo mural são características centrais de ambas as síndromes. A angina instável geralmente precede o infarto agudo do miocárdio, favorecendo as evidências de similaridade de eventos celulares e patológicos destas duas manifestações (35, 36).

A morte súbita cardíaca é definida como morte de causa cardíaca caracterizada por perda súbita da consciência, ocorrendo dentro de 1 hora após o início dos sintomas agudos, em uma pessoa com ou sem história conhecida de doença cardíaca, porém para a qual o tempo e o modo de morte são inesperados (37). O extenso comprometimento aterosclerótico das artérias coronárias é o achado patológico mais comum em vítimas de morte súbita cardíaca, sugerindo que os mesmos mecanismos que levam a angina instável e infarto agudo do miocárdio estejam envolvidos na fisiopatologia da morte súbita cardíaca associada à aterosclerose coronariana (38).

A presença de isquemia miocárdica não associada a sintomas, ocorrendo em pacientes com doença aterosclerótica coronariana de qualquer classe clínica e relacionada a prognóstico adverso, têm sido demonstrada em estudos de monitorização eletrocardiográfica ambulatorial (39, 40). Interessantemente, os achados de isquemia silenciosa presentes nestes pacientes sugerem que a distinção clínica entre pacientes com doença das artérias coronárias biologicamente estável e pacientes com doença instável é, freqüentemente, pouco confiável quando baseado exclusivamente em sintomas. Existe um subgrupo de pacientes que, embora aparentemente estáveis, apresentam relativamente alto risco para um prognóstico adverso possivelmente porque sua doença coronariana é biologicamente instável (27).

## 2- Aterosclerose

A aterosclerose é um processo complexo, focal, que envolve a íntima das artérias de grande e médio calibre afetando sítios preferenciais da árvore arterial (6). A evolução lenta e progressiva desta doença que inicia geralmente na infância manifestando-se clinicamente na vida adulta, dificulta o esclarecimento de sua patogênia e etiologia (41).

Nas últimas décadas estudos baseados em biologia molecular e celular, bem como o desenvolvimento de novas técnicas para avaliação de alterações metabólicas, têm acrescentado importantes contribuições para o entendimento da aterosclerose e suas conseqüências (42).

### 2.1- Morfologia da lesão aterosclerótica

As lesões vasculares que precedem e, provavelmente, dão início à lesão aterosclerótica avançada, foram descritas e classificadas por Stary e colaboradores (43). Segundo estes autores, a íntima arterial sofre espessamento adaptando-se a uma série de estímulos, principalmente a alterações hemodinâmicas. Embora estas alterações da íntima não sejam consideradas um processo patológico (24, 44), as regiões da íntima com espessamento adaptativo diferem funcionalmente da íntima adjacente, apresentando maior renovação de células endoteliais e musculares lisas e concentração aumentada da LDL e de outros componentes plasmáticos (23, 45, 46). Uma vez que, as lesões ateroscleróticas tendem a se desenvolver nos mesmos locais da vasculatura onde ocorre o espessamento adaptativo, Stary e colaboradores sugerem que o espessamento seja um marcador de locais propensos a formação de lesões ateroscleróticas em resposta a um determinado estímulo. Nestes locais propensos à aterosclerose surgem as lesões precursoras da lesão avançada, que são divididas em três tipos morfológicos segundo a classificação proposta por estes investigadores (43).

A lesão tipo I consiste de pequenos depósitos de lipídios na íntima identificados apenas através de microscopia ótica ou das reações químicas e celulares associadas a sua

presença (12). Os monócitos circulantes que penetram a parede do vaso e englobam os lipídios de forma anômala, dão origem às células espumosas (47). As células espumosas derivadas de monócitos são um dos principais constituintes da lesão aterosclerótica e participam ativamente da gênese da lesão (48).

A lesão tipo II é também chamada de estria gordurosa pelo seu aspecto macroscópico de estrias ou pontos amarelados visualizados na parede vascular. Estas estrias consistem predominantemente de células espumosas derivadas de macrófagos organizadas em linhas adjacentes. No entanto, algumas células espumosas são derivadas de células musculares lisas presentes na íntima (43, 48). Além das células espumosas, também são encontrados neste tipo de lesão numerosos macrófagos e linfócitos T (49) e, no espaço extra-celular, lipídios dispersos em gotas ou vesículas de tamanho variado, compostos de ésteres de colesterol, colesterol e fosfolipídios (50). As estrias gordurosas são as lesões vasculares mais consistentemente associadas a uma provável evolução para a lesão ateromatosa avançada (50, 51, 52). Esta evolução possivelmente ocorre pela proliferação de macrófagos, células musculares lisas e linfócitos e também pelo aumento de matriz extra-celular induzido por estas células (6, 44, 50, 53).

A lesão tipo III representa um estágio de transição entre a estria gordurosa e a placa ateromatosa. A lesão avançada da aterosclerose é o ateroma ou placa fibrosa. Esta é a lesão que causa o estreitamento arterial, predispõe a trombose, calcifica-se e leva a alteração muscular e dilatação aneurismática do vaso afetado, produzindo os sintomas e o quadro clínico da doença aterosclerótica (54). Embora as placas apresentem alguma variabilidade histológica, sua composição básica consiste em uma capa fibrosa de células musculares lisas, alguns leucócitos e tecido conjuntivo denso contendo elastina, colágeno, proteoglicanos e membrana basal (6, 55). Esta capa fibrosa envolve um núcleo formado por quantidade variável de cristais de colesterol, lipídios extra celulares, cálcio e numerosas células espumosas (54). As células musculares lisas estão presentes na íntima e assumem um fenótipo secretor, referido como estado modulado, estando implicadas em diversas fases

da aterogênese e progressão da lesão (12, 49, 56). A camada média adjacente à capa fibrosa é, freqüentemente, atrófica e fina (55). A área celular abaixo e ao lado da capa fibrosa consiste em uma mistura de macrófagos, células musculares lisas e linfócitos T (57). Os linfócitos T e os macrófagos acumulam-se principalmente nos cotovelos da placa, que têm sido identificados como os sítios mais suscetíveis de ruptura da lesão (58, 59).

## 2.2- Patogênese da Aterosclerose

A aterogênese envolve uma cascata complexa de interações entre fatores ambientais e genéticos: as células da parede vascular, principalmente endotélio e células musculares lisas; elementos do sangue, particularmente monócitos, linfócitos e plaquetas; proteínas plasmáticas, incluindo a LDL; elementos fibrilares e não fibrilares do tecido conjuntivo da íntima arterial; citocinas; e fatores mecânicos que regulam o fluxo arterial (60).

No século XIX surgiram duas importantes hipóteses com a intenção de explicar a patogênese da aterosclerose: a hipótese da incrustação e a hipótese dos lipídios. A hipótese da incrustação foi formulada por von Rokitansky em 1852 e sugeria que o espessamento da íntima fosse resultado da deposição de fibrina na parede do vaso com subsequente organização por fibroblastos e acúmulo de lipídios (36). Em 1856, Virchow formulou a hipótese dos lipídios, sugerindo que a alteração primária da aterosclerose fosse o acúmulo de lipídios na parede do vaso, ocorrendo como consequência do predomínio de mecanismos de deposição sobre mecanismos de remoção destes lipídios da parede vascular. Os lipídios depositados desencadeariam reações teciduais que resultariam na aterosclerose (61). Estas hipóteses foram sendo reformuladas ao longo dos anos e evidências favorecendo ambas levaram Ross e Glomset a formular o conceito atual de “resposta à agressão”, sugerindo que a aterosclerose represente uma forma especializada de resposta protetora, inflamatório-proliferativa da parede vascular a agressões diversas (62).



### 2.2.1- Papel do endotélio na aterogênese

O endotélio normal é constituído por uma linha de monocélulas orientadas longitudinalmente na direção do fluxo laminar. Estas células formam uma superfície permeável, não trombogênica, não aderente, que interage ativamente com os elementos do sangue e da parede vascular, sintetizando e metabolizando moléculas biologicamente ativas (63).

A disfunção do endotélio parece ser o primeiro evento na formação da lesão aterosclerótica (23, 24, 64). As células endoteliais alteram sua forma e orientação em resposta a modificações na qualidade do fluxo sanguíneo e ao fluxo turbulento presentes nas regiões vasculares propensas à aterosclerose. As principais conseqüências destas alterações são um aumento da permeabilidade às proteínas plasmáticas, especialmente à LDL, e um aumento da renovação das células endoteliais propiciando a descamação do endotélio e expondo a superfície subendotelial aos elementos da circulação, favorecendo a trombogênese (44, 60). O fluxo circulatório anormal também aumenta o contato das células endoteliais com monócitos e linfócitos circulantes (55). Alterações do fluxo também têm sido descritas como capazes de promover a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, favorecendo a interação com leucócitos circulantes (65).

O endotélio disfuncionado perde a resposta vasodilatadora normal a vários estímulos, passando a apresentar uma tendência à vasoconstrição, devido à perda da capacidade dilatadora dependente do fator de relaxamento do endotélio vascular (óxido nítrico) (24). A vasoconstrição têm sido associada a um aumento da adesão de neutrófilos e monócitos às células endoteliais, possivelmente pelo aumento do contato entre estes elementos (66, 67, 68). Além disto, o endotélio disfuncionado ou ativado expressa moléculas que permitem a adesão de monócitos, linfócitos, plaquetas e neutrófilos a sua superfície (69, 70). A adesão de monócitos ao endotélio precede a migração destas células para a parede vascular, sendo considerada um dos principais eventos iniciais na gênese da

aterosclerose (23). A expressão de moléculas de adesão, tanto pelo endotélio como por monócitos e linfócitos, constitui um marcador do estado ativado destas células (71).

A dislipidemia têm sido associada a indução de alterações nas propriedades do endotélio em modelos animais, sugerindo este como um dos possíveis mecanismos pelos quais os lipídios atuam na aterogênese (23, 72). Recentemente, Hackman e colaboradores demonstraram um aumento da concentração sérica da VCAM-1 associada a hipertrigliceridemia, sugerindo uma evidência *in vivo* da disfunção endotelial provocada pela dislipidemia (14).

Alterações isquêmicas relacionadas à vasoregulação coronariana têm demonstrado associação com disfunção endotelial, principalmente pela indução de moléculas de adesão na superfície do endotélio e pela liberação de substâncias vasoativas (73). A liberação de radicais livres de oxigênio à partir do endotélio vascular pode ser induzida por alterações de fluxo conforme já sugerido em estudos com animais (74). Estes radicais, por sua vez, podem influenciar o tônus vascular e, talvez, promover a ativação plaquetária (75). Além disso, Ciuffetti e colaboradores demonstraram que a isquemia induzida por exercício pode estar associada à interação de leucócitos com o endotélio (76).

### **2.2.2- Papel das moléculas de adesão na aterogênese**

A adesão de leucócitos e plaquetas circulantes ao endotélio vascular é um componente essencial de vários eventos agudos e crônicos no processo de doença das artérias coronárias, incluindo aterosclerose, reestenose após angioplastia coronariana transluminal precutânea, lesão de reperfusão e vasculopatia do transplante cardíaco. As moléculas da adesão, representadas pelas famílias das integrinas, selectinas e super-família das imunoglobulinas, intermediam cada passo da ligação de células com outras células e de células com a matriz extra-celular tanto no estado fisiológico como nestes processos de doença (77).

Na gênese da aterosclerose, o envolvimento de moléculas da super-família das imunoglobulinas, principalmente da VCAM-1 e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), na ligação de leucócitos mononucleados ao endotélio e na migração de células no espaço subendotelial, tem sido investigado (78).

A VCAM-1 é uma molécula induzível, apesar de inespecífica, não estando expressa no endotélio em seu estado basal, enquanto a ICAM-1 tem uma expressão basal significativa e variável nas células endoteliais (79). Enquanto a VCAM-1 parece estar mais associada à adesão de leucócitos à célula endotelial, a ICAM-1 parece estar mais envolvida na migração destas células através do endotélio (80). A interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) aumentam a expressão destas moléculas de adesão no endotélio, amplificando a resposta inflamatória (81).

Na placa aterosclerótica, a VCAM-1 foi identificada em células endoteliais, células musculares lisas e monócitos, estando associada ao estado ativado destas células (82). O aumento da expressão da ICAM-1 e E-selectina (E indica endotélio) foi observado no endotélio arterial, especialmente nas regiões da íntima infiltradas por linfócitos e macrófagos (83). *In vivo*, em estudos com modelo experimental de dislipidemia, o aumento da concentração plasmática de lipídios está associado a uma rápida indução da VCAM-1 no endotélio vascular, sugerindo seja este um dos mecanismos iniciais de alteração do endotélio na gênese da aterosclerose (72). A indução da VCAM-1 e da ICAM-1 por alterações do fluxo também foram demonstradas (65). Finalmente, recentemente, Hackman e colaboradores demonstraram o aumento da concentração plasmática da VCAM-1 em pacientes com hipertrigliceridemia, quando comparados a controles normais (14).

### **2.2.3- Papel dos monócitos, linfócitos e células musculares lisas na aterogênese**

Os monócitos participam intensamente na formação da lesão aterosclerótica. Gerrity e colaboradores, utilizando animais submetidos a dietas com alto conteúdo de lipídios, demonstraram a aderência de monócitos ao endotélio luminal e sua migração entre as

células endoteliais (47). Estes eventos também estão presentes nas lesões ateroscleróticas humanas, como demonstrado por Davies e colaboradores (44). Após migrarem para o espaço subendotelial os monócitos se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos ativados removem a LDL oxidada através de seus receptores de varredura, secretam citocinas, mitógenos e radicais livres de oxigênio, estimulam a angiogênese e são quimiotáticos para células musculares lisas, linfócitos e monócitos circulantes, amplificando e mantendo a evolução da aterosclerose (23, 60, 84, 85). Os macrófagos também são capazes da síntese e secreção de substâncias que degradam a matriz extracelular, estando possivelmente implicados no processo final de ruptura da placa coronariana (42).

Os linfócitos T foram identificados em todos os estágios de formação da lesão aterosclerótica (48, 49, 54, 57). No entanto, a simples presença de linfócitos T na lesão aterosclerótica pode não significar uma relação de causa/efeito entre o sistema imunológico e a gênese da lesão. Os linfócitos T encontrados em lesões ateroscleróticas podem estar inertes nestes locais, sendo necessário demonstrar sua participação ativa no processo de aterosclerose. Neste sentido, alguns autores têm tentado demonstrar o estado ativado dos linfócitos T na lesão aterosclerótica, através da expressão de receptores para interleucina 2 (IL-2R) nestas células e através da expressão do antígeno do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II em sua superfície e em células adjacentes (86, 87). Além disso, o único indutor conhecido da expressão do MHC classe II na superfície de monócitos e células musculares lisas é a linfocina imune interferon gama que é produzida por linfócitos T ativados (56). Além disso, os linfócitos T também secretam substâncias quimiotáticas para monócitos e células musculares lisas e regulam a captação de lipoproteínas por macrófagos, sendo estes alguns dos possíveis mecanismos de atuação dos linfócitos T na formação da placa aterosclerótica (85, 88).

As células musculares lisas presentes na íntima da parede vascular são um dos principais componentes celulares da lesão aterosclerótica. As células musculares lisas habitualmente estão presentes em número reduzido na íntima normal, porém, durante o

processo de formação da lesão aterosclerótica, estas células migram da camada média para a íntima e proliferam em resposta a diversos estímulos (6). A migração de células musculares lisas para o espaço subintimal parece ser mediada principalmente pela ação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), enquanto a proliferação destas células parece ser mediada principalmente pelo fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (54). Estes fatores de crescimento são produzidos por vários componentes da lesão aterosclerótica, incluindo monócitos/macrófagos, plaquetas e células endoteliais (2). As células musculares lisas ao migrarem da camada média para a íntima assumem um fenótipo predominantemente secretor e passam a produzir elementos da matriz extracelular, formando o componente fibrótico da placa (54).

Embora parte das interações complexas entre endotélio, monócitos/macrófagos, linfócitos T e células musculares lisas sejam conhecidas, a real contribuição de cada um destes elementos na aterogênese ainda não está inteiramente determinado.

#### **2.2.4- Lipídios e aterogênese**

Atualmente não existem muitas dúvidas sobre o potencial aterogênico da elevação plasmática da LDL. Estudos populacionais tem estabelecido a elevação sérica da LDL como um dos principais fatores de risco para aterosclerose (5), enquanto a redução terapêutica da LDL tem sido associada a uma diminuição dos eventos coronarianos em grupos suscetíveis (10, 11, 89). No entanto, os mecanismos pelos quais a elevação da LDL induz a aterosclerose permanecem parcialmente obscuros. A modificação da LDL, principalmente por mecanismos oxidativos, parece ser um evento importante neste processo (23, 55). A LDL oxidada possui propriedades aterogênicas tais como ser quimiotóxica para monócitos, aumentar a captação de lipídios por macrófagos, ser citotóxica, estimular a imunogenicidade, alterar a expressão genética de células vizinhas e modificar as vias da coagulação (90, 91). Além disso, a LDL oxidada pode induzir a expressão de moléculas de

adesão na superfície endotelial e em monócitos, linfócitos e neutrófilos, promovendo a interação entre estas células (92, 93)

As células endoteliais, monócitos/macrófagos e células musculares lisas presentes no ateroma, são capazes de promover a oxidação da LDL, estabelecendo um mecanismo de amplificação da lesão aterosclerótica (90). A hipótese de que a modificação oxidativa da LDL possa contribuir para a progressão da aterosclerose é sustentada por evidências *in vitro* e por estudos em modelos animais de aterosclerose (94, 95). Neste sentido, o efeito de antioxidantes (por exemplo beta-caroteno, vitamina E, probucol) na evolução da aterosclerose têm sido avaliado em diversos estudos "*in vivo*". Embora os antioxidantes estejam associados à inibição da formação das lesões precursoras da aterosclerose em animais, seu papel na progressão/redução das lesões ateroscleróticas humanas permanece indefinido (96).

