

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cardiologia

**ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES IMUNOINFLAMATÓRIOS
PLASMÁTICOS COM PARÂMETROS ECOGRÁFICOS DE
ATEROSCLEROSE E COM FATORES DE RISCO
CARDIOVASCULAR**

Tese de Doutorado

LUIS EDUARDO PAIM ROHDE

ORIENTADOR: PROF. DR. JORGE PINTO RIBEIRO
CO-ORIENTADORES: PROF. DR. RICHARD THEODORE LEE
PROF. DR. PAUL M. RIDKER

Porto Alegre, agosto de 1999

AGRADECIMENTOS

O autor recebeu suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no período de 07/96 a 06/98 na forma de Bolsa de Doutorado Sanduíche, suporte que viabilizou a realização dos projetos de pesquisa que foram incorporados nessa tese. Alguns dos estudos dessa tese também receberam auxílio indireto de fundos de pesquisa do “National Institute of Health” (HL 54759 para Richard T. Lee), do “National Heart Lung and Blood Institute” e por um “Established Investigator Award” da “American Heart Association” (para Paul M. Ridker).

O autor agradece ao Dr. Richard T. Lee e Dr. Paul M. Ridker pelo inestimável auxílio na elaboração intelectual e orientação no encaminhamento dos projetos de pesquisa que perfazem esta tese, bem como no preparo dos manuscritos. Da mesma forma, agradece ao Serviço de Cardiologia do *Brigham and Women's Hospital* e, em especial, ao chefe daquele Serviço, Prof. Peter Libby, pela oportunidade de conviver em uma ambiente de pesquisa altamente científico e de tão elevado prestígio internacional.

O autor está em inestimável débito com o orientador Prof. Jorge Pinto Ribeiro por ter oportunizado a experiência de participar e conviver em um meio acadêmico de alto nível e pela capacidade de, mesmo à distância, participar de todas as etapas importantes da elaboração intelectual, viabilização e redação dessa tese.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, carinho e confiança em todos os momentos importantes dessa trajetória.

À Carisi, minha esposa e companheira, porque sem ela, todas as conquistas perderiam o seu sentido maior.

ÍNDICE REMISSIVO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
CAPÍTULO I – Introdução.....	1
CAPÍTULO II - Marco teórico	
Fatores de risco para doença aterosclerótica cardiovascular	6
Tipos de lesões ateroscleróticas	10
Ultra-som e avaliação não-invasiva de aterosclerose	13
Marcadores séricos imunoinflamatórios	15
CAPÍTULO III – Objetivos	22
CAPÍTULO IV – Material e métodos	
Protocolo I	23
Protocolo II	24
Análise dos dados	29
CAPÍTULO V – Resultados	
Protocolo I	32
Protocolo II	42
CAPÍTULO VI – Discussão	
Protocolo I	55
Protocolo II	63

CAPÍTULO VII – Conclusões..... 72

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....73

ANEXO I – Trabalhos publicados e apresentados 90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática da evolução das lesões ateroscleróticas.
- Figura 2. Exemplo representativo de um corte longitudinal do segmento distal da artéria carótida comum, bifurcação carotídea e da artéria carótida interna (parte superior) e da mensuração da EIM carotídea (parte inferior).
- Figura 3. Níveis plasmáticos das moléculas de adesão de acordo com tertis de espessura íntima-média (EIM) das artérias carótidas comum (CC), bifurcação carotídea (BIF) e espessura íntima-média máxima (MAX).
- Figura 4. Níveis das moléculas de adesão de acordo com a presença de placas ateroscleróticas no sistema carotídeo.
- Figura 5. Níveis de interleucina-6 de acordo com o diâmetro aórtico corrigido.
- Figura 6. Histograma de distribuição dos níveis de sICAM-1 entre homens aparentemente saudáveis.
- Figura 7. Histograma de distribuição dos níveis de PCR (antes e após transformação logarítmica) entre homens aparentemente saudáveis.
- Figura 8. Níveis de sICAM-1 de acordo com os valores de pressão arterial sistólica e diastólica estratificados a cada 10 mmHg.
- Figura 9. Níveis de PCR de acordo com os valores de pressão arterial sistólica e diastólica estratificados a cada 10 mmHg.
- Figura 10. Níveis de sICAM-1 estratificados pela história de tabagismo (Figura superior). Correlação entre os níveis de sICAM-1 e o número de cigarros fumados por dia entre os fumantes atuais (Figura inferior).
- Figura 11. Percentual de homens aparentemente saudáveis que se exercitavam menos ou mais do que uma vez por semana, de acordo com a distribuição em quartis de sICAM-1.
- Figura 12. Níveis de sICAM-1 e PCR de acordo com o número de fatores de risco tradicionais presentes entre homens aparentemente saudáveis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos participantes do protocolo I.

Tabela 2. Tertis de distribuição da EIM da artéria carótida comum, bifurcação carotídea e espessura máxima.

Table 3. Coeficientes de correlação não-ajustados e ajustados para idade entre sVCAM-1 e sICAM-1 e EIM carotídea.

Tabela 4. Níveis estimados de sVCAM-1 (ng/ml) de acordo com tertis de EIM carotídea corrigidos para fatores de risco para doença cardiovascular.

Tabela 5. Níveis estimados de sICAM-1 (ng/ml) de acordo com tertis de EIM carotídea corrigidos para fatores de risco para doença cardiovascular.

Tabela 6. Valores de sICAM-1 e PCR de acordo com fatores de risco cardiovascular definidos pela história clínica.

Tabela 7. Coeficientes de correlação não-ajustados e ajustados para idade entre os níveis plasmáticos de sICAM-1 e PCR e fatores de risco cardiovascular.

Tabela 8. Fatores de risco cardiovascular plasmáticos estratificados por quartis de sICAM-1 e PCR.

RESUMO

Fundamento: Diversos estudos recentes sugerem que processos imunoinflamatórios têm um papel crítico na formação, progressão e instabilização de lesões ateroscleróticas. Estudos que avaliaram marcadores imunoinflamatórios circulantes em síndromes ateroscleróticas clínicas ou assintomáticas, entretanto, são limitados, particularmente no que diz respeito a sua associação com parâmetros não-invasivos de lesões vasculares e sua associação com fatores de risco tradicionais para doença cardiovascular.

Objetivos: Avaliar a associação entre marcadores imunoinflamatórios plasmáticos e (I) características ecográficas de aterosclerose e (II) fatores de risco para doença cardiovascular aterosclerótica.

Pacientes: Para o protocolo ecográfico (protocolo I), foram estudados 120 pacientes referidos para um estudo ecocardiográfico ao laboratório de métodos não-invasivos de um hospital universitário terciário. A espessura das camadas íntima e média (EIM) carotídea e o diâmetro aórtico abdominal foram avaliados através de estudo ultrassonográfico. Para o protocolo de fatores de risco cardiovascular (protocolo II), foram avaliados indivíduos participantes do estudo *Physicians' Health Study* sem doença cardiovascular clínica no momento da coleta do sangue.

Delineamento: Estudos transversais.

Resultados: *Protocolo I* - Pacientes ($n=120$, 65 ± 19 anos, 52% homens) com espessamento carotídeo pronunciado (tertil superior de EIM) apresentaram níveis plasmáticos elevados da molécula de adesão celular vascular 1 (sVCAM-1), quando comparados com pacientes no tertil inferior de EIM em todos os segmentos carotídeos estudados (773 ± 419 vs. 564 ± 191 ng/ml para carótida comum; 826 ± 444 vs. 560 ± 175 ng/ml para a bifurcação carotídea; 787 ± 429 vs. 535 ± 158 ng/ml para EIM carotídea máxima; todos valores de $p<0,05$). As mesmas diferenças foram observadas para a molécula de adesão intercelular 1 (sICAM-1) entre os tertis superior e inferior de EIM da artéria carótida comum (376 ± 171 vs. 263 ± 112 ng/ml; $p<0,05$). Em análise multivariada, após controle para idade, hipertensão, *diabetes mellitus*, tabagismo, perfil lipídico e níveis de homocisteína total, sVCAM-1 ($p<0,01$) foi o único marcador que permaneceu significativamente associado com EIM máxima, enquanto que sICAM-1 ($p<0,05$), *diabetes mellitus* ($p<0,01$) e idade ($p<0,01$) permaneceram associadas com EIM

na artéria carótida comum e bifurcação carotídea. Nas análises dos diâmetros da aorta abdominal, níveis plasmáticos de interleucina-6 (IL-6) aumentaram progressivamente de acordo com o diâmetro aórtico corrigido para superfície corporal. Os níveis de IL-6 para pacientes com dimensão aórtica normal (diâmetro baixo [$<0,84 \text{ cm/m}^2$] e alto [$\geq 0,84 \text{ cm/m}^2$]) foram $2,3 \pm 1,2 \text{ pg/ml}$ e $2,7 \pm 0,9 \text{ pg/ml}$, respectivamente, e atingiram um pico no subgrupo de pacientes com dilatação aórtica ($3,2 \pm 0,9 \text{ pg/ml}$, p para tendência = 0,039). Nos 113 participantes sem dilatação aórtica, o diâmetro aórtico foi positivamente associado com os níveis plasmáticos de IL-6 ($p < 0,01$), proteína amilóide A ($p < 0,01$) e homocisteína total ($p = 0,01$). Níveis de proteína C-reativa (PCR) e das moléculas de adesão não se associaram significativamente com o diâmetro aórtico abdominal.

Protocolo II - Nessa estudo ($n = 1374$; apenas homens), foram encontradas associações significativas entre sICAM-1 e PCR com níveis de pressão arterial sistólica (ambos $p < 0,001$) e diastólica (ambos $p < 0,001$), triglicerídeos (ambos $p < 0,001$), fibrinogênio (ambos $p < 0,001$), antígeno ativador de plasminogênio tecidual (ambos $p < 0,001$), homocisteína total ($p = 0,02$ e $p < 0,001$; respectivamente), número de cigarros fumados por dia (ambos $p < 0,001$) e índice de massa corporal (ambos $p < 0,001$). Também foi observada uma correlação inversa entre esses marcadores e níveis séricos de colesterol de lipoproteína de alta densidade (ambos $p < 0,001$) e atividade física regular (ambos $p < 0,05$). Em análise multivariada, os diversos fatores de risco avaliados explicaram 28% da variância das concentrações plasmáticas de sICAM-1 e PCR. Finalmente, sICAM-1 e PCR elevaram-se progressivamente com o aumento do número de fatores de risco tradicionais para doença cardiovascular (p para tendência $< 0,001$).

Conclusões – O grau de espessamento carotídeo avaliado por ultra-som está associado, de forma independente, aos níveis plasmáticos das moléculas de adesão sICAM-1 e sVCAM-1, enquanto que as dimensões aórticas corrigidas estão associadas a níveis de IL-6, homocisteína e proteína amilóide A. As concentrações plasmáticas de sICAM-1 e PCR estão associadas com diversos fatores de risco cardiovascular. Essa associação parece ter um caráter cumulativo de acordo com o número de fatores de risco em cada indivíduo. Esses achados estão de acordo com diversas evidências experimentais que sugerem que inflamação tem um papel crítico em diversas síndromes ateroscleróticas.

ABSTRACT

Background: Several studies suggest that immunoinflammatory processes might have a critical role in atherogenesis. Studies that evaluated immunoinflammatory markers in pre-clinical or clinical atherosclerotic syndromes, however, are scarce, particularly with regard to the association between these markers and noninvasive characteristics of vascular lesions and traditional cardiovascular risk factors.

Objectives: To evaluate the association between plasmatic immunoinflammatory markers and (1) echographic parameters of atherosclerosis and (2) established risk factors for cardiovascular disease.

Patients: For the echographic protocol (protocol I), we studied 120 patients referred to the noninvasive cardiac laboratory of a tertiary university hospital. Carotid intimal to medial thickness (IMT) and abdominal aortic diameters were evaluated by ultrasound interrogation in all subjects. For the cardiovascular risk factor protocol (protocol II), subjects apparently free from cardiovascular disease that participated in the *Physicians' Health Study* were studied.

Design: Cross-sectional prospective study.

Results: Protocol I - Patients (n=120, 65 ± 19 years, 52% men) with marked carotid thickening (superior IMT tertile) had higher levels of circulating vascular adhesion molecule-1 (sVCAM-1) when compared to the inferior IMT tertile in all segments of the carotid artery (773 ± 419 vs. 564 ± 191 ng/ml for the common carotid; 826 ± 444 vs. 560 ± 175 ng/ml for the carotid bifurcation; and 787 ± 429 vs. 535 ± 158 ng/ml for the maximal carotid IMT, all p values < 0.05). Similar differences between IMT tertiles were observed for circulating intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) at the common carotid (376 ± 171 vs. 263 ± 112 ng/ml; p < 0.05). In multivariate analysis after adjustment for age, hypertension, diabetes mellitus, smoking, lipid profile and homocysteine levels, sVCAM-1 (p<0.01) was the only variable that remained significantly associated with maximal IMT, whereas sICAM-1 (p<0.05), diabetes mellitus (p<0.01) and age (p<0.01) were the only independent correlates for both common carotid and bifurcation IMTs. With regard to abdominal aortic dimensions, plasma levels of interleukin-6 (IL-6) had a stepwise increase according to aortic diameters indexed to body surface area. IL-6 levels in patients with normal aortic

diameters (lower diameter [$<0.84 \text{ cm/m}^2$] and higher [$\geq 0.84 \text{ cm/m}^2$]) were $2.3 \pm 1.2 \text{ pg/ml}$ and $2.7 \pm 0.9 \text{ pg/ml}$, respectively, and peaked in the subgroup of patients with aortic dilation ($3.2 \pm 0.9 \text{ pg/ml}$, p for trend = 0.039). Among 113 participants without aortic dilation, indexed aortic diameter was positively associated with circulating IL-6 levels ($p < 0.01$), serum amyloid A ($p < 0.01$) and total homocysteine ($p = 0.01$). C-reactive protein (CRP) and adhesion molecules plasma concentrations were not associated with indexed aortic diameter. **Protocol II** – In this study ($n = 1374$, 100% men), we found significant association between circulating levels of sICAM-1 and CRP with levels of systolic (both $p < 0.001$) and diastolic blood pressure (both $p < 0.001$), triglycerides (both $p < 0.001$), fibrinogen (both $p < 0.001$), tissue-type plasminogen activator antigen (both $p < 0.001$) total homocysteine ($p = 0.02$ e $p < 0.001$; respectively), number of cigarettes smoked per day (both $p < 0.001$) and body mass index (both $p < 0.001$). We also observed a significant inverse association between these markers and serum levels of high density lipoprotein cholesterol (both $p < 0.001$) and regular physical activity (both $p < 0.05$). In multivariate analysis, all cardiovascular risk factors explained 28% of the variance of both sICAM-1 and CRP levels. Finally, sICAM-1 e CRP progressively increased according to the number of cardiovascular risk factors (p for trend < 0.001).

Conclusions – Ultrasound-based carotid thickening is independently associated with sICAM-1 and sVCAM-1 levels, whereas indexed aortic dimensions are associated with IL-6, total homocysteine and serum amyloid A. Plasmatic concentrations of sICAM-1 and CRP are associated with several cardiovascular risk factors. This association seems to have a cumulative pattern according to the number of risk factors in each subject. These findings are in agreement with several lines of evidence that suggest that inflammation may have a critical role in atherosclerotic syndromes.

LISTA DE ABREVIATURAS

EIM – espessura íntima-média

IL – interleucina

HDL – lipoproteína de alta densidade

LDL – lipoproteína de baixa densidade

PCR – proteína C-reativa

sICAM-1 – fração solúvel da molécula de adesão intercelular 1

sVCAM-1 – fração solúvel da molécula de adesão vascular celular 1

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Diversas características clínicas associadas a um risco aumentado de desenvolvimento e progressão do processo aterosclerótico foram estabelecidas nas últimas décadas. Dentre os fatores de risco tradicionalmente mais estudados nesse contexto destacam-se a idade avançada, sexo masculino, história familiar de cardiopatia isquêmica precoce, níveis tensionais arteriais elevados, perfil lipídico propício, presença de *diabetes mellitus* e tabagismo (1,2). Dados do estudo de Framingham demonstram que cada um desses fatores está associado, de forma independente e sinérgica, a uma incidência progressivamente maior de doenças cardiovasculares de origem aterosclerótica (3). Paralelamente às evidências de caráter epidemiológico, o avanço no entendimento do papel etiopatogênico dos diferentes fatores de risco cardiovascular permitiu a identificação de uma janela temporal ampla entre o surgimento de lesões precursoras de aterosclerose e suas manifestações clínicas tardias, favorecendo a utilização de medidas preventivas.

Os fatores de risco tradicionais, entretanto, explicam apenas uma fração dos casos que se apresentam clinicamente como doença aterosclerótica (4,5), além de não necessariamente implicarem uma relação direta de causalidade. Até recentemente, pouco se conhecia sobre os processos celulares envolvidos na formação, progressão e instabilização das lesões ateroscleróticas. Diversas hipóteses surgiram buscando explicar os mecanismos pelos quais os diversos fatores de risco estariam envolvidos na patogênese desses processos. Dentre essas hipóteses, a teoria da resposta à lesão ganhou grande aceitação, incorporando diversos conceitos tradicionalmente estudados, como a

ação de substâncias trombogênicas, o efeito de lípidos circulantes e a lesão da camada íntima dos vasos (6). Nesse contexto, muita atenção tem sido dada aos mecanismos envolvidos no surgimento e perpetuação das lesões precursoras do ateroma, como estrias gordurosas e espessamentos localizados da camada íntima, bem como, a possível relação entre essas lesões vasculares iniciais e os diversos fatores de risco cardiovascular. A detecção precoce e o entendimento dos mecanismos envolvidos no surgimento desse tipo de lesões poderia reforçar estratégias terapêuticas que evitassem o desenvolvimento de placas definidas (ateroma) e todas as complicações advindas do seu surgimento.

A história natural das alterações estruturais iniciais do sistema vascular associadas com a aterosclerose já está razoavelmente bem documentada e, sabidamente, progride por estágios de espessamento difuso da camada íntima dos vasos (7). Vários métodos não-invasivos de imagem rotineiramente utilizados na prática clínica vêm sendo explorados experimentalmente com o intuito de quantificar lesões vasculares incipientes e irregularidades da parede dos vasos. Dentre essas modalidades de imagem, destacam-se o ultra-som, a ressonância magnética e os diversos tipos de tomografia computadorizada (8-11). Apesar de desconhecermos por que segmentos específicos de espessamento da parede vascular progridem para placas ateroscleróticas bem definidas e lesões obstrutivas, medidas da espessura da camada íntima e média (EIM) dos vasos são frequentemente utilizadas em estudos populacionais como marcadores de aterosclerose precoce (8,12). Em especial, a avaliação por ultra-som da EIM do sistema carotídeo é particularmente facilitada pela relativa proximidade das artérias carótidas em relação à pele e pela excelente janela acústica para avaliações morfológicas. A EIM carotídea avaliada por ultra-som aumenta com a idade (13), correlaciona-se com fatores de risco

cardiovascular tradicionais (14,15) e identifica pacientes em risco para doença coronariana grave (15-17) e morbidade por doença cerebrovascular (18). O uso da EIM também vem sendo preconizado por vários investigadores como desfecho substituto para doença aterosclerótica sub-clínica após intervenções terapêuticas preventivas sobre fatores de risco cardiovascular (19).

Outra situação clínica onde métodos não-invasivos de imagem de lesões vasculares já foram incorporados à prática clínica refere-se à avaliação diagnóstica e prognóstica dos aneurismas de aorta abdominal (20,21). A doença aneurismática vascular sabidamente envolve um componente aterosclerótico importante que invariavelmente está associado a um processo inflamatório tecidual induzido, pelo menos em parte, por citocinas, culminando em dilatação luminal progressiva (22,23). Através da avaliação ultra-sonográfica do abdômen podem se mensurar as dimensões aórticas no seu trajeto abdominal de forma segura, acurada e reprodutível. Este método, entretanto, é limitado do ponto de vista acústico para avaliações morfológicas mais detalhadas da aorta, impedindo medidas da EIM neste segmento vascular. Mesmo assim, a identificação de dilatação progressiva da aorta abdominal, avaliada por ultra-som ou tomografia computadorizada, pode identificar um subgrupo de pacientes onde o risco de ruptura é tão elevado que justifica a correção cirúrgica imediata.

O entendimento dos mecanismos que estão envolvidos na gênese de lesões precursoras de aterosclerose foi significativamente incrementado por diversos estudos clínicos e experimentais que avaliaram o papel fisiopatológico e prognóstico de vários marcadores imunoinflamatórios. Em especial, grande atenção tem sido dada a 1) marcadores inflamatórios sistêmicos inespecíficos, como as proteínas de fase aguda, 2) os

seus determinantes humorais, como as citocinas interleucina-1 (IL-1), IL-6 e o fator de necrose tumoral- α e 3) as moléculas de adesão intercelular, vascular, endotelial e de fase aguda. Dados do *Physicians' Health Study*, por exemplo, indicam que níveis basais elevados de proteína C-reativa (PCR), proteína protótipo das respostas de fase aguda, podem predizer o risco de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica em homens aparentemente saudáveis (24,25). Da mesma forma, Ridker e col. avaliaram a concentração plasmática das frações solúveis da molécula de adesão intercelular-1 (sICAM-1) e demonstraram que níveis basais elevados desse marcador estão associados a um risco aumentado de eventos coronarianos futuros vários anos após sua mensuração (26,27).

A avaliação do perfil plasmático das moléculas de adesão é particularmente interessante nesse contexto, pois diversos estudos experimentais sugerem que elas exercem um papel crítico no surgimento das lesões ateroscleróticas iniciais, uma vez que elas medeiam a ligação e migração de leucócitos através da superfície endotelial (28). A expressão focal de moléculas de adesão tem sido demonstrada em lesões ateroscleróticas (29,30), precede a infiltração leucocitária (31,32) e parece ser mediada, pelo menos em parte, por lipoproteínas modificadas ou seus derivados (33). Dados preliminares também indicam que níveis elevados de IL-6, principal citocina responsável pelo desencadeamento das reações de fase aguda, têm a mesma capacidade de predizer eventos cardiovasculares futuros que níveis de PCR e frações solúveis das moléculas de adesão (Paul Ridker, comunicação verbal). Diversos estudos também sugerem que os marcadores imunoinflamatórios circulantes têm a capacidade de predizer o risco de

eventos cardiovasculares ateroscleróticos de forma independente de vários fatores de risco cardiovascular tradicionais (34,35).