#### 2.2.5- Citocinas e aterogênese

As citocinas são proteínas solúveis produzidas por linfócitos, monócitos/macrófagos, fibroblastos, endotélio e outras células, com a finalidade de estabelecer a comunicação entre estes elementos (97, 98). As citocinas exercem sua função através da ligação com receptores específicos na superfície celular (98) e apresentam como principais características o pleiotrofismo (cada citocina tem múltiplas funções biológicas) e a redundância (mais de uma citocina exercendo a mesma função) (99). Na última década, muito tem sido estudado sobre a ação das citocinas no sistema cardiovascular e seu papel na gênese da aterosclerose. Todos os elementos celulares envolvidos na aterosclerose são passíveis de produzir citocinas, induzir a produção de citocinas ou serem afetados pela ação de citocinas. As citocinas com papel melhor esclarecido na aterogênese são o TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  e as interleucinas 1 e 2 (IL-1, IL-2) (56, 99, 100).

A IL-1 é classicamente caracterizada como um produto de macrófagos ativados, no entanto outros tipos celulares incluindo fibroblastos, células endoteliais e células

musculares lisas também produzem esta citocina (101). Na lesão aterosclerótica, a IL-1 tem sido identificada em macrófagos, células espumosas derivadas de macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas (102). A ativação de linfócitos T é provavelmente a principal característica da IL-1. Os linfócitos T aumentam sua proliferação e expressam receptores para IL-2 em resposta à estimulação pela IL-1 (103). Uma vez que os linfócitos T estão presentes na lesão aterosclerótica coronariana e, provavelmente, participam ativamente da formação e progressão desta lesão, a IL-1 intermedia a ação destas células no processo de aterogênese. A IL-1 exerce múltiplos e complexos efeitos sobre as células musculares lisas, sendo um dos principais, sua capacidade de estimular a proliferação destas células e a síntese de matriz extracelular (104, 105, 106). Este efeito pode ser indiretamente mediado pela expressão do gene autócrino do PDGF pelas células musculares lisas (54). Outro efeito da IL-1 sobre as células musculares lisas é a indução da síntese de IL-6, IL-8 e proteína quimiotática para monócitos por estas células (99). A IL-1 também atua mediando a interação entre as células endoteliais, plaquetas e os sistemas de coagulação e fibrinolítico e aumentando a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos e no endotélio (56). Várias das ações da IL-1 são exercidas através da co-estimulação desta interleucina com o TNF- $\alpha$  e pela atuação conjunta destas citocinas (103, 106).

O TNF- $\alpha$ , também chamado caquexina, é, primariamente, um produto de macrófagos ativados, mas também pode ser produzido por células musculares lisas, células matadoras naturais, linfócitos T ativados e mastócitos. O TNF- $\alpha$  têm sido identificado em placas coronarianas e em espécimes de aterectomia de pacientes com doença aterosclerótica das artérias coronárias e em associação com a vasculopatia do transplante cardíaco (107, 108, 109). O papel desta citocina na gênese e progressão da aterosclerose coronariana ainda não está bem definido, no entanto, várias ações do TNF- $\alpha$  em outros sistemas orgânicos têm sido demonstradas em associação com a cardiopatia isquêmica sugerindo possíveis participações do TNF- $\alpha$  neste contexto. Por exemplo, o TNF- $\alpha$  modifica as propriedades anticoagulantes do endotélio, ativa neutrófilos e induz a liberação de outras citocinas

inflamatórias (110). Além disto, o TNF- $\alpha$  pode participar do metabolismo lipídico inibindo a produção da lipoproteína lipase e é capaz de interagir com linfócitos induzindo a expressão de receptores para IL-2 nestas células e aumentando sua responsividade (99, 111). O TNF- $\alpha$  também atua sobre o endotélio produzindo um impedimento da resposta vasodilatadora dependente do endotélio, aumentando a adesão de monócitos e linfócitos circulantes ao endotélio e estimulando a síntese de PDGF pelas células endoteliais (54, 112). A produção e a inibição das metaloproteinases pelos fibroblastos é regulada pelo TNF- $\alpha$ , aumentando a degradação de componentes da matriz extracelular (113). Finalmente, o bloqueio do TNF- $\alpha$  em coelhos submetidos a transplante cardíaco heterotópico foi capaz de inibir a formação neointimal, sugerindo um componente de resposta imunoinflamatória celular associada a um aumento da fibronectina induzido por TNF- $\alpha$  ocorrendo neste contexto (108).

O IFN- $\gamma$  é o principal produto de linfócitos T ativados e é um potente inibidor da proliferação do endotélio e das células musculares lisas (86). Esta citocina foi inicialmente reconhecida por seus efeitos antivirais e posteriormente como um potente regulador do sistema imunológico. Os efeitos biológicos do IFN- $\gamma$  incluem além da inibição da proliferação celular, a indução da expressão do MHC classe II e a ativação de macrófagos (99). A produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos T cronicamente ativados no ateroma humano foi demonstrada por Hansson e colaboradores (114). Uma vez que esta citocina reduz a síntese de colágeno e que linfócitos T ativados estão presentes nas regiões de ruptura da placa coronariana, Libby e colaboradores sugerem que este seja um provável mecanismo pelo qual ocorre uma redução da manutenção da rede de colágeno nas placas vulneráveis (42).

A IL-2 é uma glicoproteína liberada por linfócitos T, cuja ação está associada à expressão de receptores para IL-2 na superfície celular. Células T em repouso não expressam o receptor para IL-2 requerido para a transmissão de sinal proliferativo (101). A IL-2 é reconhecida principalmente pela sua propriedade de promover a proliferação de linfócitos T, estando a quantidade de IL-2 produzida pelas células CD4<sup>+</sup> associada à



magnitude da resposta imune induzida pelo antígeno (98). A detecção de receptores para IL-2 têm sido utilizada como marcador do estado ativado de linfócitos T na lesão aterosclerótica (56).

### **3- Instabilização da Placa Aterosclerótica**

A lenta evolução do processo aterosclerótico é caracterizada por episódios súbitos de progressão acelerada e de instabilização, responsáveis pelas síndromes coronarianas agudas e pela progressão da doença (36). A ruptura da placa aterosclerótica com trombose sobreposta é responsável pela maioria destes episódios (35, 115, 116). Estudos de autópsia têm identificado a associação entre placas fissuradas ou ulceradas e a formação de trombo com isquemia do território distal (117, 118). Por outro lado, estudos angiográficos da era pós-trombolíticos têm demonstrado que a lesão responsável pela instabilização aguda da cardiopatia isquêmica ocupa, geralmente, menos de 70% do diâmetro do vaso, sugerindo que a evolução da lesão até a oclusão crítica do vaso não é o principal mecanismo da instabilização (119, 120, 121). Feyter e colaboradores, em estudo utilizando angioscopia e ultrassom intracoronário, identificaram que ruptura da placa e trombose estavam presentes em 17% dos pacientes com angina estável estudados e em 68% dos pacientes com angina instável (122).

#### **3.1- Placa vulnerável**

Estudos patológicos recentes têm revelado que as placas ateroscleróticas propensas a romper são comumente compostas de uma massa de lipídios separada da luz vascular por uma capa fibrosa (118). Estas placas são relativamente moles e apresentam alta concentração de colesterol e seus ésteres. O adelgaçamento da capa fibrosa que cobre a massa de lipídios, provavelmente antecede a ruptura da placa. As placas propensas a ruptura possuem um núcleo de lipídios posicionado excêntricamente no seu interior (116). Hodgson e colaboradores, utilizando ultrassom intracoronário para análise morfológica de lesões

relacionadas a isquemia em pacientes com angina instável e com angina estável, confirmam alguns destes achados. Estes autores demonstraram que as lesões de pacientes com angina instável são menos ecorreflexivas e apresentam significativamente menos cálcio que lesões de pacientes com angina estável (123). Por outro lado, Feyter e colaboradores, também utilizando ultrassom intracoronário, demonstraram que este método não foi capaz de discriminar entre placas de pacientes com angina estável e placas de pacientes com angina instável (122). No entanto, estudos com técnicas de imagem de alta resolução, tais como ressonância magnética têm conseguido detectar placas com alto conteúdo de lipídios em associação com síndromes coronarianas agudas (124).

Estudos analisando placas ateroscleróticas coronarianas obtidas em aterectomia demonstram que as placas de pacientes com síndromes coronarianas agudas apresentam significativamente maior infiltração de macrófagos que placas de pacientes com angina estável (125). Além disso, Wal e colaboradores estudando as lesões coronarianas de pacientes que foram ao óbito por infarto agudo do miocárdio, encontraram que o sítio de ruptura das placas coronarianas era sempre infiltrado por grande número de macrófagos e linfócitos T, estando quase ausentes as células musculares lisas (59).

O risco de ruptura da placa ateromatosa além da relação com as suas propriedades intrínsecas descritas acima (vulnerabilidade), também se relacionam com forças extrínsecas agindo sobre a placa (gatilhos da ruptura) (116). O conceito prevalecente é de que em determinado momento de sua evolução as placas ateromatosas ricas em lipídios desenvolvem ruptura de sua superfície e que forças hemodinâmicas precipitam este evento (126). No entanto, os mecanismos responsáveis pela ruptura da placa ainda não são inteiramente entendidos, e é possível que mecanismos inflamatórios participem deste processo.

### **3.2- Papel da inflamação na instabilização da placa coronariana**

O conceito da existência de um componente inflamatório envolvido na gênese da aterosclerose é atualmente bem estabelecido (6, 55, 56). Este fato tem levado muitos autores a investigar a possibilidade de que a agudização do processo inflamatório crônico existente na placa coronariana possa ser responsável, pelo menos em parte, pela ruptura da placa.

Alguns estudos evidenciando processo inflamatório agudo sistêmico associado a síndromes coronarianas agudas sugerem esta hipótese, porém, ainda persistem várias lacunas no entendimento destas alterações. Carry e colaboradores demonstraram o aumento da excreção urinária e da concentração plasmática de leucotrienos em pacientes com infarto agudo do miocárdio e angina instável em relação aos valores observados no terceiro dia de evolução destes quadros. Os leucotrienos são potentes mediadores inflamatórios gerados pela ação da 5-lipoxigenase e o aumento de sua excreção durante episódios clínicos de isquemia do miocárdio sugere a ativação da 5-lipoxigenase nestas circunstâncias (127). Cabe ressaltar que, em tal estudo, não havia pacientes com cardiopatia isquêmica estável com a finalidade de comparação. Berk e colaboradores, também estudando a associação entre marcadores inflamatórios sistêmicos e instabilização da angina, encontraram elevação plasmática significativa da proteína C reativa, um reagente de fase aguda da inflamação que reflete a produção hepática estimulada por citocinas, em pacientes com angina instável em relação a pacientes com angina estável e em relação a controles sem doença cardíaca isquêmica (128). Liuzzo e colaboradores confirmam este achado e acrescentam que outro reagente de fase aguda da inflamação, o amiloide A, também apresenta as mesmas características (129). Estes autores também relataram um pior prognóstico da angina instável e do infarto agudo do miocárdio relacionado a elevação plasmática da proteína C reativa. No entanto, os reagentes de fase aguda são muito sensíveis, porém inespecíficos marcadores da inflamação e ainda é desconhecido se eles participam da progressão da angina instável ou são apenas marcadores de um outro processo sistêmico associado à esta progressão.

A presença de infiltração de células inflamatórias, representadas principalmente por linfócitos, na adventícia das artérias coronárias de pacientes com angina instável quando comparados com pacientes com angina estável e pacientes sem cardiopatia isquêmica, tem sido demonstrada em autópsias (130). No entanto, as células T encontradas em placas ateroscleróticas podem estar em repouso, simplesmente contidas na lesão aterosclerótica ou podem estar imunologicamente ativadas e participando na patogênese da doença (56). O estado ativado de linfócitos T infiltrando o sítio de ruptura da placa coronariana, foi sugerido por Wal e colaboradores ao demonstrarem a expressão do MHC classe II nestas células e em macrófagos adjacentes em lesões coronarianas de pacientes que foram ao óbito por infarto agudo do miocárdio, conforme já referido anteriormente.(59). Estes autores estudaram as lesões coronarianas de pacientes que foram ao óbito por infarto agudo do miocárdio. Outra evidência da ativação imunoinflamatória de linfócitos T nestas condições é a expressão de IL-2sR por estas células e a detecção de IFN- $\gamma$  no interior de ateromas (87, 114).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina produzida por linfócitos T apenas quando estas células estão imunologicamente ativadas (114). Blum e colaboradores estudando pacientes com angina estável, com isquemia miocárdica detectada em cintilografia de esforço com tálio e submetidos a angioplastia coronária, encontraram que cerca de metade dos pacientes apresentavam nível plasmático elevado de receptores solúveis para IL-2, sugerindo a ativação de linfócitos T nestes pacientes (131). Neste estudo, o receptor solúvel de IL-2 normalizou-se após angioplastia com sucesso e a permanência da concentração plasmática elevada do receptor foi marcador de re-estenose. Além disso, Sernieri e colaboradores, estudando pacientes com angina estável, angina instável e indivíduos sem cardiopatia isquêmica, demonstraram que linfócitos obtidos dos pacientes com angina instável eram capazes de induzir *in vitro*, um aumento da atividade coagulante nos monócitos destes pacientes, sugerindo que a ativação dos monócitos neste estado seja produzida, pelo menos em parte por células linfocitárias (132). Por outro lado, De Servi e colaboradores não

encontraram aumento significativo da expressão do HLA-DR em linfócitos T do sangue periférico e do seio coronário de pacientes com angina instável (133). Portanto, a ativação de linfócitos T em associação com síndromes isquêmicas agudas *in vivo* ainda não está completamente estabelecida e tem gerado algumas controvérsias.

A expressão de moléculas de adesão por células implicadas na gênese da aterosclerose também tem sido descrita nas síndromes coronarianas agudas. Mazzone e colaboradores, identificaram aumento significativo da expressão de CD11b/CD18 em neutrófilos e monócitos obtidos no sangue do seio coronário de pacientes com angina instável, em relação aos monócitos e neutrófilos do sangue periférico destes pacientes (134). Estes autores não encontraram diferença significativa na expressão do CD11b/CD18 entre pacientes com angina instável e angina estável. Estes achados foram confirmados por De Servi e colaboradores que, por outro lado, não encontraram relação da expressão do CD11b/CD18 com a gravidade da lesão coronariana avaliada por cineangiocoronariografia (133).

A ativação de neutrófilos relacionada a síndromes coronarianas agudas tem sido classicamente atribuída à lesão de isquemia-reperfusão (135, 136). Recentemente, Biasucci e colaboradores demonstraram que os neutrófilos circulantes de pacientes com angina instável e infarto agudo do miocárdio estão depletados de mieloperoxidase, sugerindo o estado ativado destas células. No entanto, estes autores não encontraram a mesma situação em episódios isquêmicos espontâneos ocorrendo após estabilização da angina, nem durante isquemia induzida por esforço em pacientes com angina estável, sugerindo que a ativação dos neutrófilos possa ter outra origem além da isquemia (137).

O aumento da secreção das citocinas (bioprodutos de células ativadas), TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , *in vitro*, por leucócitos mononucleares de pacientes com angina estável e angina instável em relação aos controles sem doença cardíaca isquêmica foi demonstrado por Vaddi e colaboradores (138). Além disso, a concentração do receptor solúvel de TNF- $\alpha$  e do antagonista do receptor de IL-1, foi demonstrada como estando elevada em pacientes

com angina instável e infarto agudo do miocárdio (139). Estes fatos sugerem um possível papel das citocinas na instabilização da angina, porém, novamente, não são suficientes para estabelecer esta relação.

A produção de enzimas proteolíticas (metaloproteínases) por macrófagos ativadas no interior da placa coronariana tem sido proposta como um dos possíveis mecanismos de ruptura da sua capa fibrosa (42). Galis e colaboradores demonstraram o excesso de atividade proteolítica em placas ateroscleróticas humanas, principalmente na região vulnerável da placa (cotovelo), sugerindo que a excessiva degradação da matriz possa contribuir para a labilidade do ateroma (140). A expressão significativa de 92-KD gelatinase, um membro da família das metaloproteínases, em espécimes de aterectomia de pacientes com angina instável em relação a pacientes com angina estável foi demonstrada por Brown e colaboradores (141). A localização intracelular da 92-KD gelatinase nos macrófagos foi interpretada pelos autores como evidência de síntese ativa desta enzima, uma vez que os macrófagos não estocam esta metaloproteínase.