Estudos que avaliaram marcadores imunoinflamatórios circulantes em síndromes ateroscleróticas clínicas e pré-clínicas, entretanto, são limitados. Alguns estudos recentes, por exemplo, avaliaram a concentração plasmática de moléculas de adesão em pacientes com doença arterial periférica e encontraram resultados divergentes (36,37). Em especial, Hwang e col. não detectaram uma associação significativa entre as frações solúveis da molécula de adesão vascular celular-1 (sVCAM-1) e parâmetros de doença arterial carotídea e coronariana (26). Da mesma forma, muito pouco é conhecido sobre o perfil dos níveis de citocinas no contexto de doenças ateroscleróticas. A avaliação dos níveis de IL-6 parece ser particularmente interessante em pacientes com doença aórtica aneurismática, uma vez que grande atenção tem sido dada ao papel da inflamação tecidual na patogênese da doença aterosclerótica aórtica (22,23). Por outro lado, apesar de diversos marcadores imunoinflamatórios terem a capacidade de prever eventos cardiovasculares futuros, pouco se sabe sobre suas interações com marcadores tradicionais de risco cardiovascular, ou como essas potenciais interações poderiam alterar o risco de eventos subsequentes.

Os trabalhos descritos nessa tese têm como objetivo estudar a associação entre diversos marcadores imunoinflamatórios e características associadas com aterosclerose pré-clínica, particularmente no que diz respeito a (I) sua associação com parâmetros não-invasivos, baseados em ultra-som, de lesões vasculares iniciais e (II) e sua associação com fatores de risco tradicionais para doença cardiovascular.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Fatores de risco para doença cardiovascular aterosclerótica

Os fatores de risco para doença cardiovascular aterosclerótica têm sido identificados em estudos epidemiológicos de base populacional que relacionaram a presença de características clínicas específicas em indivíduos aparentemente saudáveis com o aparecimento subsequente de doença aterosclerótica clinicamente manifesta. Entre os fatores de risco modificáveis, os mais consistentemente associados ao aumento da incidência da doença aterosclerótica são a hiperlipidemia, a hipertensão arterial sistêmica, o tabagismo e a presença de *diabetes mellitus*. Idade, sexo e história familiar de cardiopatia isquêmica precoce estão entre os principais fatores de risco não modificáveis.

É importante salientar que a presença de um fator de risco não implica, necessariamente, uma relação de causalidade. Na maioria das circunstâncias, um fator de risco é apenas uma característica clínica que prediz o risco de desenvolvimento de uma doença clinicamente significativa. Algumas vezes, entretanto, fatores de risco podem estar direta ou indiretamente relacionados com a etiopatogenia de uma doença específica, exercendo um papel biológico relevante no surgimento e progressão de um processo patológico. Essa diferenciação é particularmente difícil no que diz respeito à patogênese das doenças cardiovasculares ateroscleróticas, uma vez que as síndromes ateroscleróticas clínicas têm origem multifatorial, se desenvolvem de forma insidiosa e os diversos fatores de risco cardiovascular se interrelacionam de forma pronunciada. Foge do escopo dessa tese uma revisão ampla das evidências epidemiológicas e dos efeitos da redução

dos diversos fatores de risco, sendo aqui revisados apenas aspectos específicos envolvidos no reconhecimento do seu papel potencial na etiopatogênese das lesões ateroscleróticas.

Dislipidemia - Os lípides da dieta estão entre os principais agentes ambientais relacionados à aterosclerose. Diversos estudos epidemiológicos de base populacional têm demonstrado uma associação direta entre os níveis plasmáticos de colesterol ou de suas frações com a incidência e prevalência de doença coronariana aterosclerótica (38). Além disso, a redução dos níveis de colesterol também tem se associado com uma redução concomitante de eventos cardiovasculares futuros (39-43). Os mecanismos específicos que medeiam o potencial efeito aterogênico dos lípides circulantes, entretanto, ainda não estão completamente esclarecidos. A teoria de resposta à lesão propõe que níveis elevados de colesterol ou de suas frações, particularmente o colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidado, causam lesões tóxicas no endotélio vascular (44). Essas partículas têm o potencial de alterar a estrutura da superfície do endotélio e de leucócitos circulantes, particularmente de monócitos. Por mecanismos ainda não esclarecidos, a adesão dos monócitos ao endotélio também é significativamente aumentada pela hipercolesterolemia. Nesse sentido, a forma pela qual as dislipidemias afetam o desenvolvimento e progressão de lesões ateroscleróticas, do ponto de vista celular e molecular, permanece apenas parcialmente elucidada. A expressão das diferentes moléculas de adesão em resposta a alterações do metabolismo lipídico, seja em modelos experimentais ou em estudos clínicos, tem sido identificada como um dos possíveis mecanismos pelo quais as lipoproteínas participam na formação das lesões ateroscleróticas (28,45). Li e col., por exemplo, demonstraram que coelhos alimentados

com uma dieta rica em colesterol e gorduras saturadas apresentam lesões precoces da camada íntima vascular e que se caracterizam pela expressão inicial exacerbada de VCAM-1, progredindo posteriormente com o surgimento e infiltração de macrófagos e espessamento endotelial (31).

Hipertensão arterial sistêmica – Diversos estudos epidemiológicos de base populacional também demonstraram uma associação de caráter contínuo e linear entre os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica e o desenvolvimento de doença arterial aterosclerótica (46-49). MacMahon e col., por exemplo, demonstraram uma associação significativa entre níveis pressóricos arteriais e doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral em uma metanálise envolvendo mais de 400 mil indivíduos (46).

A influência da elevação dos níveis pressóricos sobre a formação das lesões ateroscleróticas, entretanto, é pouco entendida. A hipertrofia das células musculares lisas da camada média e a hiperplasia intimal ocorrem em modelos animais de hipertensão arterial sistêmica e em artérias de indivíduos com hipertensão, sugerindo uma interrelação entre os mecanismos que induzem a proliferação e a contração muscular lisa. Por outro lado, estudos experimentais sugerem que hipertensão também possa aumentar a responsividade do endotélio, particularmente a fatores que promovam a adesão leucocitária (50-52). Nesse sentido, a liberação de sICAM-1 de células endoteliais submetidas à deformação mecânica mostrou-se diretamente dependente do grau e duração da deformação celular em estudos experimentais de culturas celulares (53).

Tabagismo – Inúmeros estudos de base populacional demonstram uma associação inequívoca entre o hábito de fumar e o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (54). No estudo de Framingham, a mortalidade cardiovascular foi 18%

mais elevada em homens e 31% mais elevada em mulheres para cada 10 cigarros fumados por dia quando comparada com indivíduos não-fumantes (55). Os mecanismos associados a esse aumento de risco não são completamente esclarecidos, mas envolvem, pelo menos em parte, uma redução nos níveis ou alteração na função do colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (56). Adicionalmente, tabagismo pode alterar a função endotelial (57), os níveis de fibrinogênio (58) e a agregação plaquetária (59). Blann e col. (60) sugeriram que um dos elos entre tabagismo e aterosclerose poderia ser mediado pela expressão de moléculas de adesão no endotélio, fibroblastos, leucócitos e plaquetas. Em um pequeno estudo transversal que comparou indivíduos fumantes e não-fumantes, foram demonstradas pequenas diferenças entre níveis de sICAM-1 e P-selectina entre os grupos, embora essas diferenças não tenham sido identificadas para sVCAM-1 e E-selectina (60).

Diabetes mellitus – Doença arterial macrovascular é a principal causa de mortalidade em pacientes diabéticos adultos, sendo uma complicação comum tanto em pacientes insulino-dependentes quanto naqueles não dependentes de insulina. O *diabetes mellitus* frequentemente coexiste com outros fatores de risco para doença arterial aterosclerótica, uma vez que hipertensão, obesidade e dislipidemia são comuns em pacientes diabéticos (61,62). A resistência à ação da insulina circulante parece exercer um papel importante na dislipidemia relacionada com o *diabetes mellitus* (63). Em síndromes de resistência aumentada à insulina existe um aumento de ácidos graxos livres circulantes, o que estimula a síntese de triglicerídeos. A glicolização de lipoproteínas, o aumento dos níveis de lipoproteína (a) e a presença de um estado hipercoagulante, decorrente de um aumento dos níveis do inibidor do ativador de plasminogênio 1,

também parecem estar envolvidos na predisposição à doença aterosclerótica que ocorre em pacientes diabéticos (64).

Idade, sexo e história familiar – Aproximadamente 80% dos infartos agudos do miocárdio ocorrem em pacientes acima dos 65 anos de idade (65). Os mecanismos responsáveis por essa maior incidência com o aumento da idade são desconhecidos, apesar de saber-se que a prevalência de diversos fatores de risco aumenta com a idade e que seus efeitos são cumulativos e dependentes do tempo de exposição.

No estudo de Framingham, homens tinham uma morbidade por doença cardiovascular duas vezes maior que mulheres (66). O aparecimento de doença cardiovascular clinicamente manifesta parece ocorrer 10 anos antes nos homens, ocorrendo um aumento rápido nas mulheres após a menopausa. Parte desse aumento na incidência é atribuído às alterações hormonais decorrentes da menopausa, embora um ensaio clínico recente de reposição hormonal não tenha demonstrado uma redução consistente do risco de eventos cardiovasculares (67).

Doença coronária aterosclerótica sabidamente tende a apresentar uma forte agregação familiar. História familiar de cardiopatia isquêmica precoce é um fator de risco independente para novos eventos coronarianos em diversos estudos prospectivos. Por outro lado, o aumento do risco associado com uma história familiar positiva pode ser mediado por efeitos genéticos em outros fatores de risco como obesidade, dislipidemia, hipertensão e *diabetes mellitus* (68). Os mecanismos celulares e moleculares que medeiam a predisposição familiar para doença aterosclerótica são pouco conhecidos.

Tipos de lesões ateroscleróticas

Várias tentativas de classificação dos tipos de lesões ateroscleróticas já foram realizadas no passado. Recentemente, uma redefinição do estadiamento da progressão das lesões ateroscleróticas foi proposta pelo Comitê de Lesões Vasculares da *American Heart Association*, classificando as lesões em tipo I a VI (69). Os tipos de lesões também podem ser estratificados em 5 estágios conforme ilustrado na Figura 1 (70).

A sequência da progressão das lesões, do tipo I até o IV dá-se pelo acúmulo progressivo de lípidos. Os diferentes tipos de estrias gordurosas foram incluídos nas lesões de estágio 1 (tipo I, II e III), dependendo do número relativo de células musculares lisas, macrófagos e da quantidade de conteúdo lipídico. Algumas dessas lesões podem progredir para o estágio 2, que inclui lesões tipo IV e V.

As lesões tipo IV correspondem ao espessamento difuso da camada íntima, em diferentes graus, decorrendo da confluência de coleções lipídicas e do aumento do número de células musculares lisas, circundados por quantidade variável de tecido conjuntivo rico em proteoglicanos e células sanguíneas circulantes. Usualmente, essas lesões não estão associadas ao estreitamento da luz do vaso. A definição de imagem da avaliação baseada em ultra-som das artérias humanas, particularmente das artérias carótidas, permite a visualização e quantificação de lesões do tipo IV com adequada sensibilidade.

As lesões do tipo V se caracterizam pelo surgimento da cápsula fibrosa, uma camada fina de formas modificadas de células musculares lisas associada a tecido conjuntivo extremamente denso, o que confere grande resistência à deformação

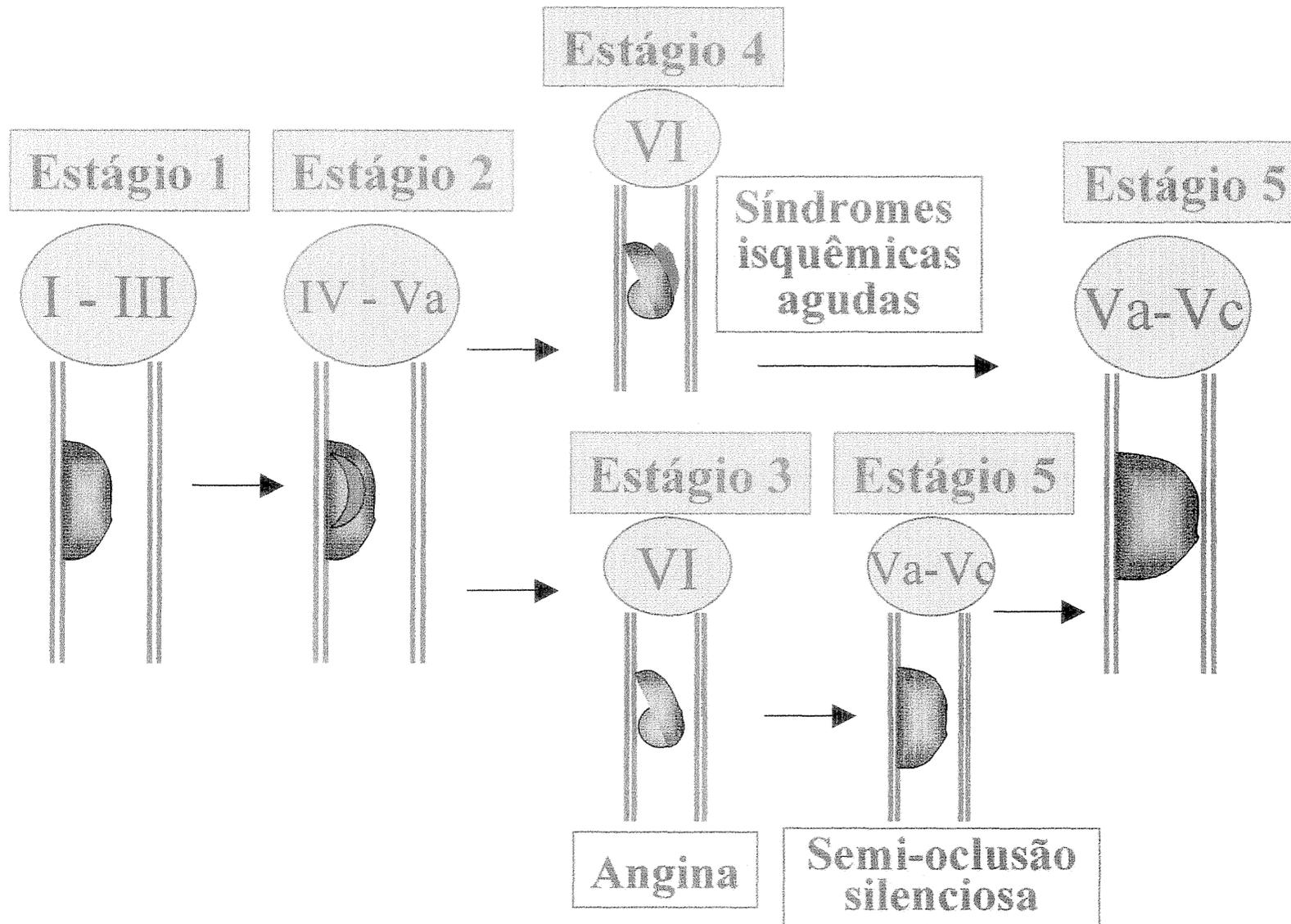


Figura 1 - Representação esquemática da evolução de lesões ateroscleróticas. Adaptado de Fuster e col.(70).

mecânica. As lesões do tipo IV e, mais frequentemente, do tipo V podem sofrer ruptura na sua superfície (VIa), hemorragia ou hematoma (VIb) ou trombose (VIc), correspondendo ao estágio 3 de progressão das lesões ateroscleróticas e que se manifestam como angina crônica estável. O estágio 4 corresponde àquelas lesões que se manifestam clinicamente como síndromes isquêmicas agudas (infarto, angina instável ou morte súbita de origem isquêmica) e que também são decorrentes de lesões do tipo VI a, b ou c. Por fim, o estágio 5 corresponde às potenciais lesões que se formam após o aparecimento de sintomas clínicos, caracterizadas por crescimento generalizado das lesões, com componentes obstrutivos ou sub-oclusivos.

Ultra-som e avaliação não-invasiva de aterosclerose

Espessura íntima-média (EIM) carotídea - O desenvolvimento da ultra-sonografia bidimensional de alta definição aplicada a grandes artérias superficiais permitiu a avaliação não-invasiva da gravidade da aterosclerose, especialmente de lesões tipo IV, V e VI. A factibilidade da mensuração da EIM nos diversos segmentos da artéria carótida comum, na bifurcação carotídea (bulbo) e nos segmentos proximais da artéria carótida interna já foi bem documentada em diversos estudos, demonstrando ter uma excelente reprodutibilidade intra- e inter-examinador (8,12-14).

Salonen e Salonen foram pioneiros na avaliação da relação entre a EIM carotídea com diversos fatores de risco cardiovascular em grandes amostras populacionais. Em uma avaliação de 1224 homens finlandeses de 42 a 60 anos, foram encontradas associações significativas entre a EIM carotídea e idade, tabagismo, diabetes, história de doença isquêmica do coração, níveis pressóricos e níveis séricos de colesterol LDL (8). Associações semelhantes com diversos fatores de risco foram descritas por Heiss e col.,

em um estudo de caso-controle envolvendo 386 indivíduos com espessamento carotídeo e 386 controles selecionados do estudo *Atherosclerosis Risk in Communities* (14).

A presença de lesões carotídeas detectáveis por ultra-som é extremamente prevalente em pacientes acima de 65 anos (75% em homens e 62% em mulheres), embora a prevalência de estenoses luminais comprometendo mais de 50% da luz da artéria seja relativamente baixa (7% para homens e 5% para mulheres) (12). Dados extraídos do *Cardiovascular Health Study* sugerem que as associações entre EIM carotídea e os diversos fatores de risco tradicionais se mantêm em pacientes idosos, tanto em indivíduos assintomáticos como naqueles sintomáticos (13). Howard e col. também identificaram uma associação significativa entre a EIM carotídea em um sítio vascular específico com a EIM carotídea contralateral, reforçando o conceito de que o processo aterosclerótico tem um caráter difuso (71). Recentemente, medidas de EIM e diferentes níveis de obstrução carotídea também foram associados com títulos séricos de citomegalovírus (72) e níveis plasmáticos de homocisteína (73,74).

As associações que envolvem a EIM carotídea não se restringem aos diversos fatores de risco cardiovascular. Wofford e col. demonstraram que pacientes com EIM carotídea no quartil superior têm uma chance 10 vezes maior de apresentar lesões de 3 vasos coronarianos do que artérias coronárias normais (16). Salonen e col. determinaram que a presença de alterações estruturais das artérias carótidas estava associada a um risco significativamente aumentado de eventos coronarianos agudos, de tal forma que cada aumento de 1 milímetro na EIM carotídea da artéria carótida comum associa-se a um aumento de 2,1 vezes no risco de desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio (15). Uma sub-análise de uma grande coorte de indivíduos holandeses (estudo de Rotterdam)

também identificou uma associação significativa entre aumento da EIM da artéria carótida comum e o risco de eventos cerebrovasculares e coronarianos futuros (18).

Diâmetros aórticos – A alta mortalidade associada com a ruptura de aneurismas aórticos abdominais e o baixo risco de ressecções eletivas enfatiza a importância da detecção precoce desse tipo de lesão vascular. A prevalência de aneurismas aórticos assintomáticos é estimada em 1-2% na população geral. Em populações selecionadas, essa prevalência pode ser ainda significativamente maior. Cabellon e col., por exemplo, identificaram 7 (10%) aneurismas abdominais em uma avaliação de 73 pacientes com doença arterial periférica aterosclerótica sintomática (75).

Diversas abordagens baseadas em imagens de ultra-som foram sugeridas para o rastreamento de pacientes com aneurismas aórticos abdominais. Pedersen e col. avaliaram 160 indivíduos referidos para avaliação de ultra-som abdominal com o propósito de estabelecer critérios ultra-sonográficos de dimensões aórticas normais (20). Nesse estudo, a luz aórtica abdominal foi avaliada em dois níveis: 1) aorta proximal, no nível da confluência das veias porta e esplênica, e 2) aorta distal, acima da bifurcação das artérias ilíacas. Esses autores sugerem que diâmetros aórticos distais não corrigidos maiores que 23 mm para homens e 19 mm para mulheres devam ser considerados anormais. Carty e col., por outro lado, investigaram a utilização e acurácia de uma avaliação limitada da aorta abdominal em pacientes referidos para avaliação bidimensional e por Doppler do sistema carotídeo (76). Essa avaliação consistia de uma inspeção ecográfica sumária da aorta abdominal, desde o apêndice xifóide até o nível peri-umbilical, sendo utilizado apenas um número reduzido de imagens para ilustrar o segmento de maior diâmetro aórtico, ao contrário da abordagem tradicional sistemática

de obterem-se cortes a cada 2 cm no plano longitudinal e transversal. Nessa amostra de 131 pacientes, 11 (8%) aneurismas infrarenais foram identificados.

Marcadores imunoinflamatórios circulantes

O potencial papel fisiopatológico e prognóstico de vários marcadores imunoinflamatórios foi recentemente explorado por diversos estudos clínicos e experimentais. Em especial, grande atenção tem sido dada a 1) marcadores inflamatórios sistêmicos inespecíficos, mas altamente sensíveis, como as proteínas de fase aguda, 2) seus determinantes humorais, como a IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral- α e 3) moléculas de adesão intercelular, vascular, endotelial e de fase aguda.

Os mecanismos celulares através dos quais a imunoinflamação interage com o processo aterosclerótico são pouco conhecidos e especulativos. Infecção prévia por *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, vírus herpes simplex ou citomegalovírus, tem sido sugerida como mecanismo de origem de um processo inflamatório crônico subjacente que justifica níveis elevados de vários marcadores imunoinflamatórios. De forma alternativa, níveis elevados de várias proteínas de fase aguda, já bem documentados em diversas síndromes ateroscleróticas (24,25), podem representar apenas um desfecho substituto da expressão de IL-6, uma citocina celular associada com o recrutamento de macrófagos e monócitos em lesões ateroscleróticas e que é responsável pela desencadeamento das reações de fase aguda.

As seções abaixo descrevem, de forma mais detalhada, as evidências clínicas e experimentais do papel da PCR, da IL-6 e das moléculas de adesão celular nas síndromes aterotrombóticas.