Enfim, embora evidências sugiram a associação entre inflamação aguda e síndromes coronarianas agudas, os resultados ainda são controversos e incompletos, permanecendo a seqüência temporal, a origem dos eventos, bem como a participação de cada elemento do sistema inflamatório neste processo, essencialmente desconhecidos, principalmente no que se refere à transposição de dados experimentais para eventos clínicos.

## HIPÓTESE

A instabilização e ruptura da placa coronariana, responsável pelos eventos isquêmicos agudos, ocorre como consequência da ativação do processo inflamatório existente na placa ateromatosa, estando este expresso mais acentuadamente na circulação coronariana em relação à circulação periférica.

## OBJETIVOS

### Geral:

Caracterizar o perfil da ativação do processo inflamatório desencadeado localmente na circulação coronariana em associação à instabilização da placa aterosclerótica nas síndromes coronarianas agudas.

### Específicos:

1- Caracterizar a presença e os níveis de citocinas através da determinação do nível sérico do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o nível sérico de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em sangue periférico e em sangue do seio coronário.

2- Caracterizar o estado ativado de linfócitos T circulantes através da determinação do nível sérico do receptor solúvel de interleucina 2 (IL-2 sR $\alpha$ ) em sangue periférico e sangue do seio coronário.

3- Caracterizar o estado ativado do endotélio vascular através da determinação do nível sérico da molécula de adesão da célula vascular tipo 1 (VCAM-1) em sangue periférico e em sangue do seio coronário.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1- Seleção da amostra

A seleção dos pacientes para entrada no estudo foi realizada no laboratório de hemodinâmica do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os pacientes foram encaminhados ao serviço por seus médicos para realização de cineangiocoronariografia diagnóstica.

Todos os pacientes foram submetidos à anamnese, exame físico e eletrocardiograma de repouso. Foram coletadas amostras de sangue venoso periférico para dosagem sérica de creatina fosfoquinase fração MB (CPK-MB) dos pacientes com angina instável e de glicemia de jejum dos pacientes com história de diabetes melito.

Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com seu quadro clínico e presença ou ausência de lesão aterosclerótica significativa (> 50%) das artérias coronárias identificada pela cineangiocoronariografia. O grupo 1 foi composto por pacientes com dor torácica e artérias epicárdicas normais. Estes indivíduos foram considerados como controles com artérias coronárias epicárdicas normais (CN). O grupo 2 foi composto por pacientes com angina estável (AE) caracterizada por dor torácica típica desencadeada por esforço físico ou estresse e com lesão aterosclerótica significativa das artérias coronárias epicárdicas. O grupo 3 foi composto por pacientes com angina instável (AI) tipo IB, IIB e IIIB da classificação de Braunwald (30) e lesão aterosclerótica significativa das artérias coronárias.

Foram excluídos da amostra: a) pacientes com critério para infarto agudo do miocárdio (elevação do nível sérico de CPK-MB e alterações eletrocardiográficas sugestivas de infarto agudo do miocárdio); b) pacientes com bloqueio de ramo esquerdo; c) pacientes com insuficiência cardíaca grau III ou IV; d) pacientes em uso de drogas em dose antiinflamatória sistêmica ou imunossupressora; e) pacientes com doença inflamatória aguda



ou crônica sistêmica; f) pacientes com infarto agudo do miocárdio ou cirurgia há menos de seis meses; g) pacientes com neoplasia.

Não houve interferência dos pesquisadores em relação ao tratamento que os pacientes vinham recebendo, nem em relação à indicação do exame cineangiocoronariográfico.

## **2- Coleta do material**

As amostras de sangue do seio coronário dos pacientes estudados foram coletadas no laboratório de hemodinâmica antes do cateterismo cardíaco esquerdo. Um cateter NIH 8F (USCI-BARD, New Jersey, EUA) foi posicionado no seio coronário médio através de punção da veia jugular ou de dissecação de veia do antebraço. A posição do cateter foi confirmada por fluoroscopia e injeção de 5 ml de contraste. Foram coletados 20 ml de sangue do seio coronário e fracionados em quatro frascos com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a coleta do sangue do seio coronário o cateter foi tracionado até a veia cava superior onde foram coletados 20 ml de sangue, constituindo a amostra periférica de cada paciente. Esta amostra também foi fracionada em 4 frascos contendo EDTA. Logo após a coleta as amostras foram levadas ao laboratório de pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para centrifugação. O plasma obtido pela centrifugação das amostras foi separado e armazenado à - 70° C para posterior análise conjunta.

Concomitantemente foram coletadas amostras de sangue periférico de dois voluntários saudáveis e de três pacientes sépticos com a finalidade de testar a adequação do método de dosagem dos marcadores por ensaio imunabsorvente (ELISA) e para otimizar a execução das curvas padrão. Os pacientes sépticos estavam hospitalizados no Centro de Tratamento Intensivo Clínico Cirurgico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com diagnóstico de sepse baseado nos critérios de Bone e colaboradores (142).

As amostras de sangue dos voluntários saudáveis e dos pacientes sépticos foram coletadas por punção de veia do ante-braço e processadas da mesma forma que as demais amostras.

### **3- Dosagem plasmática dos marcadores**

A dosagem plasmática dos marcadores foi realizada por ELISA quantitativo em conjuntos comercializados para uso em pesquisa (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA).

O método ELISA consiste em uma reação imunoenzimática na qual um anticorpo monoclonal reage com seu equivalente contido na amostra. A este complexo antígeno/anticorpo é adicionado um conjugado de anticorpo policlonal que amplifica o sinal da reação, formando um sanduíche. Adiciona-se então um substrato que ao reagir com o complexo anticorpo monoclonal/ antígeno/anticorpo policlonal, confere cor ao complexo. A densidade ótica da substância de interesse é obtida pela leitura das placas em espectrofotômetro. A concentração presente em cada amostra é obtida pela interpolação dos resultados de densidade ótica da amostra em uma equação polinomial de terceiro grau gerada a partir de uma curva padrão realizada com diferentes concentrações conhecidas da substância de interesse.

Cada conjunto contém uma placa de poliestireno com 96 valetas impregnadas com concentração conhecida de um anticorpo monoclonal para a substância a ser medida, permitindo 96 avaliações. Foi executada uma curva padrão para cada placa. As curvas padrão e as amostras foram executadas em duplicata para diminuir a variabilidade do método. Com a finalidade de evitar a variação inter-ensaio, as amostras de sangue do seio coronário e periférico de todos os pacientes foram analisadas em conjunto e simultaneamente para cada marcador.

A execução dos ensaios ELISA foi realizada pela autora no laboratório de pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com supervisão dos profissionais deste

laboratório. As densidades óticas foram lidas nos comprimentos de onda especificados em cada conjunto e com o filtro apropriado em um aparelho automatizador para testes ELISA (Microplate Reader, Behring EL 311).

Inicialmente, foram executadas várias curvas padrão e medidas séricas de TNF- $\alpha$  e IL-2 sR nas amostras dos voluntários saudáveis e dos pacientes sépticos para adequação da técnica e otimização do método. Posteriormente foram analisadas as amostras da população em estudo.

#### **4- Classificação das lesões coronarianas e análise da ventriculografia**

A cineangiocoronariografia de cada paciente foi revisada por hemodinamicista que desconhecia a identidade e as condições clínicas do paciente. Os angiogramas dos pacientes foram classificados quanto a presença de lesão coronariana significativa ( $> 50\%$ ) e quanto ao número de vasos comprometidos. As características morfológicas e funcionais do ventrículo esquerdo também foram descritas.

#### **5- Considerações éticas**

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O risco envolvido na execução de algumas etapas do projeto foi maior que o mínimo, portanto durante a solicitação para que o paciente participasse do projeto estes riscos foram esclarecidos e todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado (ANEXO 1).

#### **6- Análise estatística**

Os dados foram tabulados e analisados no programa estatístico "StatWorks" para Macintosh em computador compatível. Todas as medidas foram descritas como média  $\pm$  erro padrão (EP) da média. A comparação entre o nível sérico dos marcadores entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA). A comparação entre o nível sérico

dos marcadores no seio coronário e no sangue periférico de cada paciente, foi realizada pelo teste t de Student para amostras pareadas. A correlação entre os valores obtidos nas amostras de sangue periférico e nas amostras de sangue do seio coronário foi testada pelo método de Pearson. A associação entre o nível sérico dos marcadores e a presença ou ausência de fatores de risco foi avaliada pelo teste de Spearman, bem como a associação com a gravidade de lesão estabelecida pelo número de vasos com lesão significativa em cada paciente. A distribuição de sexo, fatores de risco, medicação em uso e número de vasos lesados entre os pacientes de cada grupo, foi avaliada pelo teste do qui-quadrado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS

### 1- Características clínicas e angiográficas da amostra

No período de 22 de agosto de 1995 a 8 de abril de 1996 foram incluídos no protocolo 44 pacientes, sendo posteriormente retirados da amostra dois pacientes por apresentarem grave comprometimento da função sistólica global na ventriculografia, e dois pacientes cujo quadro clínico não permitia uma razoável diferenciação entre angina estável e angina instável. A amostra estudada foi composta então de 40 pacientes.

O grupo controle com coronárias normais (CN) foi composto por oito pacientes, sendo quatro do sexo masculino e quatro do sexo feminino, com média de idade de  $57 \pm 9$  anos. Todos os pacientes foram encaminhados para cineangiocoronariografia com o propósito de investigar dor torácica, sendo que quatro pacientes estavam hospitalizados com diagnóstico clínico de angina instável. O eletrocardiograma de superfície foi alterado em quatro pacientes, sendo dois com alterações inespecíficas da repolarização ventricular e dois com alterações isquêmicas agudas. Quatro pacientes apresentaram teste de esforço sugestivo de cardiopatia isquêmica. A cineangiocoronariografia não identificou lesão significativa nas artérias epicárdicas em nenhum destes pacientes. Apenas dois pacientes não eram portadores de hipertensão arterial sistêmica, no entanto, todos apresentaram hipertrofia ventricular esquerda na ventriculografia.

O grupo de angina estável (AE) foi composto por quatorze pacientes, sendo nove do sexo masculino e cinco do sexo feminino com média de idade de  $56 \pm 11$  anos. Neste grupo de pacientes, o intervalo mínimo de ausência de sintomas antes da coleta da cineangiocoronariografia foi de três dias, exceto para um paciente que apresentou dor desencadeada por esforço não habitual cerca de 24 horas antes do exame. O eletrocardiograma de superfície foi alterado em nove pacientes. As alterações descritas no eletrocardiograma foram: bloqueio de ramo direito, alterações inespecíficas da

repolarização ventricular, zona inativa inferior, sobrecarga de ventrículo esquerdo e alterações secundárias da repolarização ventricular. A cineangiocoronariografia identificou lesão significativa (> 50%) em todos os pacientes, sendo que dez apresentaram lesão em apenas um vaso e somente um paciente apresentou lesão de três vasos. O ventrículo esquerdo foi descrito como hipertrófico em seis pacientes.

O grupo de angina instável (AI) foi composto por 18 pacientes, sendo quinze do sexo masculino e três do sexo feminino, com média de idade de  $62 \pm 10$  anos. Três pacientes deste grupo tinham diagnóstico de diabetes melito não insulino-dependente controlado apenas com dieta. As glicemias destes pacientes coletadas com jejum de 8 horas foram inferiores a 160 mg/dL. O eletrocardiograma de superfície mostrou alterações isquêmicas agudas não sugestivas de infarto agudo do miocárdio em treze pacientes. Outras alterações descritas no eletrocardiograma foram: alterações inespecíficas da repolarização ventricular e sobrecarga de ventrículo esquerdo. Todos os pacientes tinham relato de dor torácica em repouso, sendo que seis pacientes apresentaram episódio de dor menos de 24 horas antes da coleta do sangue. O nível sérico de CPK-MB foi normal em todos os pacientes. A cineangiocoronariografia identificou lesão significativa em todos os pacientes, sendo que oito apresentaram lesão de um vaso, dois apresentaram lesão de dois vasos e oito apresentaram lesão de três vasos. O ventrículo esquerdo foi descrito como hipertrófico nos nove pacientes com hipertensão arterial sistêmica.

### **1.1- Comparação das características clínicas e angiográficas entre os três grupos**

A média de idade e a distribuição do sexo foram semelhantes nos três grupos estudados. A distribuição dos fatores de risco para cardiopatia isquêmica pesquisados na amostra (hipertensão arterial sistêmica, fumo, dislipidemia, história familiar de cardiopatia isquêmica) foi semelhante entre os grupos, exceto para dislipidemia. Houve um número significativamente menor de pacientes com história de dislipidemia no grupo 3 (AI),  $p = 0,006$ .

As medicações com efeito sobre o sistema cardiovascular utilizadas pelos pacientes foram semelhantes nos três grupos, não havendo predomínio significativo de um tipo de medicação em relação a outro. Os medicamentos relatados como em uso regular pelos pacientes foram: beta bloqueadores, nitratos, ácido acetil salicílico, bloqueadores dos canais de cálcio e inibidores da enzima conversora da angiotensina.

A avaliação do comprometimento das artérias coronárias pela cineangiocoronariografia mostrou um número significativamente maior de pacientes com lesão de três vasos no grupo 3 (AI) em relação aos pacientes do grupo 2 (AE),  $p = 0,04$ .

As características clínicas da amostra e o comprometimento das artérias coronárias estão descritos na tabela 1.

## **2- Otimização metodológica do ensaio ELISA**

Para otimização do método e das curvas padrão foram realizadas medidas da concentração plasmática de TNF- $\alpha$  e de IL-2sR em amostras de sangue periférico de dois voluntários do sexo feminino com idade de 35 e 37 anos, não fumantes e sem história conhecida de doença e de três pacientes, sendo dois do sexo masculino e uma do sexo feminino, com diagnóstico de sepse grave e idades de 64, 35 e 54 anos respectivamente. As curvas e as amostras foram processadas em duplicata, sendo realizadas duas avaliações para IL-2sR e uma para TNF- $\alpha$ .

A média das concentrações de IL-2sR encontradas nos dois ensaios foi de 329,24 pg/ml e de 690,26 pg/ml para os voluntários. A média das concentrações de IL-2sR encontradas nos dois ensaios foi de 18532,30 pg/ml, 2642,02 pg/ml e 816,56 pg/ml para os pacientes sépticos. Os valores encontrados para IL-2 sR neste grupo de indivíduos estão descritos na tabela 2. Uma curva padrão ilustrativa de um dos ensaios e sua equação correspondente estão demonstradas na figura 1. Os valores normais de referência para este ensaio no plasma coletado com EDTA, segundo o fabricante, são de 640 pg/ml a 2543 pg/ml (média de 1274 pg/ml), determinados em amostras de plasma de 37 doadores

aparentemente saudáveis. A sensibilidade do ensaio para amostras de plasma com EDTA é de 24 pg/ml.

**Tabela 1- Características Clínicas e Angiográficas da Amostra**

	Grupo 1 (CN) (n = 8)	Grupo 2 (AE) (n = 14)	Grupo 3 (AI) (n = 18)
<b>Idade</b>	57 ± 9	56 ± 11	62 ± 10
<b>Sexo (M/F)</b>	4/4	9/5	15/3
<b>Hipertensão arterial sistêmica</b>	6 (75%)	10 (71%)	9 (50%)
<b>Fumo</b>	5 (63%)	5 (35%)	8 (44%)
<b>Dislipidemia</b>	1 (13%)	9 (64%)	3 (17%)*
<b>Hist. Familiar</b>	2 (25%)	2 (14%)	6 (33%)
<b>Extensão da Doença coronária</b>			
<b>1 vaso</b>	NA	10	8**
<b>2 vasos</b>	NA	3	2
<b>3 vasos</b>	NA	1	8

\*p 0,006 para a menor frequência de pacientes com dislipidemia no grupo 1 (CN) em relação aos grupos 2 (AE) e 3 (AI). \*\*p 0,04 para a menor frequência de pacientes com lesão de três vasos no grupo 2 (AE) em relação ao grupo 3 (AI).

**Abreviaturas:** CN - coronárias normais; AE - angina estável; AI - angina instável; NA - não aplicável; M - masculino; F - feminino.