Proteína C-reativa (PCR) – PCR é uma proteína de fase aguda com múltiplas funções biológicas, sendo considerada um marcador de inflamação crônica subjacente. Quando mensurados com técnicas de alta sensibilidade, níveis de PCR mostraram-se capazes de prever o desenvolvimento de eventos clínicos em pacientes com diversas síndromes aterotrombóticas (24,25,34,35,77-82). Níveis de PCR, por exemplo, estão associados a uma maior morbidade em pacientes com angina estável e instável (77-79) e a um incremento de mortalidade em idosos e em fumantes com múltiplos fatores de risco para doença aterosclerótica (80-81). Além disso, níveis basais de PCR predizem o risco de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica em homens (24,25) e mulheres (82) de meia-idade aparentemente saudáveis, mesmo após o controle para outros fatores de risco cardiovascular. Dados recentes indicam que níveis de PCR têm valor preditivo adicional àquele obtido de parâmetros lipídicos para determinação do risco de infarto agudo do miocárdio (34) e às dosagens de troponina T na determinação do prognóstico a curto prazo de pacientes com síndromes isquêmicas agudas (35). Finalmente, níveis elevados de PCR também foram recentemente associados com um risco aumentado de reinfarto e morte em pacientes com infarto prévio (83).

Interleucina-6 - IL-6 é uma citocina inflamatória que tem um papel crítico nas reações de fase aguda, além de exercer efeitos importantes em diversas fases da hematopoiese, na diferenciação e ativação de linfócitos e no sistema de coagulação. IL-6 pode originar-se de uma grande variedade de tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais, monócitos e macrófagos, células musculares lisas, mastócitos, linfócitos T e diferentes linhas celulares tumorais (84). Apesar da expressão de IL-6 estar envolvida em uma grande variedade de processos fisiológicos e patológicos, poucos estudos avaliaram

o perfil da expressão desta citocina em síndromes ateroscleróticas clínicas. Biasucci e col. demonstraram recentemente que níveis elevados de IL-6 são comuns em pacientes com angina instável, além de estarem associados com um pior prognóstico a curto prazo (85). Neste estudo, apenas 21% dos pacientes com angina estável tiveram níveis detectáveis de IL-6, enquanto que 83% dos pacientes com angina instável e com um curso hospitalar complicado apresentaram níveis elevados desta citocina (85).

Um dos mecanismos básicos na patogênese da doença aórtica aneurismática é a degradação de componentes da matrix extracelular induzida por citocinas inflamatórias. Nesse sentido, Juvonel e col. identificaram que pacientes com patologia aórtica abdominal apresentam níveis plasmáticos elevados de IL-6 quando comparados a controles normais e a pacientes com doença coronariana (22). Estudos de cultura tecidual também indicam que amostras de aneurismas aórticos abdominais humanos produzem significativamente mais citocinas, particularmente IL-6, do que amostras de tecido aórtico normal (23).

Moléculas de adesão celular – Os processos de ligação entre diferentes células e entre células e componentes da matrix extracelular são mediados por moléculas de adesão celular, incluindo as integrinas, as selectinas e a superfamília das imunoglobulinas (86). Em especial, a adesão dos leucócitos circulantes ao endotélio vascular e sua migração através da superfície endotelial, etapas consideradas críticas no surgimento de lesões ateroscleróticas, são mediadas, pelo menos em parte, por diversos tipos de moléculas de adesão celular. Essas moléculas são expressas primariamente na membrana endotelial, em resposta a diversas citocinas inflamatórias, incluindo a IL-6, a IL-1, o fator de necrose tumoral- α e o interferon. Nesses processos, grande atenção tem sido dada ao papel da

expressão de E-selectina (referente ao endotélio), P-selectina (referente às plaquetas), VCAM-1 e ICAM-1.

A expressão de moléculas de adesão ocorre focalmente no endotélio, em células musculares lisas e em macrófagos de placas ateroscleróticas humanas (29,30). A expressão de VCAM-1 em células endoteliais aumenta rapidamente depois de uma dieta rica em gorduras e colesterol, precede a infiltração de leucócitos (28,31) e é por substâncias derivadas de lipoproteínas (33, 88-91). Cokerill e col. demonstraram que concentrações fisiológicas de lipoproteínas de alta densidade inibem a expressão de diversas moléculas de adesão dependentes de citocinas (88). Quando células endoteliais em cultura foram expostas a uma concentração de colesterol HDL de 1 mg/ml, a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina foi reduzida em 90%, 65% e 79%, respectivamente, sugerindo que o efeito protetor do colesterol HDL pode ser mediado pela inibição da expressão das moléculas de adesão. Em particular, estudos imunohistoquímicos em artérias carótidas também identificaram expressão acentuada de VCAM-1 em placas ateroscleróticas avançadas (92). O desenvolvimento de camundongos com deleções programadas de genes específicos permitiu recentemente a avaliação direta do papel de diversas moléculas de adesão na patogênese da aterosclerose. Dois estudos recentes (93-94), utilizando camundongos mutantes com deleção programada dos genes (*knock-outs*) de ICAM-1, P-selectina e CD18, identificaram uma redução de 50-75% no desenvolvimento de estrias gordurosas depois de uma dieta rica em gorduras e colesterol. Os autores desses estudos especulam que a variabilidade na expressão desses genes poderia influenciar a suscetibilidade individual para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas.

Do ponto de vista clínico, foram poucos os trabalhos que avaliaram o papel das frações plasmáticas das moléculas de adesão em síndromes ateroscleróticas. A extensão de lesões ateroscleróticas, avaliadas pela percentagem de irregularidade parietal através de angiografia aórtica, ilíaca comum, femoral e poplítea, apresentou uma correlação muito boa com níveis circulantes de sVCAM-1 em pacientes com doença arterial periférica (36). Sampietro e col. demonstraram recentemente que aferese de LDL em pacientes com hipercolesterolemia familiar está associada com decréscimo concomitante de níveis de moléculas de adesão circulante (95). Nesse estudo, os níveis de sICAM-1 antes e imediatamente após a aferese foram de 359 ng/mL e 266 ng/mL, respectivamente. Hwang e col., por outro lado, não identificaram associações significativas entre a concentração plasmática de sICAM-1 e da molécula de adesão vascular celular-1 (sVCAM-1) com níveis de diversos lípidos (26). Neste estudo, níveis de sVCAM-1 também não foram diferentes em indivíduos com doença coronariana ou carotídea quando comparados com controles. Por fim, em um estudo de caso-controle envolvendo 948 indivíduos participantes de uma coorte de homens aparentemente saudáveis, foi observado que níveis elevados da fração solúvel de SICAM-1 predizem o risco subsequente de infarto agudo do miocárdio após 9 anos de seguimento, de forma independente a outros fatores de risco cardiovascular (27). Esse risco foi particularmente aumentado nos pacientes com concentrações plasmáticas no quartil superior da distribuição de sICAM-1 (níveis > 260 ng/ml; risco relativo de 1,6 [intervalo de confiança de 95% de 1,1-2,4], p=0,02).

Sumário

A expressão de vários marcadores imunoinflamatórios já está bem documentada em diferentes etapas do processo aterogênico. Diversos estudos também avaliaram o papel prognóstico de alguns marcadores imunoinflamatórios circulantes em síndromes ateroscleróticas clínicas. Apesar disto, pouco se sabe sobre a associação destes marcadores com características clínicas relacionadas com aterosclerose inicial ou com fatores de risco cardiovascular. A avaliação do perfil plasmático das moléculas de adesão é particularmente interessante no contexto das lesões ateroscleróticas iniciais, como o espessamento da camada íntima dos vasos, uma vez que essas moléculas participam nos processos de ligação e migração de leucócitos através da superfície endotelial (28). Da mesma forma, muito pouco é conhecido sobre o perfil das citocinas em doenças ateroscleróticas. A avaliação dos níveis de IL-6 pode ser particularmente interessante no contexto das doenças da aorta abdominal, pois grande atenção tem sido dada ao papel da inflamação tecidual na patogênese da doença aterosclerótica aórtica (22,23). Apesar de vários estudos indicarem que o valor preditivo destes marcadores é independente de outros fatores de risco cardiovascular, é plausível considerarmos que existam associações entre fatores de risco tradicionais e estes novos marcadores de risco cardiovascular. Até o momento, poucos estudos exploraram essas potenciais associações de marcadores imunoinflamatórios circulantes com características de aterosclerose inicial e fatores de risco cardiovascular tradicionais.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Os trabalhos descritos nessa tese têm como objetivo estudar a associação entre diversos marcadores imunoinflamatórios e características de aterosclerose pré-clínica, particularmente em relação (I) à sua associação com parâmetros não-invasivos, baseados em ultra-som, de lesões vasculares iniciais e (II) à sua associação com fatores de risco tradicionais para doença cardiovascular.

Objetivos específicos:

Protocolo I

1. Avaliar a associação entre a concentração plasmática das moléculas de adesão sVCAM-1 e sICAM-1 com a EIM das artérias carótidas avaliadas por ecografia bidimensional de alta resolução.
2. Estudar a associação entre as concentrações plasmáticas de IL-6 e PCR com as dimensões da aorta abdominal avaliadas por ecografia bidimensional.

Protocolo II

1. Avaliar a associação entre as concentrações plasmáticas da molécula de adesão sICAM-1 e da PCR com diversos fatores de risco para doença cardiovascular aterosclerótica em indivíduos aparentemente saudáveis.

CAPÍTULO IV

MÉTODOS

Os estudos descritos nesta tese estão subdivididos de acordo com os dois protocolos apresentados abaixo:

Protocolo I. Marcadores imunoinflamatórios plasmáticos e características ecográficas de aterosclerose

Pacientes: Pacientes ambulatoriais com idade superior a 50 anos que foram referidos ao laboratório de cardiologia não-invasiva do *Brigham and Women's Hospital* para a realização de um ecocardiograma transtorácico foram convidados a participar deste estudo. Pacientes com história clínica compatível com infecção ativa (febre na última semana, uso recente de antibióticos ou qualquer tipo de infecção atual diagnosticada), doença inflamatória sistêmica (artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico ou doença inflamatória intestinal), transplante cardíaco e aqueles em uso de corticoesteróides orais ou parenterais foram excluídos. A amostragem foi consecutiva, dependendo da disponibilidade de equipamentos e pessoal. Cento e vinte pacientes elegíveis concordaram em participar do protocolo e constituíram a população em estudo. Entre esses indivíduos, foram identificados 7 pacientes com dilatação aórtica (diâmetro aórtico corrigido $> 1,3 \text{ cm/m}^2$). Para o protocolo das espessuras carotídeas, o estudo ecográfico de carótidas foi realizado em 92 pacientes dessa amostra. Informações individuais sobre fatores de risco para doença cardiovascular aterosclerótica, história prévia de doenças cardiovasculares, outras co-morbidades e medicações em uso foram coletadas. O protocolo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Pesquisa em Humanos do

Brigham and Women's Hospital e consentimento informado por escrito foi obtido para todos participantes.

Estudo ecográfico das artérias carótidas: Cada paciente foi submetido a um exame ultra-sonográfico detalhado das artérias carótidas. Esse procedimento foi realizado por um médico treinado em exames vasculares, em um equipamento comercialmente disponível (Hewlett Packard Sonos 2500; Hewlett Packard Medical Products; Andover, MA) utilizando-se um transdutor linear de 5,5/7,0 MHz. O protocolo para obtenção de imagens carotídeas foi adaptado do protocolo utilizado pelo estudo *Atherosclerosis Risk in Communities* (14). Imagens foram obtidas com o paciente em posição supina, com o pescoço levemente estendido e a cabeça em rotação contralateral ao lado a ser examinado. Foram adquiridas imagens bilaterais no eixo longitudinal-lateral e oblíquo-anterior 1) da porção distal (10 mm) das artérias carótidas comuns, 2) da bifurcação carotídea e 3) da artéria carótida interna (Figura 2). Como imagens de qualidade técnica adequada para medidas morfológicas detalhadas da artéria carótida interna foram obtidas em menos de 50% dos pacientes, medidas desse segmento não foram incluídas nas análises da espessura parietal. As imagens foram digitalizadas e todos exames foram avaliados pelo autor, conforme recomendações padronizadas (14), através de um programa de computador específico desenvolvido no Laboratório de Métodos Não-invasivos do *Brigham and Women's Hospital*. Através desse programa, linhas foram traçadas na interface entre a luz do vaso e a camada íntima (linha A) e entre a camada média e adventícia (linha B), na parede distal da artéria carótida comum e bifurcação carotídea, em segmentos de 5-10 mm (Figura 2). A partir deste diagrama, foi calculada a

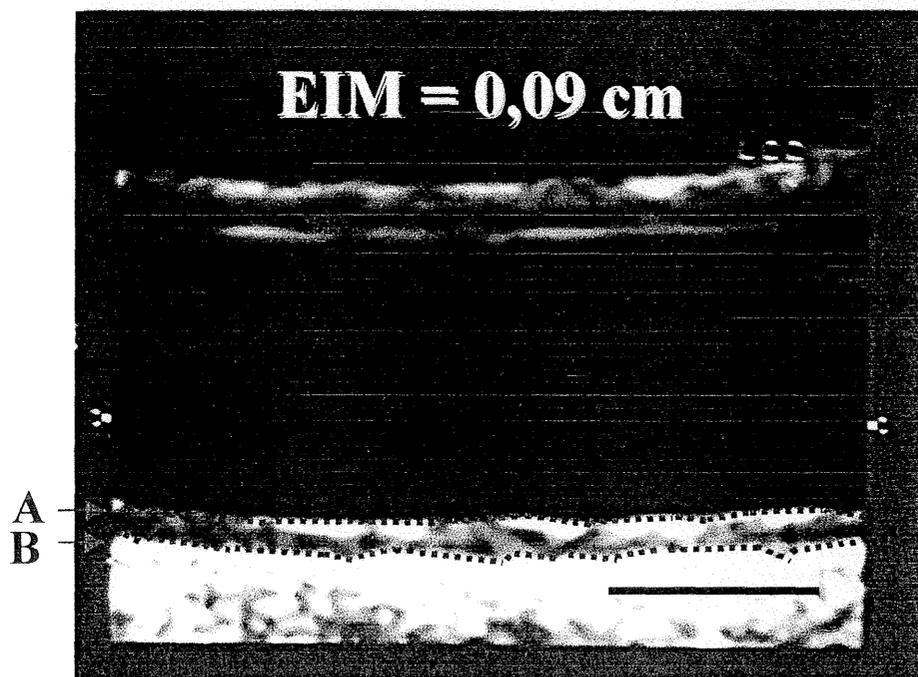
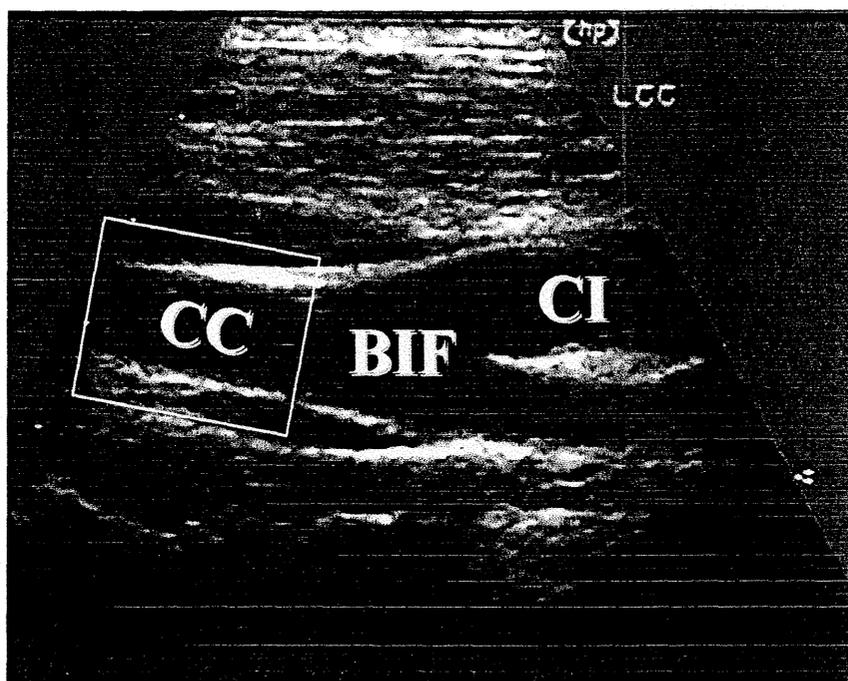


Figura 2 - Exemplo representativo de um corte longitudinal do segmento distal da artéria carótida comum (CC), da bifurcação carotídea (BIF) e da artéria carótida interna (CI) (acima). O retângulo ilustra o segmento amplificado abaixo, no qual está representado um corte longitudinal da artéria carótida comum, demonstrando-se esquematicamente a mensuração da EIM. A área entre os pontos vermelhos representa as camadas íntima e média (entre as linhas A e B). A linha preta representa 0,5 cm.

média das espessuras da camada íntima e média (EIM) em cada segmento (carótida comum e bifurcação). A média das medidas entre o lado direito e esquerdo foram utilizadas para análise estatística. A EIM máxima em qualquer segmento também foi computada para as análises. Esse índice foi criado para integrar informações de espessamento e/ou obstrução em qualquer nível do sistema carotídeo. Placas ateroscleróticas foram definidas pela presença de espessamento focal significativo da parede do vaso (EIM acima de 2 mm), irregularidade de parede e presença de calcificações. A reprodutibilidade na mensuração da EIM pelo mesmo observador foi avaliada em um subgrupo de 20 pacientes. O coeficiente de correlação desta avaliação foi superior a 98%. A avaliação e mensuração de parâmetros carotídeos foi realizada pelo autor, sem conhecimento prévio das medidas plasmáticas dos marcadores imunoinflamatórios.

Estudo ecográfico da aorta abdominal: Dois examinadores, com experiência e utilizando equipamentos comercialmente disponíveis (Hewlett Packard Sonos 2500; Hewlett Packard Medical Products; Andover, MA) e um transdutor de 2,7/3,5 MHz, realizaram os exames ultra-sonográficos. Os pacientes foram examinados em posição supina, com os joelhos semi-flexionados, com intuito de relaxar a musculatura abdominal. A aorta abdominal foi examinada do apêndice xifóide até a região peri-umbilical, incluindo, quando possível, a bifurcação aórtica. Imagens da aorta no eixo longitudinal e lateral no diâmetro bidimensional máximo foram gravadas em fitas de vídeo profissional super-VHS para análise posterior. Essas imagens foram digitalizadas e avaliadas em um programa de computador desenvolvido no Laboratório de Métodos Não-invasivos do *Brigham and Women's Hospital*. O diâmetro luminal máximo da aorta

abdominal foi medido na região peri-umbilical, correspondendo ao segmento infra-renal. A luz livre de ecos no interior da aorta foi medida entre o limite ecogênico final (“*inner trailing edge*”) da parede anterior e o limite ecogênico inicial (“*inner leading edge*”) da parede posterior, concomitante com o pico da onda “R” do eletrocardiograma, com o objetivo de evitar que as pulsações cíclicas da aorta interferissem com as medidas. O diâmetro aórtico medido foi corrigido para a superfície corporal. Variabilidade intra-observador e inter-observador foi medida em um subgrupo de 30 pacientes, tendo sido menor do que 5% e 10%, respectivamente.

Medidas sanguíneas: Amostras de sangue anticoaguladas em EDTA foram obtidas através de punção venosa, utilizando-se um cateter-borboleta periférico nº 19. O sangue foi imediatamente centrifugado por 20 minutos a 2.500 rotações por minuto, e alíquotas foram conservadas a -70° C. sVCAM-1 e sICAM-1 foram medidas em duplicata por um ensaio imunológico-enzimático tipo sanduíche (“ELISA”), baseado em proteínas e anticorpos purificados (R&D Systems), de acordo com as recomendações próprias do produto. A sensibilidade referida para essas medidas é de menos de 2 ng/ml e 0,35 ng/ml, respectivamente. IL-6 também foi medida pela técnica de ELISA (Imunotech). Proteína amilóide A foi medida por um método nefelométrico em um analisador BnII, possuindo um sensibilidade que alcança níveis de 0,8 mg/ml. Os métodos para mensuração do colesterol LDL e HDL, lipoproteína (a) e homocisteína total foram realizados de acordo com protocolos padronizados descritos previamente (96-98).

Protocolo II. Marcadores imunoinflamatórios plasmáticos e fatores de risco para doença cardiovascular

Pacientes: Neste protocolo, foram estudados homens aparentemente saudáveis participantes do estudo *Physicians' Health Study* (97). O *Physicians' Health Study* foi um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com delineamento fatorial (2x2), de aspirina e beta-caroteno, que envolveu 22.701 médicos norte-americanos entre 40 e 84 anos de idade (99). Critérios de exclusão neste estudo incluíram história de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico estabelecido ou transitório, câncer, doença renal ou hepática, doença péptica ou gota, contra-indicação ao uso de aspirina e uso atual de aspirina ou outros medicamentos com ação anti-agregante plaquetária, agentes anti-inflamatórios não-esteróides, vitamina A ou beta-caroteno.

Como descrito previamente em detalhe (99), foi requisitado aos participantes elegíveis que remetessem amostras de plasma antes da randomização. Tubos com ácido edético foram remetidos para cada médico com instruções detalhadas de como coletar o sangue. Requisitou-se que o sangue coletado fosse imediatamente centrifugado e o plasma remetido no mesmo dia, acondicionado em um recipiente refrigerado, por correio noturno. Aproximadamente 68% dos médicos randomizados remeteram amostras sanguíneas (14.916 indivíduos). Os médicos participantes também relataram antes da randomização a presença de diversas características clínicas associadas com risco cardíaco como idade, tabagismo, altura, peso, pressão arterial sistólica e diastólica, história de hipercolesterolemia, *diabetes mellitus*, frequência de exercício e ingestão de bebidas alcoólicas.

No presente protocolo, foram avaliadas as associações entre níveis plasmáticos de sICAM-1 e PCR e diversas características clínicas de risco cardiovascular em um subgrupo (n=1374) de participantes do *Physicians' Health Study* aparentemente livres de doença cardiovascular no momento da coleta do sangue. Tais indivíduos foram selecionados como participantes em estudos de caso-controle de marcadores imunoinflamatórios e risco de eventos cardiovasculares futuros (24,25,27). As análises de associações foram realizadas indistintamente entre indivíduos que desenvolveram ou não eventos cardiovasculares.