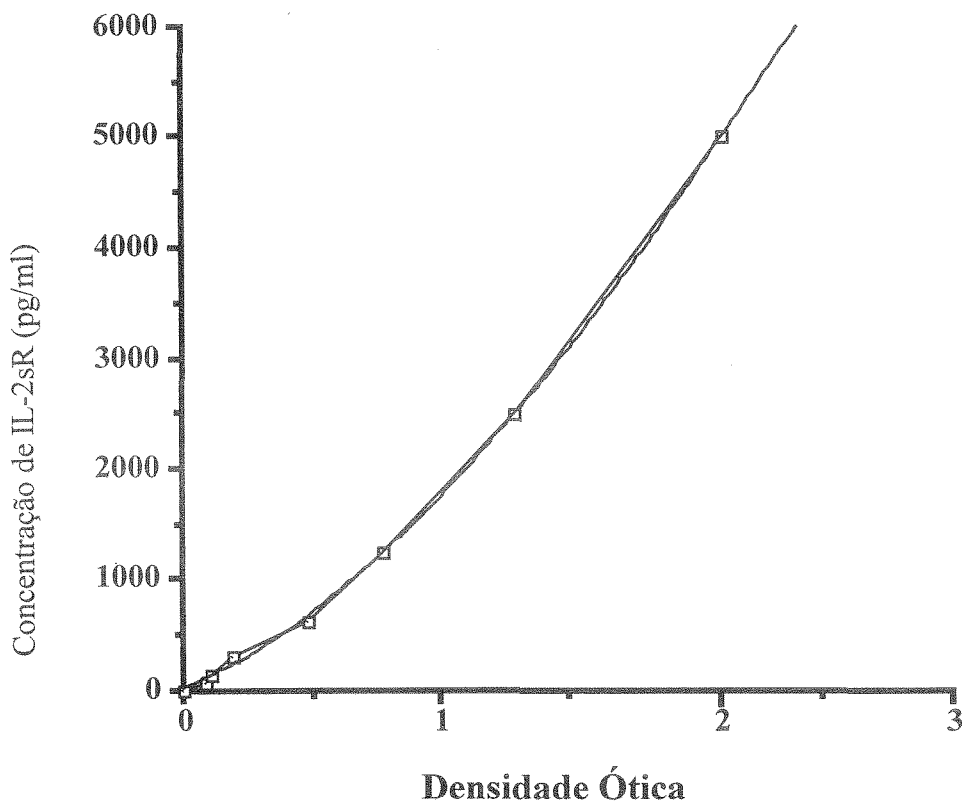
**Tabela 2- Concentração de IL-2sR e TNF- $\alpha$  em voluntários normais e em pacientes sépticos**

	IL-2sR* (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
Voluntário 1	329,24	5,06
Voluntário 2	690,26	6,5
Paciente 1	816,56	11,17
Paciente 2	2642,02	15,82
Paciente 3	18532,30	21,22

*Abreviaturas: TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa; IL-2sR - receptor solúvel de interleucina 2.*

*\*Média dos valores encontrados nos dois ensaios teste do IL-2sR.*

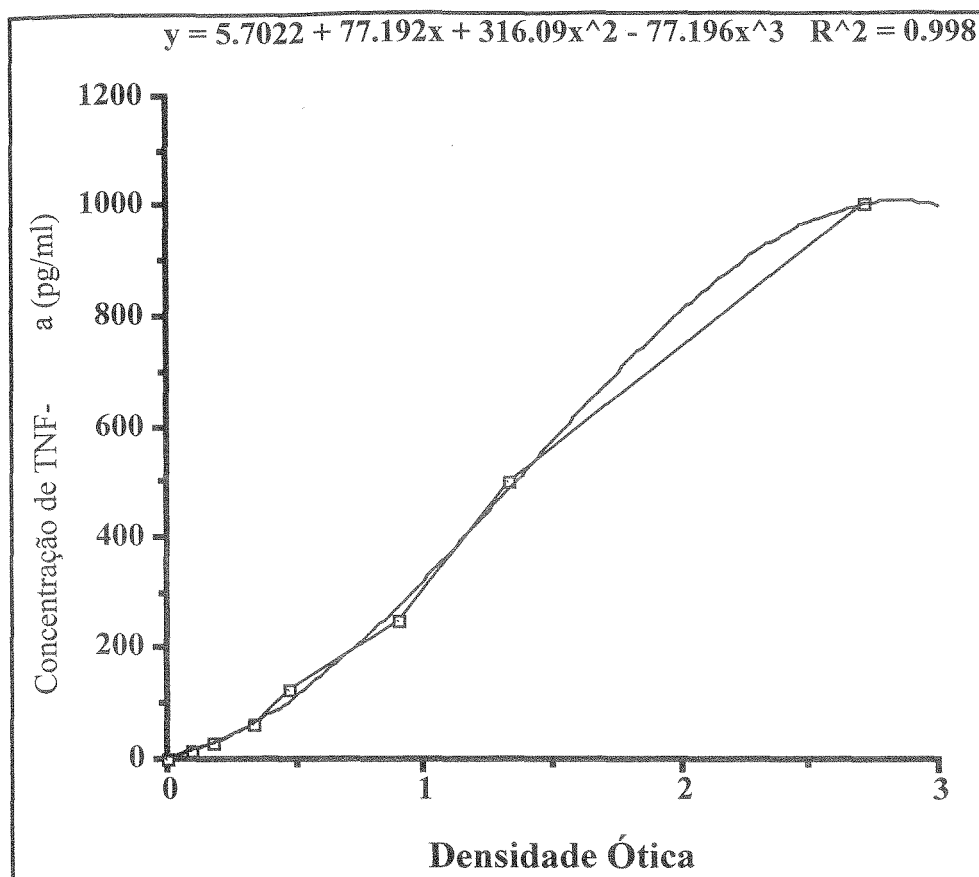
$$y = 26.717 + 938.34x + 890.49x^2 - 101.08x^3 \quad R^2 = 1.000$$



**Figura 1-Curva Padrão Teste da Concentração Plasmática de IL-2sR**

Curva padrão ilustrativa da concentração de IL-2sR correspondente às densidades óticas obtidas no ensaio teste de IL-2sR. A equação polinomial de 3º grau está representada no topo da curva.

As concentrações de TNF- $\alpha$  encontradas nos voluntários normais foram 5,06 pg/ml e 6,5 pg/ml. As concentrações de TNF- $\alpha$  encontradas nos pacientes sépticos foram 21,22 pg/ml, 15,82 pg/ml e 11,17 pg/ml. Os valores plasmáticos normais de referência para este ensaio são inferiores a 15,6 pg/ml. Estes valores foram obtidos pelos fabricantes do ensaio através da avaliação da presença de TNF- $\alpha$  no plasma de 40 doadores aparentemente saudáveis. A sensibilidade do ensaio é de 4,4 pg/ml. A densidade ótica e a concentração sérica de TNF- $\alpha$  neste grupo de indivíduos estão descritas na tabela 2. A curva padrão gerada e a equação de 3º grau correspondente estão representadas na figura 2.

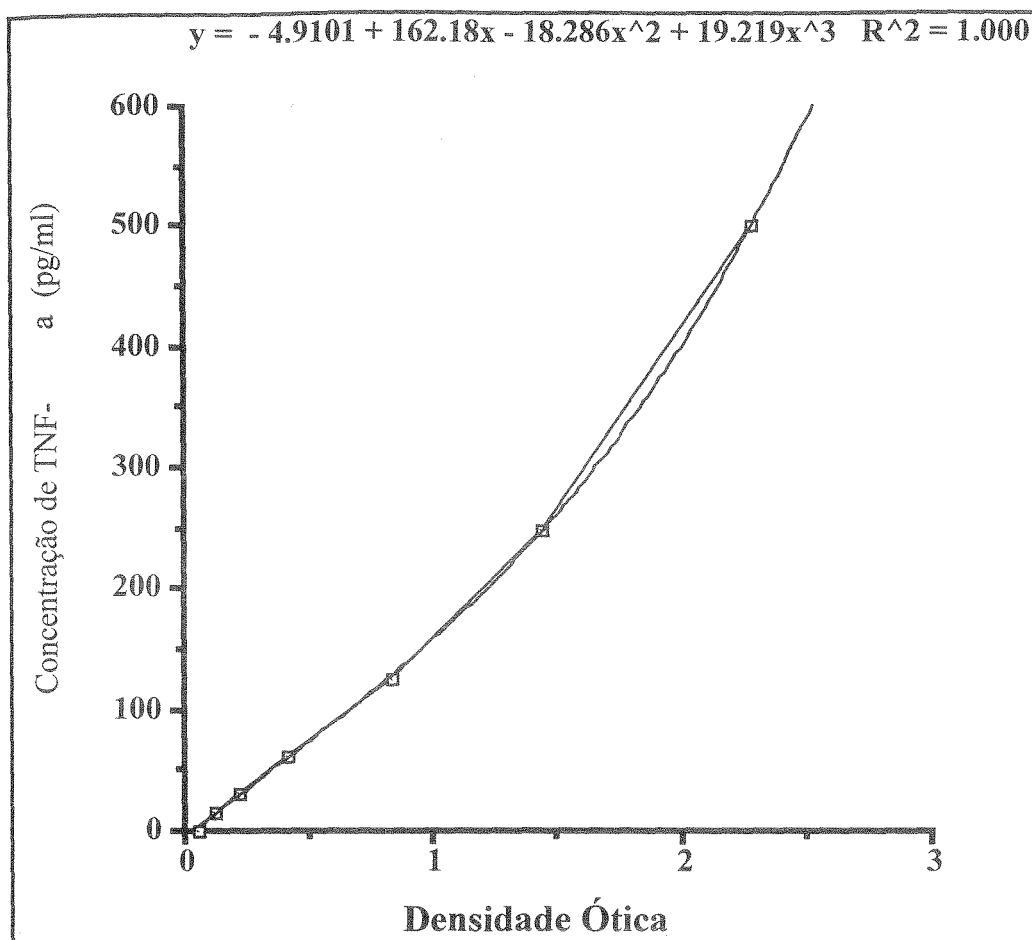


**Figura 2- Curva Padrão Teste da Concentração Plasmática de TNF- $\alpha$**

Curva padrão ilustrativa das concentrações de TNF- $\alpha$  correspondentes às densidades óticas obtidas no ensaio teste de TNF- $\alpha$ . A equação polinomial de 3º grau está representada no topo da figura.

### 3- Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ nos pacientes estudados

A concentração plasmática de TNF- $\alpha$  foi inferior a 15,6 pg/ml em todos os pacientes da amostra, sendo este o limite superior da normalidade segundo o fabricante do ensaio (dados não ilustrados). A curva padrão ilustrativa de um dos ensaios e sua equação, à partir da qual foram obtidas as concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  nos pacientes da amostra estão representadas na figura 3.



**Figura 3- Curva Padrão da Concentração Plasmática de TNF- $\alpha$**

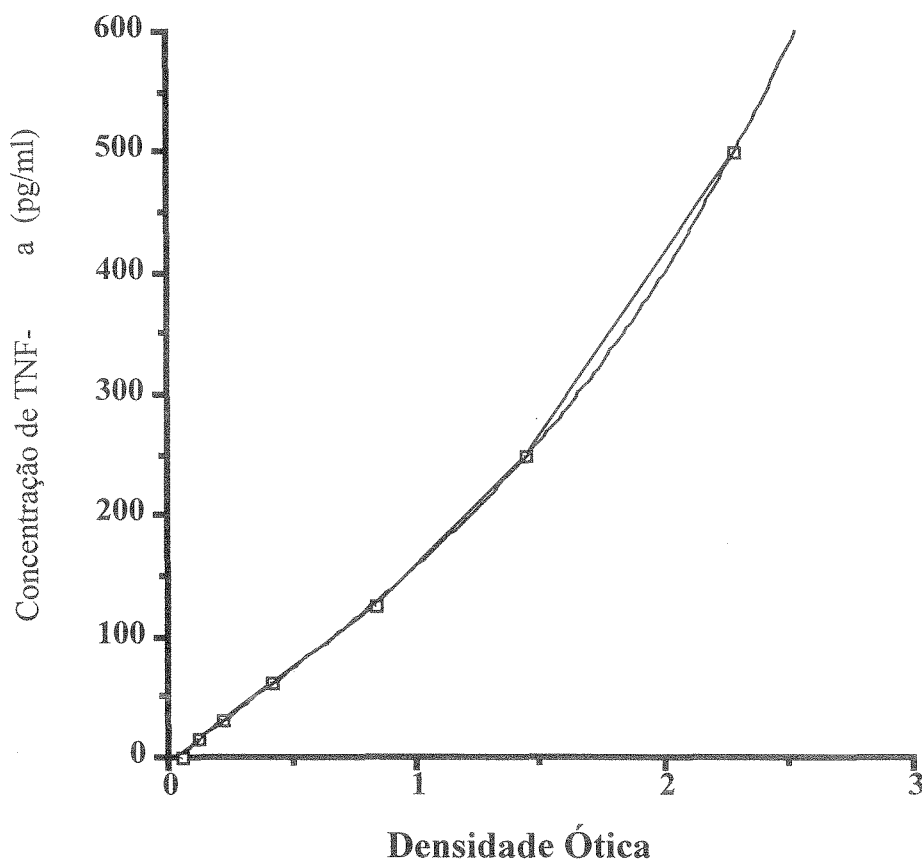
Curva padrão ilustrativa de um dos ensaios de TNF- $\alpha$  realizados na amostra. A equação polinomial de 3º grau a partir da qual foram obtidas as concentrações de TNF- $\alpha$  nos pacientes da amostra está representada no topo da figura.

#### 4- Concentração plasmática de IFN- $\gamma$ nos pacientes estudados

A concentração plasmática de IFN- $\gamma$  foi inferior a 15,6 pg/ml em todos os pacientes da amostra, sendo este o limite superior da normalidade segundo o fabricante do ensaio (dados não ilustrados). Este valor foi obtido através da análise da concentração plasmática de IFN- $\gamma$  de 40 doadores aparentemente saudáveis, cujos valores foram todos inferiores ao do menor padrão (15,6 pg/ml). A sensibilidade do ensaio é de 3,0 pg/ml. Uma das curvas padrão ilustrativa dos ensaios de IFN- $\gamma$  e a equação polinomial de 3º grau através da qual

foram obtidas as concentrações plasmáticas de IFN- $\gamma$  nos pacientes da amostra, estão representadas na figura 4.

$$y = -4.9101 + 162.18x - 18.286x^2 + 19.219x^3 \quad R^2 = 1.000$$



**Figura 4- Curva Padrão da Concentração Plasmática de IFN- $\gamma$**

Curva padrão ilustrativa de um dos ensaios de IFN- $\gamma$  realizados na amostra. A equação polinomial de 3º grau a partir da qual foram obtidas as concentrações de IFN- $\gamma$  nos pacientes da amostra está representada no topo da figura.

### 5- Concentração plasmática de IL-2sR nos pacientes estudados

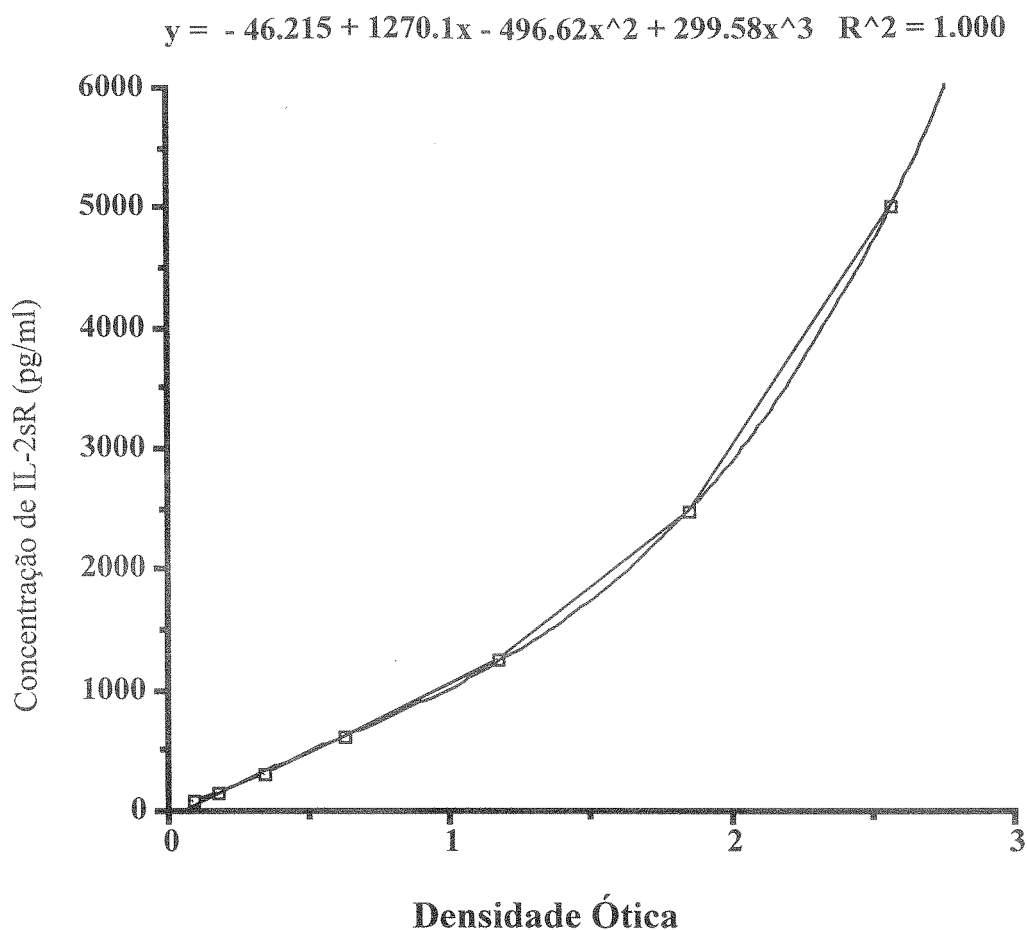
A concentração plasmática média de IL-2sR nos pacientes do grupo 1 (CN) foi de  $1088,87 \pm 229,27$  pg/ml (min. 214,97 pg/ml; máx. 1994,68 pg/ml) para as amostras de sangue periférico e de  $1057,12 \pm 228,54$  pg/ml (min. 107,82 pg/ml; máx. 2043,81 pg/ml)

para as amostras de sangue do seio coronário. A diferença entre estes valores não foi estatisticamente significativa.