Medidas sanguíneas: Para cada participante selecionado, a amostra respectiva de plasma foi descongelada e sICAM-1 foi mensurada em duplicata por um ensaio imunológico-enzimático tipo sanduíche (“ELISA”), baseado em proteínas e anticorpos purificados (R&D Systems), de acordo com as recomendações do produto. A sensibilidade para essa medida é de menos de 2 ng/ml e a variabilidade entre medidas foi menor que 10%. PCR também foi mensurada por um ensaio imunológico-enzimático competitivo, que usa proteínas purificadas e anticorpos anti-PCR policlonais, com sensibilidade de até 0,05 mg/l. A variabilidade entre medidas para esse ensaio foi de 5,5%.

Análise dos dados

Parâmetros carotídeos: Coeficientes de correlação de Spearman foram calculados para avaliar a presença de associação entre parâmetros carotídeos e medidas dos marcadores séricos. As medidas de EIM foram divididas em três grupos, de acordo com a distribuição em tertis. A diferença dos níveis séricos das moléculas de adesão nos tertis carotídeos foi computada por modelos lineares gerais (*general linear models*). O teste de

Tukey foi utilizado para comparações múltiplas. Modelos lineares gerais foram computados para estimar a associação entre níveis séricos e medidas carotídeas, controlando para outros fatores de risco. As associações ajustadas foram controladas para cada fator de risco individualmente. Além disso, modelos de regressão linear múltipla foram criados para avaliar a contribuição independente das moléculas de adesão nos valores de EIM. As variáveis incluídas foram aquelas apontadas pelo referencial teórico, sendo consideradas aquelas com valor de $p < 0,15$ nas análises univariadas. Para os modelos de regressão, as variáveis foram selecionadas utilizando-se o método passo-a-passo (*stepwise*). Um valor de p bicaudal menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Parâmetros aórticos: Variáveis com distribuição não-normal sofreram transformação logarítmica. Coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para avaliar as associações entre os diâmetros aórticos corrigidos para a superfície corporal e os níveis séricos de IL-6, proteína amiloide A, PCR, homocisteína total e lípidos. Os participantes também foram classificados em três grupos, de acordo com o diâmetro aórtico. Inicialmente, indivíduos sem dilatação aórtica foram dicotomizados de acordo com a mediana da distribuição em grupos com diâmetro aórtico corrigido $<0,84 \text{ cm/m}^2$ e $\geq 0,84 \text{ cm/m}^2$. O terceiro grupo compreendeu pacientes com dilatação aórtica (diâmetro aórtico corrigido $\geq 1.3 \text{ cm/m}^2$; $n=7$). A diferença das medidas séricas entre os grupos foi computada por análise de variância. Modelos de regressão linear múltipla também foram criados para identificar variáveis associadas de forma independente com o diâmetro aórtico corrigido, sendo incluídas aquelas variáveis apontadas pelo referencial teórico e com valor de $p < 0,15$ nas análises univariadas. Para os modelos de regressão, as

variáveis foram selecionadas utilizando-se o método passo-a-passo (*stepwise*). Um valor de p bicaudal menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

sICAM-1/PCR e fatores de risco: Coeficientes de correlação de Spearman foram calculados para avaliar a associação entre níveis desses de sICAM-1 e PCR e índice de massa corporal, pressão sistólica e diastólica, colesterol total, HDL e LDL, triglicerídios, lipoproteína (a), fibrinogênio, antígeno ativador do plasminogênio tecidual e homocisteína total. O teste de Wilcoxon, o teste T de Student e modelos lineares gerais foram utilizados para comparar níveis de sICAM-1 e PCR de acordo com a presença ou ausência de fatores de risco para doença aterosclerótica, como hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, *diabetes mellitus*, hipercolesterolemia, frequência de exercício e ingestão de bebidas alcoólicas. Adicionalmente, níveis desses marcadores foram categorizados em quatro grupos de acordo com sua distribuição em quartis. Os níveis de fatores de risco plasmáticos lipídicos e não-lipídicos foram comparados de acordo com as categorias de níveis de sICAM-1 e PCR, usando-se análise de variância. Além disso, modelos de regressão linear múltipla foram criados para identificar variáveis associadas de forma independente com cada marcador sérico em estudo. As variáveis incluídas foram aquelas apontadas pelo referencial teórico, sendo consideradas aquelas com valor de $p < 0,15$ nas análises univariadas. Para os modelos de regressão, as variáveis foram selecionadas utilizando-se o método passo-a-passo (*stepwise*). Um valor de p bicaudal menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

CAPÍTULO V

RESULTADOS:

Protocolo I. Marcadores imunoinflamatórios plasmáticos e características ecográficas de aterosclerose

Características clínicas dos pacientes: Na Tabela 1 estão descritas as características clínicas dos 120 pacientes estudados neste protocolo. A idade média foi de 65 ± 19 anos, sendo 52% dos participantes do sexo masculino. Aproximadamente metade dos pacientes tinha história clínica de hipertensão ou hipercolesterolemia e menos de 10% eram fumantes atuais. Infarto agudo do miocárdio prévio havia sido diagnosticado em 23 pacientes (19%) e 20 (16%) tinham história clínica compatível com angina pectoris. As razões para a realização do ecocardiograma transtorácico incluíram avaliação da função de ventrículo esquerdo (34%), avaliação valvular (31%), doença arterial coronariana (14%), arritmias (5%), avaliação preoperatória (5%) ou outros motivos (11%).

Parâmetros carotídeos e medidas plasmáticas: A EIM no segmento da bifurcação carotídea foi significativamente maior do que no segmento distal da artéria carótida comum ($1,2 \pm 0,3$ mm vs. $0,9 \pm 0,2$ mm; $p < 0,05$). Placas ateroscleróticas bem definidas foram observadas em 29 pacientes (31%), todos com espessamento de parede maior do que 2 mm. Neste estudo, não foram observados indivíduos com obstruções carotídeas graves (>70%). A EIM nos segmentos da artéria carótida comum e da bifurcação carotídea e a EIM máxima foram categorizadas em tertis como descrito na Tabela 2.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos participantes do protocolo I.

Características (n=120)	n (%)
Idade, anos*	65 ± 9
Homens/Mulheres	63 (52) / 57 (48)
Hipertensão arterial sistêmica†	67 (56)
Hipercolesterolemia †	55 (46)
<i>Diabetes mellitus</i> †	18 (15)
História familiar de cardiopatia isquêmica prematura ‡	32 (27)
Tabagismo (atual ou passado)	81 (66)
Angina estável	20 (16)
Infarto do miocárdio prévio	23 (19)
Revascularização coronariana	23 (19)
Eventos coronarianos prévios	7 (8)
Ecocardiograma	
Fração de ejeção, %*	62 ± 16
Níveis plásmaticos *	
SVCAM-1 (ng/ml) (n=92)	664 ± 315
SICAM-1 (ng/ml) (n=92)	305 ± 142
IL-6 (pg/ml)	18 ± 20 (15,4) §
Proteína amilóide A (mg/dl)	2,5 ± 8,3 (0,4) §
PCR (mg/dl)	0,8 ± 1,4 (0,4) §
Homocisteína total (µmol/l)	11,1 ± 4,8 (10,2) §
Colesterol total (mg/dl)	200 ± 44
Colesterol HDL (mg/dl)	46 ± 13
Colesterol LDL (mg/dl)	118 ± 33
Lipoproteína(a) (mg/dl)	29 ± 29

* Expressos como média ± desvio padrão

† definidos pela história clínica.

‡ definido como história de infarto do miocárdio ou morte súbita no pai ou outro familiar de primeiro grau do sexo masculino com menos de 55 anos, ou mãe ou outro familiar de primeiro grau do sexo feminino com menos de 65 anos.

§ valor entre parênteses refere-se à mediana.

Tabela 2. Tertis de distribuição da EIM da artéria carótida comum, bifurcação carotídea e espessura máxima.

	Tertis		
	Inferior	Intermediário	Superior
Carótida Comum (mm)	$EIM \leq 0,7$	$0,7 < EIM \leq 0,9$	$EIM > 0,9$
Bifurcação Carotídea (mm)	$EIM \leq 0,95$	$0,95 < EIM \leq 1,25$	$EIM > 1,25$
Espessura Máxima (mm)	$EIM \leq 1,0$	$1,0 < EIM \leq 1,6$	$EIM > 1,6$

EIM – espessura íntima-média

Os níveis séricos de sVCAM-1 e sICAM-1 foram 664 ± 315 ng/ml e 305 ± 142 ng/ml, respectivamente, sendo as medianas 572 ng/ml e 270 ng/ml. O perfil lipídico e outras medidas plasmáticas estão sumarizados na Tabela 1.

Associações não ajustadas entre os parâmetros carotídeos e as medidas plasmáticas: De uma forma geral, pacientes com espessamento parietal pronunciado nos diversos segmentos das artérias carótidas tinham níveis mais elevados das frações solúveis das moléculas de adesão (Figura 3). Os níveis séricos de sVCAM-1, por exemplo, estavam significativamente mais elevados no tercil superior quando comparados ao tercil inferior da EIM carotídea (773 ± 419 vs. 564 ± 191 ng/ml para a EIM na carótida comum; 826 ± 444 vs. 560 ± 175 ng/ml para EIM na bifurcação carotídea; e 787 ± 429 vs. 535 ± 158 ng/ml para EIM carotídea máxima, todos $p < 0,05$). As mesmas diferenças foram observadas para níveis de sICAM-1 entre os tertis superior e inferior da EIM na artéria carótida comum (376 ± 171 vs. 263 ± 112 ng/ml; $p < 0,05$).

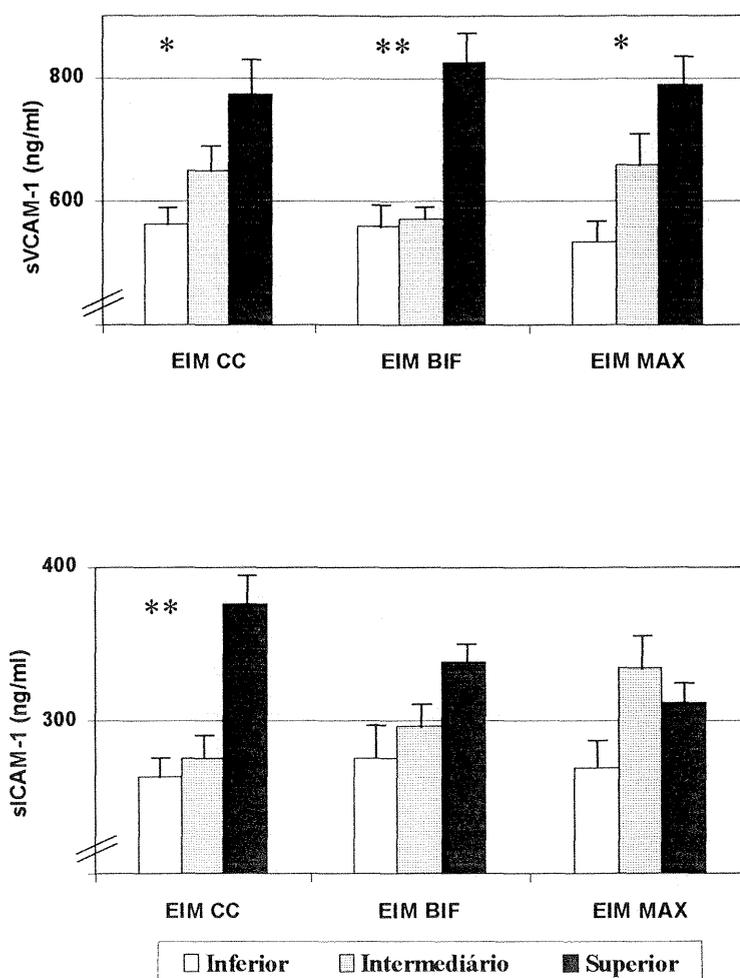


Figura 3. Níveis plasmáticos das moléculas de adesão de acordo com tertis de espessura íntima-média (EIM) das artérias carótidas comum (CC), bifurcação carotídea (BIF) e espessura íntima-média máxima (MAX). Barras correspondem às médias e linhas correspondem ao erro padrão da média. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (entre o tertil inferior e o tertil superior).