A concentração plasmática média de IL-2sR nos pacientes do grupo 2 (AE) foi de  $1154,50 \pm 126,49$  pg/ml (min. 393,59 pg/ml; máx. 2004,84 pg/ml) nas amostras de sangue periférico e de  $1382,21 \pm 160,80$  pg/ml (min. 588,86 pg/ml; máx. 2307,40 pg/ml) no seio coronário. A diferença entre estes valores não foi estatisticamente significativa.

A concentração plasmática média de IL-2sR nos pacientes do grupo 3 (AI) foi de  $1153,64 \pm 214,69$  pg/ml (min. 398,25 pg/ml; máx. 24125,63 pg/ml) para as amostras de sangue periférico e de  $1261,70 \pm 200,98$  pg/ml (min. 324,38 pg/ml; máx. 28204,83 pg/ml) nas amostras de seio coronário. A diferença entre estes valores não foi estatisticamente significativa.

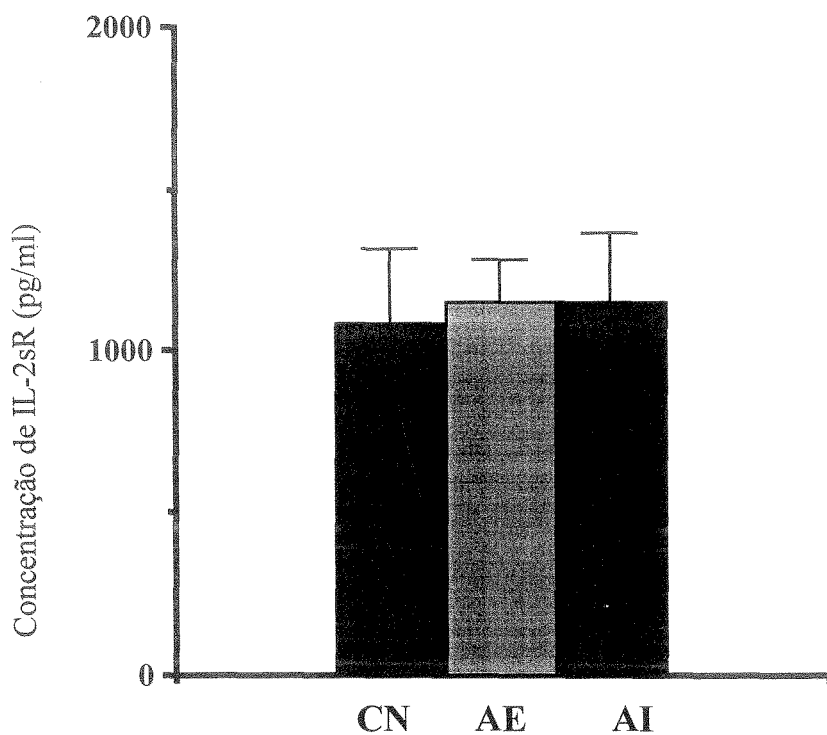
Uma curva padrão ilustrativa de um dos ensaios para IL-2sR e a equação polinomial de 3º grau através da qual foram obtidas as concentrações de IL-2sR na amostra, estão representadas na figura 5.



**Figura 5- Curva Padrão da Concentração Plasmática de IL-2sR**

Curva padrão ilustrativa de um dos ensaios de IL-2sR realizados na amostra. A equação polinomial de 3º grau a partir da qual foram obtidas as concentrações de IL-2sR nos pacientes da amostra está representada no topo da figura.

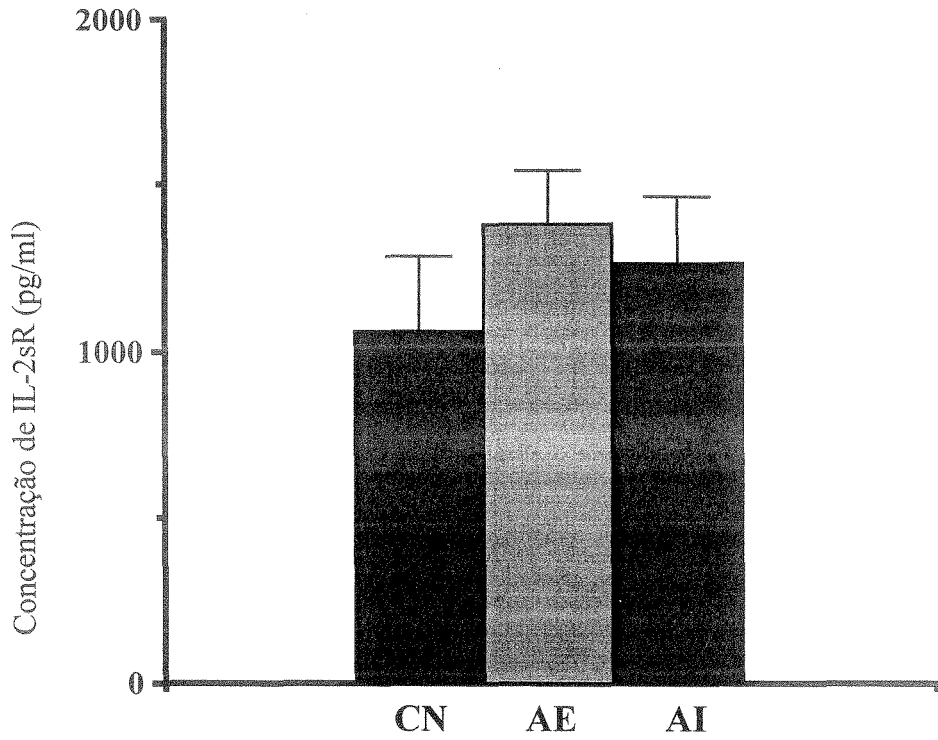
A comparação dos valores médios da concentração de IL-2sR obtidos nos três grupos, tanto em amostras de seio coronário como em amostras de sangue periférico, não demonstrou diferença estatisticamente significativa. Estes dados estão representados nas figuras 6 e 7.



**Figura 6- Gráfico da Concentração Periférica de IL-2sR**

Concentração periférica de IL-2sR em pacientes com coronárias normais (CN), angina estável (AE) e angina instável (AI). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EP. Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração de IL-2sR entre os três grupos estudados.

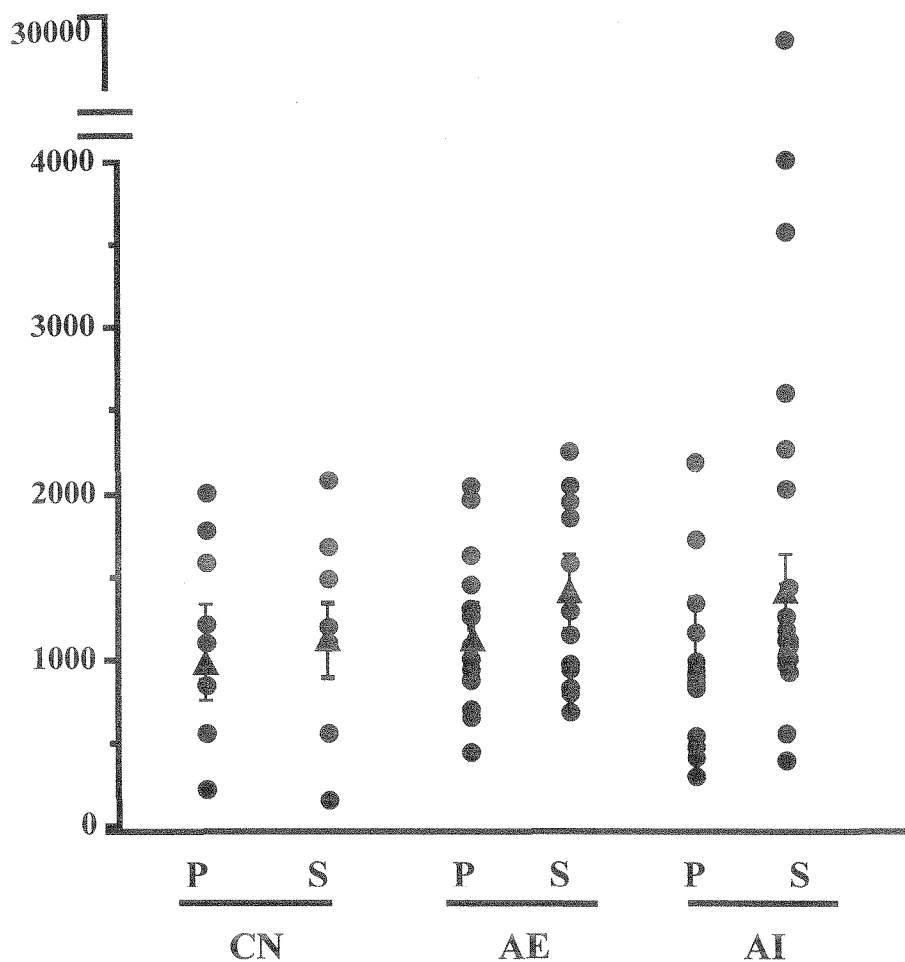




**Figura 7- Gráfico da Concentração de IL-2sR no Seio Coronário**

Concentração de IL-2sR no sangue do seio coronário de pacientes com coronárias normais (CN), angina estável (AE) e angina instável (AI). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EP. Não houve diferença estatisticamente significativa na concentração plasmática de IL-2sR entre os três grupos estudados.

Enfim, a comparação dos valores obtidos nas amostras de seio coronário com os valores obtidos em amostras de sangue periférico entre os grupos e dentro de cada grupo, também não evidenciou diferença estatisticamente significativa. Estes dados demonstrados individualmente estão ilustrados na figura 8.



**Figura 8- Gráfico da Concentração Plasmática do IL-2sR**

Concentração plasmática do IL-2sR obtida em cada paciente do grupo de coronárias normais (CN), angina estável (AE) e angina instável (AI), tanto para amostras de sangue periférico (P) como para amostras de sangue do seio coronário (S). As médias  $\pm$  EP de cada grupo estão representadas na figura.

A extensão da doença coronária caracterizada pelo número de vasos com lesão  $>$  50%, não apresentou associação com o nível sérico medido de IL-2sR nos três grupos (dados não ilustrados). Também não houve associação entre a concentração de IL-2sR e a presença de fatores de risco (dados não ilustrados).

## 6- Concentração plasmática de VCAM-1 nos pacientes estudados

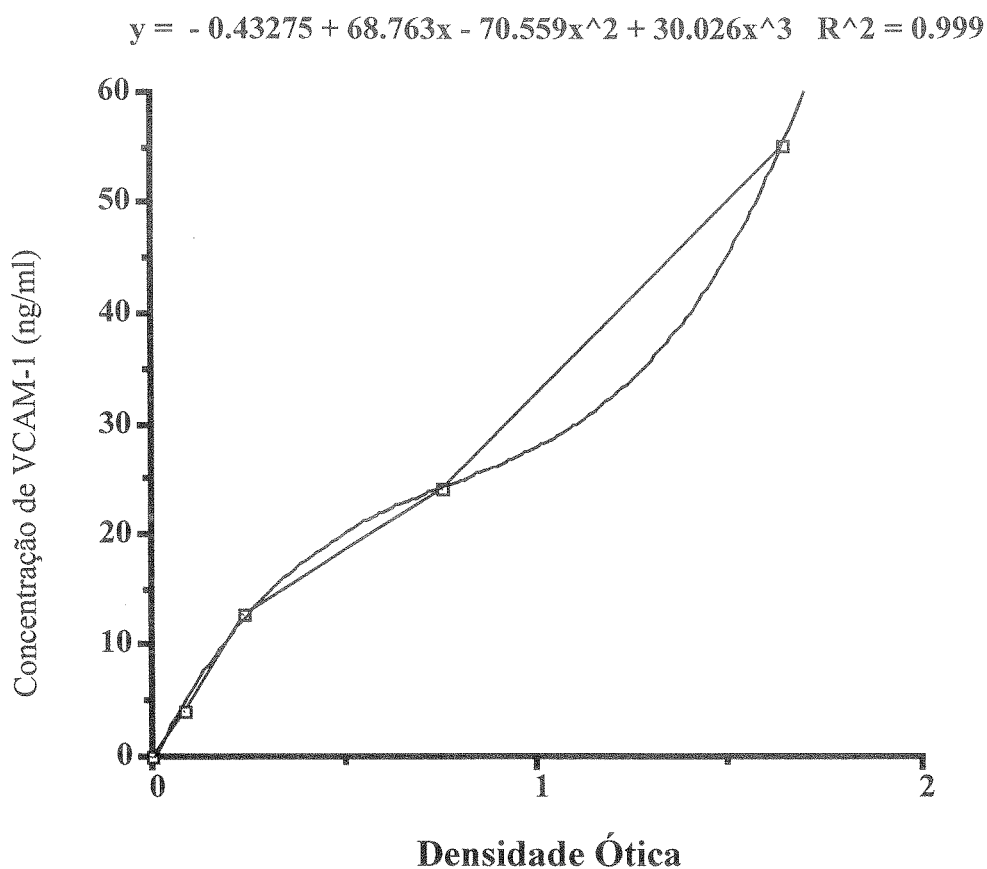
A concentração plasmática média de VCAM-1 nos pacientes do grupo 1 (CN) foi de  $2307 \pm 295$  ng/ml (min. 932 ng/ml; máx. 3769 ng/ml) nas amostras de sangue periférico e de  $1898 \pm 303$  ng/ml (min. 1174 ng/ml; máx. 3469 ng/ml) nas amostras de seio coronário. Apenas dois pacientes deste grupo apresentaram valores inferiores ao limite superior de variação da normalidade. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes valores.

A concentração plasmática média de VCAM-1 nos pacientes do grupo 2 (AE) foi de  $1571 \pm 801$  ng/ml (min. 373 ng/ml; máx. 2520 ng/ml) nas amostras de sangue periférico e de  $1415 \pm 827$  ng/ml (min. 415 ng/ml; máx. 3112ng/ml) nas amostras de seio coronário. Seis pacientes deste grupo (46%) apresentaram valores inferiores a média da variação considerada normal para o ensaio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes valores.

A concentração plasmática média de VCAM-1 nos pacientes do grupo 3 (AI) foi de  $1698 \pm 728$  ng/ml (min. 356 ng/ml; máx. 3155ng/ml) nas amostras de sangue periférico e de  $1670 \pm 1052$  ng/ml (min. 525 ng/ml; máx. 3558ng/ml) nas amostras de seio coronário. Todos os pacientes deste grupo apresentaram valores da VCAM-1 plasmática acima do valor superior considerado normal para o ensaio. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes valores.

Uma curva padrão ilustrativa dos ensaios para VCAM-1 realizados na amostra e a equação polinomial de 3º grau através da qual foram obtidas as concentrações plasmáticas de VCAM-1 nos pacientes da amostra, estão representadas na figura 9. O valor médio de referência do ensaio, segundo o fabricante, é de 553 ng/ml (395 ng/ml - 714 ng/ml), sendo os valores da concentração plasmática média da VCAM-1 nos três grupos cerca de três vezes acima deste valor. Os valores propostos como normais pelos fabricantes do ensaio foram obtidos de amostras de plasma de 102 doadores aparentemente normais. A

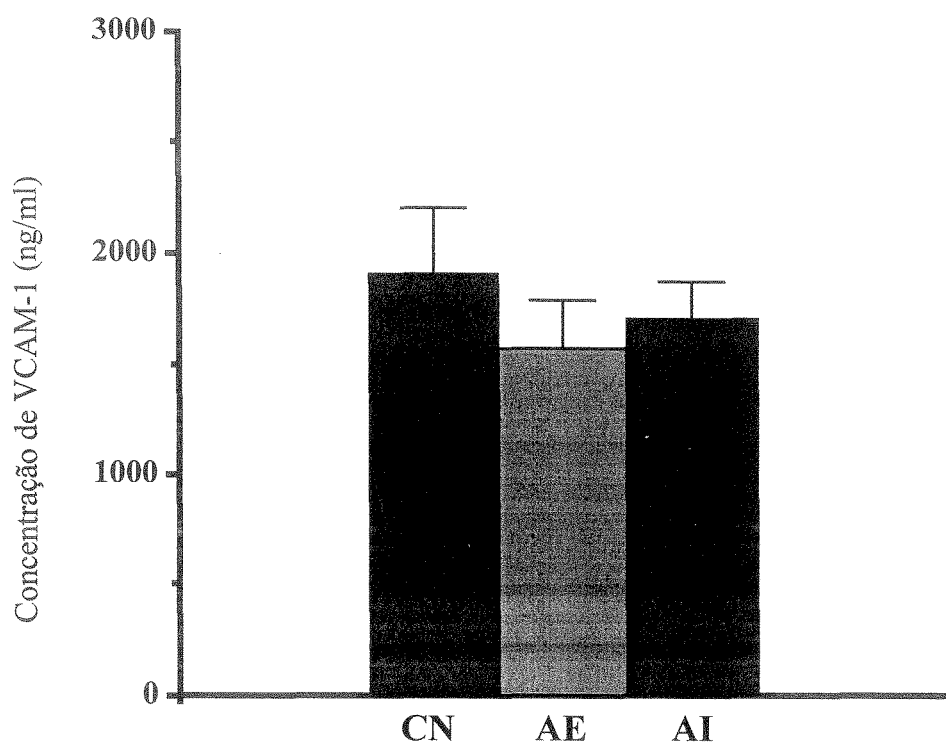
sensibilidade do ensaio é de 100 ng/ml quando a amostra é diluída 1:50, como realizada neste estudo.



**Figura 9- Curva Padrão da Concentração Plasmática de VCAM-1**

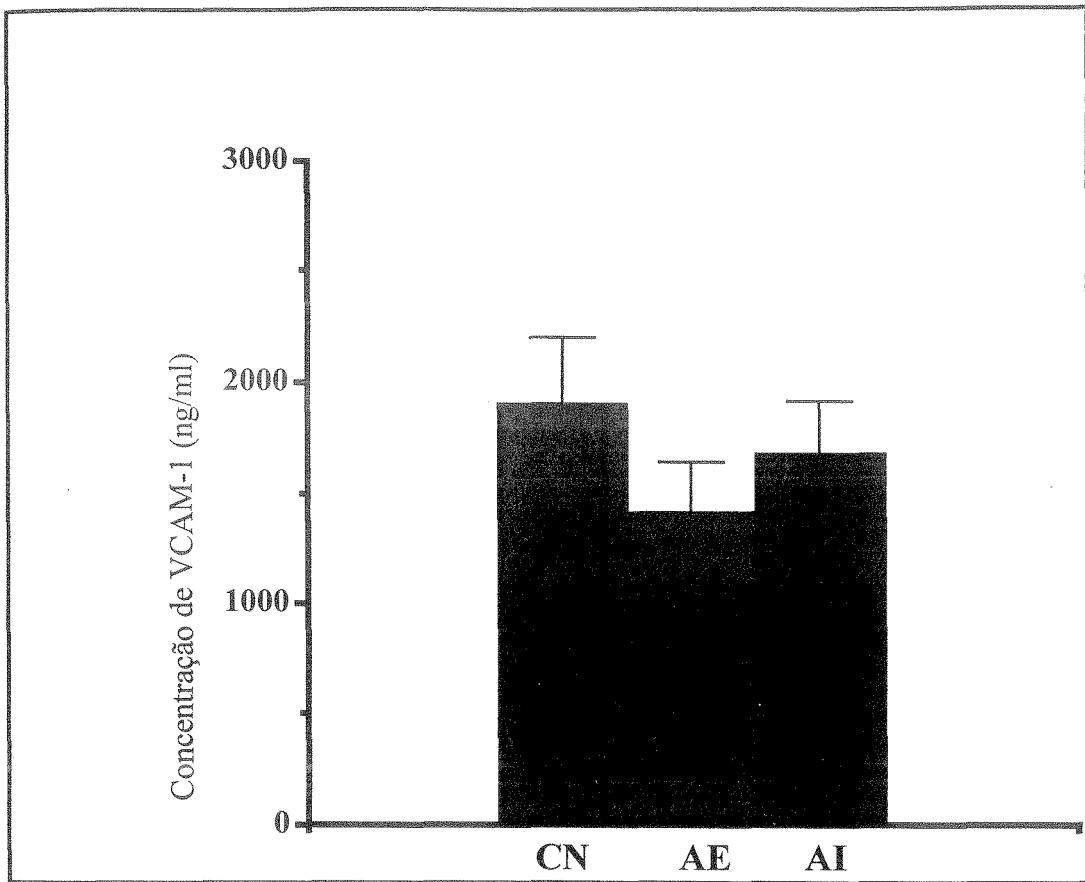
Curva padrão ilustrativa de um dos ensaios de VCAM-1 realizados na amostra. A equação polinomial de 3º grau à partir da qual foram obtidas as concentrações de VCAM-1 nos pacientes da amostra está representada no topo da figura.

A comparação entre os valores médios da VCAM-1 obtidos nos três grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa. Estes dados estão representados nas figuras 10 e 11.



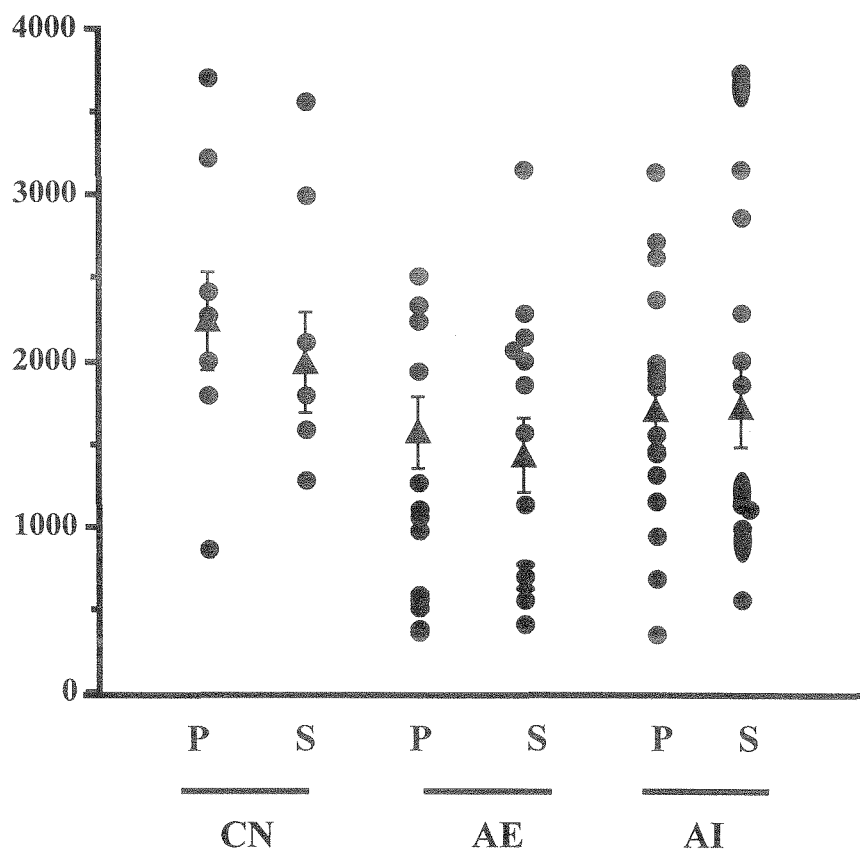
**Figura 10- Gráfico da Concentração Periférica Média da VCAM-1**

Concentração plasmática da VCAM-1 no sangue periférico de pacientes com coronárias normais (CN), angina estável (AE) e angina instável (AI). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EP. A concentração da VCAM-1 está aumentada em todos os pacientes, porém não houve diferença estatisticamente significativa dos valores entre os grupos.



**Figura 11- Gráfico da Concentração Média da VCAM-1 em Sangue do Seio Coronário**  
Concentração plasmática VCAM-1 em seio coronário de pacientes com coronárias normais (CN), angina estável (AE) e angina instável (AI). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EP. A concentração da VCAM-1 está aumentada em todos os pacientes, porém não houve diferença estatisticamente significativa dos valores entre os grupos.

Enfim, a comparação dos valores obtidos nas amostras de seio coronário com os valores obtidos em amostras de sangue periférico entre os grupos e dentro de cada grupo também não evidenciou diferença estatisticamente significativa. Estes dados representados individualmente estão ilustrados na figura 12.



**Figura 12- Gráfico da Concentração Plasmática da VCAM-1**

Concentração plasmática da VCAM-1 obtida em cada paciente do grupo de coronárias normais (CN), angina estável (AE) e angina instável (AI), tanto em amostras de sangue periférico (P) como em amostras de sangue do seio coronário (S). A média  $\pm$  EP de cada grupo está representada na figura.

A extensão da doença coronariana caracterizada pelo número de vasos com lesão > 50% em cada paciente, não demonstrou associação com a concentração plasmática de VCAM-1 (dados não ilustrados). Também não houve associação entre a presença de fatores de risco e a concentração plasmática de VCAM-1 (dados não ilustrados).



## DISCUSSÃO

A instabilização e ruptura da placa aterosclerótica coronariana tem sido apontada como um dos principais mecanismos associados ao quadro clínico das síndromes coronarianas agudas (116). A possibilidade de um componente imunoinflamatório envolvido neste processo vem sendo investigada por diversos autores, porém a origem e o perfil da inflamação em relação às síndromes coronarianas agudas permanecem indefinidos. Neste estudo, foi testada a hipótese de que a instabilização clínica da doença aterosclerótica coronariana possa estar associada com ativação imunoinflamatória caracterizada pelo aumento da concentração plasmática dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2sR e VCAM-1, ocorrendo predominantemente na circulação coronariana e, portanto, sugerindo este local como origem do processo. Para tanto, a expressão destes mediadores foi avaliada em sangue do seio coronário e sangue periférico em três grupos de pacientes classificados como pacientes com dor torácica sem lesão nas artérias coronárias epicárdicas, pacientes com angina estável e pacientes com angina instável. Em relação ao TNF- $\alpha$  e ao IFN- $\gamma$ , os níveis plasmáticos identificados foram inferiores ao limite superior da normalidade nos três grupos. Os níveis plasmáticos do IL-2sR identificados situaram-se dentro da faixa de normalidade em todos os pacientes estudados. No entanto, os níveis plasmáticos da VCAM-1 foram elevados nos três grupos estudados, porém sem estabelecer uma clara distinção entre os pacientes de acordo com a classificação clínica e angiográfica utilizadas. O conjunto destes dados indica que, talvez, a avaliação do TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2sR em corte transversal não seja capaz de identificar alterações fugazes em sua concentração plasmática, ocorrendo durante a instabilização da cardiopatia isquêmica. No entanto, a elevação da VCAM-1 observada sugere ativação do endotélio ocorrendo na cardiopatia isquêmica, porém, utilizando-se a classificação clínica usual, não foi possível identificar diferença entre os grupos estudados.

### Considerações metodológicas

A seleção dos pacientes para o estudo foi baseada em critérios clínicos e angiográficos. A classificação baseada no quadro clínico para caracterizar pacientes com doença coronariana estável e instável tem sido classicamente utilizada na literatura (30). No entanto, recentes evidências sugerem que a presença de isquemia ocorrendo sem manifestações clínicas pode estar associada à instabilidade biológica da cardiopatia isquêmica, apresentando inclusive implicações prognósticas (27, 40). Este fato sugere que talvez a classificação da instabilidade da doença coronariana baseada em critérios clínicos, não considerando a possibilidade da ocorrência de isquemia silenciosa, possa levar a uma interpretação errônea dos fenômenos associados à instabilização da angina. Por outro lado, a utilização da cineangiocoronariografia como critério isolado para definir o grau de comprometimento isquêmico do miocárdio tem sido questionada em relação à possibilidade da existência de isquemia na ausência de lesão estenosante significativa (143).

O papel da microcirculação na fisiopatologia da isquemia miocárdica tem despertado interesse e vem sendo investigado recentemente (144). Por exemplo, na vasculopatia associada ao transplante cardíaco, cuja fisiopatologia assemelha-se à da aterosclerose coronariana em diversos aspectos, foi demonstrado que a doença da microcirculação pode ocorrer dissociada temporalmente em relação à doença dos vasos epicárdicos (145). Especialmente, no presente estudo, metade dos pacientes classificados como controles normais encontravam-se inicialmente hospitalizados com diagnóstico clínico de angina instável e, após realizarem cineangiocoronariografia que não identificou lesão coronariana significativa, foram reclassificados como pertencentes ao grupo de controles com coronárias normais. No entanto, o eletrocardiograma de superfície destes pacientes apresentava manifestações de isquemia, sugerindo comprometimento isquêmico do miocárdio. Além disso, neste grupo como um todo, a ventriculografia também demonstrou hipertrofia ventricular esquerda, a qual pode, por sua vez, estar associada a alterações na microcirculação (146).

Em relação a sexo, idade e uso de medicações com ação sobre o sistema cardiovascular houve distribuição uniforme entre os três grupos, embora nenhuma forma de pré-seleção tenha sido realizada para estes fatores. Em relação aos fatores de risco para cardiopatia isquêmica pesquisados, também não houve diferença significativa entre os três grupos, exceto pela baixa prevalência de dislipidemia entre os pacientes com angina instável. No entanto, este achado pode não corresponder ao estado real dos pacientes, uma vez que a presença de dislipidemia foi avaliada como dado histórico e não foi incluída no protocolo a dosagem sistemática de colesterol e triglicéridios.

O número de artérias coronárias epicárdicas comprometidas por lesão aterosclerótica foi avaliado pela cineangiocoronariografia que demonstrou uma prevalência estatisticamente significativa de lesão em três vasos nos pacientes com angina instável em relação aos pacientes com angina estável. No entanto, a extensão da doença coronariana não tem demonstrado associação com achados cineangiocoronariográficos em diversos estudos (119, 120, 147).

A presença de necrose miocárdica pode ser um elemento de confusão na avaliação de fenômenos inflamatórios em relação à fisopatogênia da instabilização da placa coronariana, uma vez que, os mediadores da inflamação podem ser liberados pela área de necrose (148). Nos pacientes estudados, procurou-se excluir a presença de necrose miocárdica através de ausência de alterações eletrocardiográficas sugestivas de infarto agudo do miocárdio ou que dificultassem este diagnóstico e pela medida do nível sérico da CPK-MB. Embora atualmente a troponina T seja considerada um marcador sérico mais sensível da necrose miocárdica, a CPK-MB apresenta boa sensibilidade e especificidade, especialmente quando associada ao quadro clínico e avaliação eletrcardiográfica (149). Outras situações clínicas que poderiam causar confusão em relação à liberação de mediadores inflamatórios, como por exemplo, insuficiência cardíaca congestiva grau III ou IV, cirurgia cardíaca ou infarto agudo do miocárdio nos 6 meses antecedentes, doença

inflamatória aguda ou crônica, uso de medicação antiinflamatória sistêmica, uso de drogas imunossupressoras e neoplasia foram critérios de exclusão para entrada no protocolo.

O método ELISA tem permitido um considerável avanço no estudo de diversas patologias, uma vez que a sua técnica apresenta relativa simplicidade e, principalmente, torna possível a avaliação *in vivo* do comportamento de diversas substâncias. Particularmente, os ensaios da R & D Systems para dosagem de mediadores inflamatórios na circulação pelo método ELISA utilizados neste estudo, também têm sido utilizados por outros autores (14). No entanto, trata-se de metodologia relativamente recente para medição destes marcadores, principalmente no âmbito da cardiopatia isquêmica, e o comportamento biológico de diversos mediadores inflamatórios, principalmente em nível sistêmico, ainda é pouco conhecido. Além disso, a dosagem dos marcadores empregados neste estudo e a utilização do método ELISA quantitativo para esta dosagem foram pioneiros em nosso meio, exigindo que fosse realizado um processo de adequação do método. Com esta finalidade foram executados ensaios teste de TNF- $\alpha$  e IL-2sR em amostras de plasma coletadas de voluntários sem história conhecida de doença e sem fatores de risco maior para cardiopatia isquêmica e em amostras de plasma de pacientes com sepse. Os resultados obtidos nestes indivíduos foram os esperados, com concentrações normais nos voluntários saudáveis e muito elevadas nos pacientes sépticos. Por outro lado, a qualidade das curvas padrão obtidas tanto nos ensaios teste como nos ensaios da amostra e os coeficientes de correção das equações polinomiais de 3º grau resultantes, atestam a adequação dos ensaios realizados. Além disso, as curvas e as amostras foram todas processadas em duplicata para diminuir a variabilidade do método.

### **Concentração plasmática de TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$**

A concentração plasmática normal destas citocinas demonstrada no presente estudo foi um achado não esperado em relação aos pacientes dos grupos de angina estável e angina instável. O TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  são potentes mediadores do sistema inflamatório e sua ação

têm sido estudada em relação a diversos aspectos relacionados à cardiopatia isquêmica. Especificamente, em relação à classificação clínica da doença coronariana, Vaddi e colaboradores descreveram o aumento da síntese destas citocinas *in vitro* por leucócitos mononucleares periféricos de pacientes com cardiopatia isquêmica quando estas células eram estimuladas por mitógenos (138). Estes autores não encontraram diferença entre os níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  produzidos pelas células de pacientes com angina estável ou angina instável e também não houve relação destes níveis com a extensão da doença coronariana identificada por cineangiocoronariografia. No entanto, estes dados são derivados da estimulação de células em cultura, enquanto nós estudamos o comportamento sistêmico do TNF- $\alpha$  e do IFN- $\gamma$  em relação as manifestações clínicas da cardiopatia isquêmica. Interessantemente, Tashiro e colaboradores, ao estudarem pacientes com infarto agudo do miocárdio também não encontraram elevação plasmática da concentração de TNF- $\alpha$ , mesmo em avaliações seqüenciais, porém demonstraram que os monócitos destes pacientes apresentavam capacidade aumentada de produzir esta citocina quando estimulados *in vitro* (150).

Além destes fatos, evidências experimentais sugerem que estas citocinas apresentem aumento transitório da sua secreção em algumas situações e que seus efeitos sejam decorrência de uma ação mais prolongada (97, 107). Talvez, a liberação plasmática de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  durante a instabilização da doença arterial coronariana apresente este padrão transitório e necessite de avaliação seqüencial para sua detecção. Por outro lado, também é possível que a produção destas citocinas seja um fenômeno intra-placa e que a quase totalidade do TNF- $\alpha$  e do IFN- $\gamma$  produzidos esteja ligado aos receptores celulares nos locais onde irão exercer sua função, não ocorrendo portanto tradução sistêmica deste fenômeno. Neste sentido, tem sido sugerido que, talvez, a avaliação do aumento da concentração plasmática dos receptores solúveis do TNF- $\alpha$  possam ser utilizados para melhor definir o perfil biológico desta citocina (151).

### Concentração plasmática do IL-2sR

A concentração plasmática média do IL-2sR permaneceu dentro dos limites da normalidade nos pacientes estudados (valores de referência do ensaio para voluntários normais), exceto para três pacientes do grupo de angina instável. A comparação destes valores médios não mostrou diferença significativa entre os três grupos. A expressão do IL-2sR por linfócitos T é considerada como indicação do estado ativado destas células, sugerindo sua participação no processo imunoinflamatório. Possivelmente, a elevação da concentração plasmática destes receptores esteja associada a um excesso dos mesmos na superfície dos linfócitos T estimulados pela IL-2 (101). Além disso, tem sido demonstrado que os linfócitos T perdem o IL-2R após poucos dias, mantendo outros sinais de ativação continuada, como por exemplo a expressão do MHC classe II (97).

No contexto da aterogênese, vários estudos têm trazido evidências de ativação linfocitária junto à placa aterosclerótica. Neste sentido, a presença de IL-2R em lesões ateromatosas foi demonstrada por Hansson e colaboradores (86). Já, Wal e colaboradores, estudando segmentos de aorta descendente e de artéria coronária descendente anterior, com espessamento intimal, estrias gordurosas e placas ateromatosas, demonstraram a presença do MHC classe II em linfócitos T e monócitos presentes nestas lesões e a presença do IL-2R em reduzido número de linfócitos (87). Estes autores também evidenciaram uma coloração difusa nas lesões estudadas para a presença do IL-2R, o que poderia representar a presença de receptores solúveis da IL-2 neste meio. Finalmente, em estudo de placas ateromatosas coronarianas de pacientes que foram ao óbito por infarto agudo do miocárdio, Wal e colaboradores demonstraram a presença do MHC classe II em monócitos infiltrando o sítio de ruptura da placa (59). Uma vez que, a expressão do MHC classe II em monócitos e células musculares lisas é induzida pelo IFN- $\gamma$  produzido por linfócitos ativados, este achado também sugere que os linfócitos infiltrando o sítio de ruptura da placa ateromatosa são células com atividade imuno-inflamatória (85).

### Concentração plasmática da VCAM-1

A concentração plasmática média da VCAM-1 foi elevada nos três grupos estudados, porém a comparação entre estes valores não mostrou diferença estatisticamente significativa. No entanto, 46% dos pacientes com angina estável apresentaram valores inferiores a média do ensaio (valor de referência), enquanto apenas 5% dos pacientes com angina instável e nenhum paciente do grupo de coronárias normais apresentaram situação semelhante.

A VCAM-1 é uma molécula de adesão da super-família das imunoglobulinas que media a adesão de leucócitos mononucleados ao endotélio vascular, através da interação com contrareceptores presentes nestas células (83). Esta função parece ser essencial para que as células inflamatórias penetrem nos tecidos onde irão exercer sua função a partir da circulação (77). Estudos de modelos animais de aterosclerose demonstram a presença da VCAM-1, induzida por lipopolissacarídeos e dietas ricas em lipídios, principalmente nas células do endotélio luminal dos vasos estudados, sugerindo que a expressão desta molécula possa ser um fenômeno precoce na aterogênese (66, 72). Embora o endotélio vascular seja classicamente identificado como uma das principais fontes da VCAM-1, O'Brien e colaboradores estudando placas ateroscleróticas coronarianas de corações explantados, encontraram maior expressão desta molécula nas células musculares lisas e macrófagos infiltrando a base das lesões e em associação com formação neointimal (82). Com base nestes dados, é possível que o aumento da concentração plasmática da VCAM-1 encontrada nos pacientes por nós estudados com lesão coronariana possa estar relacionado com o aumento da expressão desta molécula no endotélio luminal ou nas células musculares lisas, macrófagos e neovasos da base das lesões. Por sua vez, este aumento pode estar associado à presença de atividade inflamatória, uma vez que a VCAM-1 está envolvida no recrutamento de células inflamatórias e não é uma molécula constitutiva, necessitando estímulo para sua expressão (77, 79). O TNF- $\alpha$ , a IL-1 e a IL-4 têm sido descritos como potentes estímulos para indução da VCAM-1 nas células endoteliais (79, 152). Neste estudo não foi

demonstrado um aumento da concentração plasmática do TNF- $\alpha$ , no entanto, além dos possíveis motivos discutidos anteriormente, especificamente em relação à interação desta citocina com a VCAM-1, sabe-se que o TNF- $\alpha$  pode exercer sua ação localmente sobre as células alvo aumentando a expressão da VCAM-1 e que este aumento é máximo em 6 à 12 horas, permanecendo por cerca de 72 horas independentemente da cessação do estímulo (83, 153). Esta característica cinética da expressão da VCAM-1 a classifica como molécula de adesão associada à fase tardia da atividade inflamatória (79).

O fato da concentração plasmática da VCAM-1 ter sido aumentada em 94% (17/18) dos pacientes com angina instável e também em 54% (8/14) dos pacientes com angina estável, pode estar relacionado à potencial presença de isquemia silenciosa em pacientes com quadro clínico estável, o que obviamente não está contemplado na classificação clínica utilizada neste estudo. Conforme já discutido anteriormente, a isquemia silenciosa têm sido associada à evolução desfavorável da cardiopatia isquêmica e seu tratamento tem sido associado a uma melhora deste prognóstico, sugerindo sua relação com doença biologicamente instável (27). Por outro lado, Hachman e colaboradores estudando pacientes com dislipidemia encontraram elevação da concentração plasmática da VCAM-1 em pacientes com hipertrigliceridemia em relação aos controles sem dislipidemia (concentração plasmática normal de triglicédeos e LDL) e em relação aos pacientes com LDL elevado. No entanto, os pacientes com maiores concentrações plasmáticas das moléculas de adesão em tal estudo, também apresentavam maior número de outros fatores de risco para cardiopatia isquêmica e evidências clínicas de doença aterosclerótica, sugerindo que os achados possam estar associados à aterosclerose propriamente dita(14).

Em nosso estudo, os valores da VCAM-1 foram elevados em amostras de sangue do seio coronário e de sangue periférico sem diferença estatisticamente significativa. Este fato não permite definir a circulação coronariana como local da produção desta molécula. No entanto, também não invalida esta hipótese, uma vez que, o longo tempo de expressão da



VCAM-1 a nível celular pode estar associado a um aumento prolongado de sua concentração plasmática traduzindo-se em elevação dos níveis periféricos.

A elevação da concentração plasmática da VCAM-1 nos pacientes sem lesão identificada pela cineangiocoronariografia em suas artérias epicárdicas, foi um achado inesperado. No entanto, estes pacientes foram encaminhados para exame por apresentarem quadro clínico sugestivo de cardiopatia isquêmica, estando 50% (4/8) deles hospitalizados com diagnóstico clínico de angina instável. Neste sentido, a possibilidade de comprometimento da microcirculação levando a isquemia miocárdica e disfunção endotelial traduzida pelo aumento da concentração plasmática da VCAM-1, não pode ser descartada. A microcirculação é mais sensível às alterações de fluxo, e modificações no padrão de fluxo dinâmico imposto a células endoteliais em cultura foram associadas à expressão de moléculas de adesão por estas células (65). A presença de hipertrofia ventricular esquerda identificada pela ventriculografia nestes pacientes reforça a possibilidade de alteração da microcirculação em associação com disfunção endotelial (146). Por outro lado, a isquemia induzida pelas alterações do endotélio na microcirculação pode ser a responsável pelo aumento da VCAM-1 observado. Neste sentido, a elevação plasmática da VCAM-1 observada nos pacientes com angina instável e em alguns pacientes com angina estável, também poderia estar primariamente associada à presença de isquemia miocárdica e não exclusivamente à atividade inflamatória na placa coronariana.

### **Limitações do estudo**

A interpretação dos resultados obtidos neste estudo deve considerar certas limitações metodológicas. A ausência de um grupo controle formado por indivíduos aparentemente saudáveis dificulta a avaliação dos resultados. O grupo de pacientes com coronárias epicárdicas sem lesão identificada pela cineangiocoronariografia apresentava dor torácica atípica e em 4/8 dos pacientes apresentavam quadro clínico de angina instável. No entanto, não foram realizados testes funcionais para caracterizar ou não a presença de

isquemia. Este grupo portanto, demonstrou ser apenas controle em relação a ausência de lesão anatômica. Embora esta caracterização anatômica seja importante, uma vez que estudamos justamente alterações que dizem respeito à placa coronariana, a simples ausência da lesão pode não ser suficiente para caracterizar o grupo como controle negativo para presença de cardiopatia isquêmica. Em decorrência do tipo de controles que estudamos, os valores de referência utilizados foram aqueles fornecidos pelo fabricante a partir de dados obtidos em voluntários saudáveis. Idealmente, a utilização de controles históricos não é considerada metodologia adequada em pesquisa principalmente em tratando-se de indivíduos ditos como saudáveis, pois suas condições clínicas são essencialmente desconhecidas pelos investigadores.

A possibilidade de contaminação das amostras periféricas coletadas na veia cava superior pelo sangue do seio coronário foi considerada. Para evitar a contaminação das amostras de seio coronário com sangue periférico, as amostras foram coletadas na porção média do seio coronário.

Outra limitação a ser considerada é o fato deste tratar-se de um estudo transversal, permitindo avaliar o comportamento dos marcadores selecionados em relação à cardiopatia isquêmica apenas no momento no qual foi realizada a coleta do sangue.

## **Sumário**

Em resumo, neste estudo não foi possível caracterizar um perfil de atividade imunoinflamatória associado às diferentes classificações clínicas estudadas da cardiopatia isquêmica nos três grupos de pacientes, através da avaliação da concentração plasmática dos mediadores inflamatórios utilizados. Houve elevação da concentração plasmática da VCAM-1 nos três grupos estudados, porém sem distinção entre os mesmos. É possível especular que esta elevação signifique ativação do endotélio vascular em decorrência de isquemia miocárdica presente nos pacientes investigados e não contemplada pela classificação clínica utilizada.

## CONCLUSÕES

- 1- Não foi possível identificar um perfil de atividade imunoinflamatória através da avaliação da concentração plasmática dos mediadores inflamatórios utilizados e sua associação com o quadro clínico da cardiopatia isquêmica.
- 2- Os níveis plasmáticos encontrados de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nos três grupos estudados não foram aumentados em relação aos valores de referência utilizados.
- 3- Os níveis plasmáticos encontrados do IL-2sR não foram indicativos de um estado ativado de linfócitos T em associação com as manifestações clínicas da cardiopatia isquêmica estudadas.
- 4- Houve elevação da concentração plasmática da VCAM-1 uniformemente nos três grupos de pacientes, porém sem estabelecer distinção em relação aos diferentes quadros clínicos apresentados.
- 5- A ausência de diferença estatisticamente significativa entre os valores da concentração plasmática dos mediadores inflamatórios em sangue do seio coronário e sangue periférico, não permite estabelecer a circulação coronariana como fonte destas alterações.

## ESTUDOS COMPLEMENTARES

A análise crítica dos resultados obtidos neste estudo permite o levantamento de algumas questões que poderiam ser abordadas futuramente da seguinte forma:

1- Para estabelecer um grupo controle de indivíduos normais, coletar amostras de sangue de voluntários saudáveis sem história clínica ou fatores de risco para cardiopatia isquêmica. A medição das concentrações plasmáticas dos mediadores inflamatórios neste indivíduos estabeleceria um padrão de valores normais contemporâneos.

2- Para estabelecer a presença ou não de isquemia miocárdica, realizar estudos funcionais para isquemia miocárdica, tais como cintilografia de esforço, ecocardiograma de estresse, nos pacientes estudados.

3- Para determinar o valor preditivo dos diversos marcadores estudados, realizar acompanhamento longitudinal da evolução clínica destes pacientes.

## BIBLIOGRAFIA

1. WHO-MONICA P. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization Monica Project: registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 1994;**90**:583-612.
2. Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994;**90**:2126-2146.
3. Muller J, Abela G, Nesto R, Tofler G. Triggers, acute risk factors and vulnerable plaques: the lexicon of a new frontier. *J Am Coll Cardiol* 1994;**23**:809-813.
4. Finizola B, Granero R, Hassel T, Labarthe D, Champagne B, Schrgrotsky H, et al. Enfermedades cardiovasculares e cerebrovasculares en las americas. *Fundación Interamericana del Corazón* 1996;**18**.
5. Pooling Project Research Group. Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to incidence of major coronary events: final report of the Pooling project. *J Chron Dis* 1978;**31**:201.
6. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993;**362**:801-809.
7. Stern M. The recent decline in ischemic heart disease mortality. *Ann Intern Med* 1979;**91**:630.

8. Castelli W, Garrison R, Wilson P, et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986;**256**:2835-2838.
9. Stampfer M, Sacks F, Salvini S, Willett W, Hennekens C. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991;**325**:373-81.
10. Holme I. Relation of coronary heart disease incidence and total mortality to plasma cholesterol reduction in randomised trials: use of meta-analysis. *Br Heart J* 1993;**69**:S42-S47.
11. Cobbe S, Shepherd J. Cholesterol reduction in prevention of coronary heart disease: therapeutic rationale and guidelines. *Br Heart J* 1993;**69**:S63-S69.
12. Ross R. Atherosclerosis: A defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 1993;**143**(4):987-1002.
13. McGill H. The relationship of dietary cholesterol to serum cholesterol concentration and atherosclerosis in man. *Am J Clin Nutr* 1979;**32** (suppl.):2664.
14. Hackman A, Aba Y, Insull W, Pownall H, Smith L, Dunn K, et al. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 1996;**93**:1334-1338.
15. Dzau V. Atherosclerosis and hypertension: mechanisms and interrelationships. *J Cardiovasc pharmacol* 1990;**15** (suppl.):S59-S64.

16. Yusuf S, Wittes J, Friedman L. Overview of results of randomized clinical trials in heart disease. II Unstable angina, heart failure, primary prevention with aspirin, and risk factor modification. *JAMA* 1988;**260**:2259.
17. Kaplan N. Cardiovascular risk reduction: The role of antihypertensive treatment. *Am J Med* 1988;**90**:19S.
18. Garcia M, McNamara P, Gordon T, Kannel W. Sixteen year follow-up study. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. *Diabetes* 1976;**23**:105.
19. Guillausseau P, Dupuy E, Bryckaert M, Timsit J, Chanson P, Tobelem G, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) in type 1 diabetes melitus. *Eur J Clin Invest* 1989;**19**:172-175.
20. Bucala R, Tracey K, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest* 1991;**87**:432-438.
21. Stolar M. Atherosclerosis in diabetes. The role of hyperinsulinemia. *Metabolism* 1988;**37(suppl.)**:S1.
22. Trap-Jensen J. Effects of smoking on the heart and peripheral circulation. *Am Heart J* 1988;**111**:932.
23. Simionescu M, Simionescu N. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J* 1993;**7**:1359-1366.

24. Mehta J. Endothelium, coronary vasodilation, and organic nitrates. *Am Heart J* 1995;**129**:382-390.
25. Cook D, Shaper A. Breathlessness, angina pectoris and coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1989;**63**:921.
26. Forrester J, Wyatt H, Daluz P, et al. Functional significance of regional ischemic contraction abnormalities. *Circulation* 1976;**54**:64.
27. Pepine C. Prognostic implications of silent myocardial ischemia. *N Engl J Med* 1996;**334**:113-114.
28. Theroux P. A pathophysiologic basis for the clinical classification and management of unstable angina pectoris. *Circulation* 1987;**75** (Suppl.):V-V103.
29. Forrester J, Litvack F, Grundfest W, Hickey A. A perspective of coronary disease seen through the arteries of living man. *Circulation* 1987;**75**:505-13.
30. Braunwald E. Unstable Angina: a classification. *Circulation* 1989;**80**:410-414.
31. van Zijl A, Simoons M, Veerhoer R, Bossuyt P. Incidence and follow-up of Braunwald subgroups in unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol* 1995;**25**:1286-92.
32. Fahri J, Cohen M, Fuster V. The broad spectrum of unstable angina pectoris and its implication for controlled trials. *Am J Cardiol* 1986;**58**:547-550.



33. Gorlin R, Fuster V, Ambrose J. Anatomic-physiologic links between acute coronary syndromes. *Circulation* 1986;**74**:6-9.
34. Pasternak R, Braunwald E, Sobel B. Acute myocardial infarction. *in: Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine* 1992;**2**:1200-1288.
35. Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. I. *N Engl J Med* 1992;**326**:242-250.
36. Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. II. *N Engl J Med* 1992;**326**:310-318.
37. Myerburg R, Castellanos A. Cardiac arrest and sudden cardiac death. *in: Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine* 1992;**I**:756-789.
38. Davies M, Thomas A. Thrombosis and acute coronary artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med* 1984;**310**:1137.
39. Rogers W, Bourassa M, Andrews T, et al. Asymptomatic Cardiac Ischemic Pilot (ACIP) study: outcome at 1 year for patients with asymptomatic cardiac ischemia randomized to medical therapy or revascularization. *J Am Coll Cardiol* 1995;**26**:594-605.
40. Gill J, Cairns J, Roberts R, Tech M, Costantini L, Saley B, et al. Prognostic importance of myocardial ischemia detected by ambulatory monitoring early after acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1996;**334**:65-70.

41. Stary H. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989;**9** (Suppl.):19-32.
42. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;**91**:2844-2850.
43. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;**89**:2462-2478.
44. Davies M, Woolf N, Rowles P, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* 1988;**60**:459-464.
45. Wright H. Endothelial mitosis around aortic branches in normal guinea pigs. *Nature* 1968;**220**:78-79.
46. Schwenke D, Carew T. Quantification in vivo of increased LDL content and rate of LDL degradation in normal rabbit aorta occurring at sites susceptible to early atherosclerotic lesions. *Cir Res* 1988;**62**:699-710.
47. Gerrity R. Role of monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-born monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981;**103**:181-190.
48. Gown A, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1986;**125**:191-207.

49. Emeson E, Robertson A. T lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am J Pathol* 1988;**130**:369-375.
50. Guyton J, Klemp K. Transitional features in human atherosclerosis. Intimal thickening, cholesterol clefts, and cell loss in human aortic fatty streaks. *Am J pathol* 1993;**143**(5):1444-1457.
51. Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the non human primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 1984;**4**:323-40.
52. Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the non human primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 1984;**4**:341-56.
53. Gordon D, Reidy M, Benditt E, Schwartz S. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:4600-4604.
54. Munro J, Cotran R. The pathogenesis of atherosclerosis: Atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988;**58**:249-261.
55. Getz G. An overview of atherosclerosis: A look to the future. *Toxicol Pathol* 1990;**18**(4(Part I)):623-635.
56. Libby P, Hansson G. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* 1991;**64**:5-15.

57. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson G. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1986;**6**:131-138.
58. Richardson P, Davies M, Born G. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1989;**2**:941-944.
59. van Der Wal A, Becker A, van Der Loos C, Das P. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;**89**:36-44.
60. Schwartz CJ, Kelley JL, Nerem RM, Sprague EA, Rozek MM, Valente AJ, et al. Pathophysiology of the atherogenic process. *Am J Cardiol* 1989;**64**:23G-30G.
61. Virchow R. Atheromatous affection of arteries. *Nutrition Rev* 1856;**47**:23-25
62. Ross R, Glomset J. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J* 1976;**420**:295-369.
63. Davies M, Woolf N. Atherosclerosis: what is it and why does it occur? *Br Heart J* 1993;**69**(Suppl.):S3-11.
64. Pettersson K, Bjork H, Bondjers G. Endothelial integrity and injury in atherogenesis. *Transplant Proc* 1993;**25**(2):2054-2056.

65. Nagel T, Resnick N, Atkinson W, Dewey C, Gimbrone M. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;**94**:885-891.
66. Cybulsky M, Gimbrone M. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;**251**:788-791.
67. Zimmerman G, Prescott S, McIntyre T. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunology Today* 1992;**13**:93-99.
68. Merhi Y, Lacoste L, Lam J. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. *Circulation* 1994;**90**:997-1002.
69. Pober J, Cotran R. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;**50**:537-544.
70. Korthuis R, Anderson D, Granger D. Role of neutrophil-endothelial cell adhesion in inflammatory disorders. *J Crit Care* 1994;**9**:47-71.
71. Nawroth P, Waldherr R, Zhang Y, Blerhaus L, Lu J, Riedesel J, et al. Mechanism of endothelial cell activation. *Transplantation Proc* 1993;**25**:2052-2053.
72. Li H, Cybulsky M, Gimbrone M, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1 a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993;**13**:197-204.

73. Vogel R. Endothelium-dependent vasoregulation of coronary artery diameter and blood flow. *Circulation* 1993;**88**:325-326.
74. Laurindo F, Pedro M, Barbeiro H, Pileggi F, Carvalho M, Augusto O, et al. Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res* 1994;**74**:700-709.
75. Laurindo F, Luz P, Uint L, Rocha T, Jaeger R, Lopes E. Evidence for superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs. *Circulation* 1991;**83**:1705-1715.
76. Ciuffetti G, Lombardini R, Paltriccia R, Santambrogio L, E M. Human leukocyte-endothelial interactions in peripheral arterial occlusive disease. *Eur J Clin Invest* 1994;**24**:65-68.
77. Jang Y, Lincoff A, Plow E, Topol E. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;**24**:1591-601.
78. Adams D, Shaw S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet* 1994;**343**:831-836.
79. Pober J, cotran R. What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues. *J Lab Invest* 1991;**64**:301-305.
80. Oppenheimer-Marks N, Davies L, Bogue D, Ramberg J, Lipsky P. Diferential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* 1991;**147**:2913-2921.

81. Dayer J, Isler P, Nicod L. Adhesion molecules and cytoquine production. *Am Rev Respir Dis* 1993;**148** (S):S70-74.
82. O'Brian K, Allen M, McDonald T, Chait A, Harian J, Fishbein D, et al. Vascular cell adhesion molecules-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993;**92**:945-941.
83. Bevilacqua M, Nelson R, Mannori G, Cecconi O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med* 1994;**45**:361-78.
84. Leibovich S, Polverini P, Shepard H, Wiseman D, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor alfa. *Nature* 1987;**329**:630-632.
85. Nacy C, Meltzer M. T-cell-mediated activation of macrophages. *Current Opinion in Immunology* 1991;**3**:330-335.
86. Hansson G, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989;**135**:169.
87. van Der Wal A, Das P, van De Berg D, van Der Loos C, Becker A. Atherosclerotic lesions in humans. *In situ* immunophenotypic analysis of an immune mediated response. *Lab Invest* 1989;**61**(2):166-170.
88. Ross R. The role of T lymphocytes in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:2879.

89. Castelli W. The fact and fiction of lowering cholesterol concentrations in the primary prevention of coronary heart disease. *Br Heart J* 1993;**69**:S70-S73.
90. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew T, Khoo J, Witztum J. Beyond cholesterol. Modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;**320**:915-924.
91. Witztum J, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991;**88**:1785-1792.
92. Cushing S, Berliner J, Valente A, Territo M, Navab M, Parhami F, et al. Minimally modified low density lipoprotein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990;**87**:5134-5138.
93. Lehr H, Krombach F, Münzing S, Bodlaj R, Glaubitt S, Seiffge D, et al. *In vitro* effects of oxidized low density lipoprotein on CD11b/CD18 and L-selectin presentation on neutrophils and monocytes with relevance for the *in vivo* situation. *Am J Pathol* 1995;**146**:218-227.
94. Parthasarathy S, Young S, Witztum J, Pittman R, Steinberg D. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1986;**77**:641-644.
95. Carew T, Schwenke D, Steinberg D. Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: Evidence that anti-oxidants *in vivo* can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage rich fatty streaks and slow progression



of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc Natl Acad Sci* 1987;**84**:7725-7729.

96. Steinberg D. Clinical trials of antioxidants in atherosclerosis: are we doing the right thing? *Lancet* 1995;**346**:36-38.

97. Kelso A. Cytokines: structure, function and synthesis. *Current Opinion in Immunology* 1989;**2**:215-225.

98. Lowry S. Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 1993;**128**:1235-1241.

99. Nilsson J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Resear* 1993;**27**:1184-1190.

100. Junming L, Vilcek J. Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987;**56**:234-248.

101. Mizel S. The interleukins. *FASEB J* 1989;**3**:2379-2389.

102. Moyer C, Sajuthi D, Tulli H, Williams J. Synthesis of IL-1 alpha e IL-1 beta by arterial cells in atherogenesis. *Am J Pathol* 1991;**138**:951-960.

103. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *J Lab Invest* 1987;**56**:234-248.

104. Hansson G. Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993;**69** (suppl.):38-S 41.
105. Clausell N, Molossi S, Rabinovitch M. Increased interleukin-1 beta and fibronectin expression are early features of the development of the postcardiac transplant coronary arteriopathy in piglets. *Am J Pathol* 1993;**142**:1772-1786.
106. Molossi S, Clausell N, Rabinovitch M. Reciprocal induction of tumor necrosis factor alfa and interleukin -1 beta activity mediates fibronectin synthesis in coronary artery smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1995;**163**:19-29.
107. Barath P, Fishbein M, Cao J, Berenson J, Helfant R, Forrester J. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol* 1983;**65**:297.
108. Clausell N, Molossi S, Sett S, Rabinovitch M. *In vivo* blockade of tumor necrosis factor alfa in cholesterol-fed rabbits after cardiac transplant inhibits acute coronary artery neointimal formation. *Circulation* 1994;**89**:2768-2779.
109. Clausell N, Correa de Lima V, Molossi S, Liu P, Turley E, Gotlieb A, et al. Expression of tumor necrosis factor alfa and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. *Br Heart J* 1995;**73**:534-539.
110. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;**334**:1717-1725.

111. Scheurich P, Thomas B, Ücer U, Pfizenmaier K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor: induction of TNF receptors on human T cells and TNF- $\alpha$ -mediated enhancement of T cell responses. *J Immunol* 1987;**138**:1788-1790.
112. Lefer A, Xin-Liang M. Cytokines and growth factors in endothelial dysfunction. *Crit Care Med* 1993;**21**:S9-S14.
113. Ito A, Sato T, Iga T, Mori Y. Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. *FEBS* 1990;**269**:93-95.
114. Hansson G, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of alpha smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med* 1989;**170**:1595-608.
115. Davies M, Thomas A. Plaque fissuring: the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death and crescendo angina. *Br Heart J* 1985;**53**:363-373.
116. Falk E, Shah P, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;**92**:657-671.
117. Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J* 1983;**50**:127-134.
118. Davies M. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation* 1990;**82(suppl II)**:II-38-II46.

119. Ambrose J, Winters S, Arora R, Eng A, Riccio A, Gorlin R, et al. Angiographic evolution of coronary artery morphology in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1986;**7**:1176-1181.
120. Giroud D, Li J, Urban P, Meier B, Rutishauer W. Relation of the site of myocardial infarction to the most severe coronary arterial stenosis at prior angiography. *Am J Cardiol* 1992;**69**:729-732.
121. Brown B, Zhao X, Sacco D, Albers J. Arteriographic view of treatment to achieve regression of coronary atherosclerosis and to prevent plaque disruption and clinical cardiovascular events. *Br Heart J* 1993;**69**:S48-S53.
122. Feyter P, Ozaki Y, Baptista J, Escaned J, Di Mario C, Jaegere P, et al. Ischemia-related lesion characteristics in patients with stable or unstable angina. A study with intracoronary angioscopy and ultrasound. *Circulation* 1995;**92**:1408-1413.
123. Hodgson J, Reddy K, Suneja R, Nair R, Lesnefsky E, Sheehan H. Intracoronary ultrasound imaging: correlation of plaque morphology with angiography, clinical syndrome and procedural results in patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1993;**21**:35-44.
124. Toussaint J, Southern J, Fuster V, Kantor H. <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy of human atherosclerotic lesions. Relation between fatty acid saturation, cholesteryl ester content, and luminal obstruction. *Arterioscler Thromb* 1994;**14**:195-197.

125. Moreno P, Falk E, Palacios I, Newell J, Fuster V, Fallon J. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;**90**:775-778.
126. Buja L, Willerson J. Role of inflammation in coronary plaque disruption. *Circulation* 1994;**89**:503-505.
127. Carry M, Korley V, Willerson J, Weigelt L, Ford-Hutchinson A, Tagari P. Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. *In vivo* evidence for 5-lipoxygenase activation. *Circulation* 1992;**85**:230-236.
128. Berk B, Weintraub W, Alexander R. Elevation of C-reactive protein in active coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990;**65**:168-172.
129. Liuzzo G, Biasucci L, Gallimore R, Grillo R, Rebuffi A, Pepys M, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;**331**:417-424.
130. Kohchi K, Takebayashi S, Hiroki T, Noboyoshi M. Significance of adventitial inflammation of the coronary artery in patients with unstable angina: results at autopsy. *Circulation* 1985;**71**:709-716.
131. Blum A, Sclarovsky S, Shohat B. T lymphocyte activation in stable angina pectoris and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 1995;**91**:20-22.

132. Sernieri G, Abbate R, Gori A, Attanasio M, Martini F, Giusti B, et al. Transient intermittent lymphocyte activation is responsible for the instability of angina. *Circulation* 1992;**86**:790-797.
133. De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Gritti D, et al. Clinical and angiographic correlates of leukocyte activation in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1995;**26**:1146-1150.
134. Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Pasotti D, et al. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1993;**88**:358-363.
135. Mehta J, Dinerman J, Mehta P, et al. Neutrophil function in ischemic heart disease. *Circulation* 1989;**79**:549-556.
136. Hansen P. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995;**91**:1872-1885.
137. Biasucci L, D'Onofrio G, Liuzzo G, Zini G, Monaco C, Caligiuri G, et al. Intracellular neutrophil myeloperoxidase is reduced in unstable angina and acute myocardial infarction, but its reduction is not related to ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1996;**27**:611-616.
138. Vaddi K, Nicolini F, Mehta P, Mehta J. Increased secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon gamma by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 1994;**90**:694-699.

139. Airaghi L, Lettino M, Manfredi M, Lipton J, Catania A. Endogenous cytokine antagonists during myocardial ischemia and thrombolytic therapy. *Am Heart J* 1995;**130**:204-211.
140. Galis Z, Sukhova G, Lark M, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;**94**:2493-2503.
141. Brown D, Hibbs M, Kearney M, Loushin C, Isner J. Identification of 92-KD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina. *Circulation* 1995;**91**:2125-2131.
142. Bone R, Fisher C, Clemmer T, et al.. Sepsis syndrome: A valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989;**17**:389.
143. Wilson R. Assessing the severity of coronary-artery stenoses. *N Engl J Med* 1996;**334**:1735-1737.
144. Pijls N, Bruney B, Peels K, van Der Vooter P, Bonnier H, Bartunek J, et al. Measurement of fractional flow reserve to assess the functional severity of coronary-artery stenoses. *N Engl J Med* 1996;**334**:1703-1708.
145. Clausell N, Butany J, Molossi S, Lonn E, Gladstone P, Rabinovitch M, et al. Abnormalities in intramyocardial arteries detected in cardiac transplant biopsy specimens and lack of correlation with abnormal intracoronary ultrasound or endothelial dysfunction in large epicardial coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1995;**26**:110-119.

146. Grover-Mackey M, Schwaiger M, Krivokapich J, et al.. Regional myocardial blood flow and metabolism at rest in mildly symptomatic patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1989;**13**:317.
147. Bär F, Raynaud P, Renkin J, Vermeer F, Zwaan C, Wellens H. Coronary angiographic findings do not predict clinical outcome in patients with unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1994;**24**:1453-1459.
148. Alexander R. Inflammation and coronary disease. *N Engl J Med* 1994;**331**:468-469.
149. Katus H, Remppis A, Neumann F, Scheffold T, Diederich K, Vinar G, et al. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* 1991;**83**:902-912.
150. Tashiro H, Shimokawa H, Yamamoto K, Nagamo M, Momohara M, Muramatu K, et al. Monocyte-related cytokines in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1995;**130**:446-52.
151. Packer M. Is tumor necrosis factor an important neurohormonal mechanism in chronic heart failure? *Circulation* 1995;**92**:1379-1382.
152. Iademarco M, Barks J, Dean D. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF- $\alpha$  in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;**95**:264-261.
153. Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990;**62**:3-6.