Os coeficientes de correlação entre sVCAM-1 e sICAM-1 e os parâmetros carotídeos avaliados estão apresentados na Tabela 3. Ambas moléculas de adesão correlacionaram-se significativamente com a EIM da artéria carótida comum ($p < 0,01$) e

da bifurcação carotídea ($p < 0,01$). Concentrações plasmáticas de sVCAM-1 também foram positivamente associadas com a EIM carotídea máxima ($p < 0,001$). Uma análise no subgrupo de pacientes ($n = 62$) sem manifestação prévia de doença vascular aterotrombótica (história de angina, infarto agudo do miocárdio, revascularização miocárdica e eventos neurológicos prévios) também demonstrou uma associação significativa entre o nível das moléculas de adesão e as variáveis ecográficas avaliadas. Nenhuma outra mensuração de lípides associou-se significativamente com a EIM carotídea neste grupo de pacientes, à exceção de uma tendência à associação inversa com os níveis de colesterol HDL.

Doença carotídea vascular também foi classificada de acordo com a presença de placas ateroscleróticas em qualquer nível do sistema carotídeo (Figura 4). Pacientes com placas carotídeas tiveram valores mais elevados de sVCAM-1 quando comparados com pacientes sem lesões, independentemente da EIM (820 ± 436 vs. 592 ± 208 ng/ml, respectivamente; $p = 0,01$). Essas diferenças não foram observadas para sICAM-1.

Table 3. Coeficientes de correlação não-ajustados e ajustados para idade entre sVCAM-1 e sICAM-1 e EIM carotídea.

	sVCAM-1		sICAM-1	
	Não-ajustado	Ajustado	Não-ajustado	Ajustado
Todos pacientes (n=92)				
EIM da carótida comum	0.34*	0.16†	0.30*	0.32*
EIM da bifurcação carotídea	0.31*	0.18†	0.26*	0.23*
EIM máxima	0.35*	0.32*	0.16	0.08

* $p < 0,05$; † $p < 0,15$

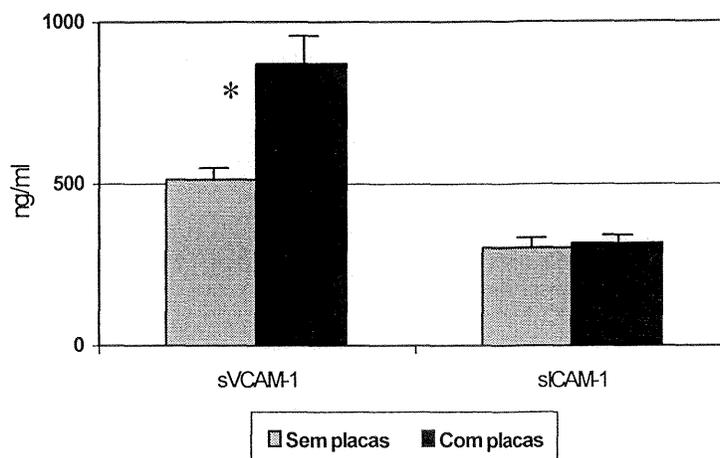


Figura 4. Níveis das moléculas de adesão de acordo com a presença de placas ateroscleróticas no sistema carotídeo. Barras correspondem às médias e linhas correspondem ao erro padrão da média. * $p < 0,05$

Finalmente, não se identificou associação entre parâmetros ecográficos carotídeos e outros marcadores plasmáticos de inflamação, como PCR e proteína amiloide A (todos coeficientes de correlação com valores de $p > 0,05$).

Níveis de sVCAM-1 e sICAM-1 ajustados para outros fatores de risco: As Tabelas 4 e 5 apresentam valores estimados de sVCAM-1 e sICAM-1 de acordo com os tertis carotídeos ajustados para idade, presença de hipertensão e *diabetes mellitus*, tabagismo atual, perfil lipídico e níveis de homocisteína. Os valores estimados de sVCAM-1 mantiveram-se significativamente correlacionados com os parâmetros carotídeos, à exceção dos valores ajustados para idade nos tertis de EIM da carótida comum. Os valores estimados de sICAM-1 também mantiveram-se associados com os tertis de EIM da artéria carótida comum. Como demonstrado, a maioria dos fatores de risco teve pouco impacto nas associações entre moléculas de adesão e a EIM carotídea.

Na análise multivariada, após controle para idade, hipertensão, *diabete mellitus*, uso atual de cigarro, perfil lipídico e níveis de homocisteína, sVCAM-1 foi a única variável que permaneceu significativamente associada ($p < 0,01$) com EIM carotídea máxima; enquanto que sICAM-1 ($p < 0,05$), *diabetes mellitus* ($p < 0,01$) e idade ($p < 0,01$) foram as variáveis que permaneceram associadas com EIM na carótida comum e bifurcação carotídea.

Tabela 4. Níveis estimados de sVCAM-1 (ng/ml) de acordo com tertis de EIM carotídea corrigidos para fatores de risco para doença cardiovascular.

	Idade	HAS	DM	Tabagismo	HDL	LDL	Homocisteína
EIM da carótida comum							
Inferior	625±60	587±57	577±57	574±57	567±56	570±56	562±56
Intermediário	650±53	651±53	641±54	638±55	658±54	646±53	652±54
Superior	714±58	749±55*	767±55*	775±55*	760±55*	769±54*	772±55*
EIM da bifurcação carotídea							
Inferior	582±54	582±54	568±54	562±54	563±53	539±54	554±53
Intermediário	585±52	572±52	576±53	574±53	580±53	599±54	577±52
Superior	792±54*	803±53*	814±53*	821±52*	828±51*	832±50*	838±50*
EIM máxima							
Inferior	566±55	571±58	542±56	542±57	549±56	534±55	525±57
Intermediário	663±52	640±54	666±54	657±54	654±53	657±53	664±53
Superior	754±52*	771±53*	773±55*	780±54*	778±53*	788±52*	789±52*

Dados expressos como média ± erro padrão da média.

HAS- hipertensão; DM- *diabetes mellitus*.

* p para tendência < 0,05.

Tabela 5. Níveis estimados de sICAM-1 (ng/ml) de acordo com tertis de EIM carotídea corrigidos para fatores de risco para doença cardiovascular.

	Idade	HAS	DM	Tabagismo	HDL	LDL	Homocisteína
EIM da carótida comum							
Inferior	253±27	261±26	261±25	269±25	266±24	263±25	263±25
Intermediário	275±24	275±24	277±24	270±24	280±23	275±24	275±24
Superior	384±26*	378±25*	376±25*	376±24*	368±24*	376±24*	376±24*
EIM da bifurcação carotídea							
Inferior	275±27	275±27	273±26	277±26	278±26	275±27	276±26
Intermediário	296±26	295±26	294±26	297±26	303±25	295±27	295±26
Superior	338±27	338±26	341±26†	335±25†	331±24	341±25†	340±25
EIM máxima							
Inferior	272±27	267±28	268±27	274±27	279±26	269±26	268±26
Intermediário	334±09	335±26	332±26	333±25	331±25	333±26	335±26
Superior	307±26	312±25	313±26	307±25	305±24	311±25	300±26

Dados expressos como média ± erro padrão da média.

HAS- hipertensão; DM- *diabetes mellitus*.

* p para tendência < 0,05; † p para tendência < 0,1.

Associações entre dimensões aórticas e medidas plasmáticas: O diâmetro aórtico corrigido para superfície corporal em indivíduos com dilatação aórtica (n = 7) e sem dilatação aórtica (n = 113) foi de $2,1 \pm 0,6 \text{ cm/m}^2$ e $0,86 \pm 0,1 \text{ cm/m}^2$, respectivamente (p < 0,01). Não se identificou doença oclusiva aórtica em nenhum paciente neste estudo. Os níveis de IL-6 aumentaram progressivamente no grupo de pacientes com dimensão aórtica normal (diâmetro baixo [< 0,84 cm/m²] e alto [≥ 0,84cm/m²]) e atingiram um

pico no subgrupo de pacientes com dilatação aórtica ($2,3 \pm 1,2$ pg/ml vs. $2,7 \pm 0,9$ pg/ml vs. $3,2 \pm 0,9$ pg/ml, respectivamente, valor de p para tendência = 0,039; Figura 5). A mesma tendência foi observada para os níveis plasmáticos de homocisteína e proteína amilóide A.

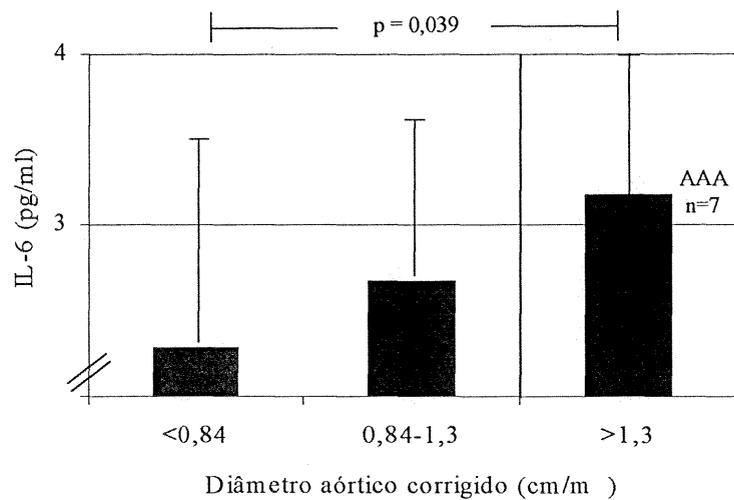


Figura 5. Níveis de interleucina-6 de acordo com o diâmetro aórtico corrigido. A coluna da esquerda ($>1,3$ cm/m²) refere-se a sete pacientes com dilatação aórtica abdominal. AAA – aneurisma de aorta abdominal.

Nos 113 participantes sem dilatação aórtica, o diâmetro aórtico corrigido foi positivamente associado com os níveis séricos de IL-6 ($r = 0,29$, $p < 0,01$), proteína amilóide A ($r = 0,27$, $p < 0,01$) e homocisteína total ($r = 0,24$, $p = 0,01$). Apesar dos níveis de PCR terem correlacionado-se significativamente com os níveis de proteína

amilóide A ($r = 0,60$; $p < 0,001$), a associação entre PCR e diâmetro aórtico não foi significativa. Da mesma forma, as moléculas de adesão circulante sICAM-1 e sVCAM-1 não se associaram significativamente com o diâmetro aórtico ($r = 0,04$ e $r = -0,02$, respectivamente). Cabe ressaltar que nenhuma medida de lípides plasmáticos (colesterol total, colesterol HDL e LDL, lipoproteína (a)) correlacionou-se com o diâmetro aórtico abdominal corrigido. Em modelo multivariado, após controle para idade, hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus*, tabagismo, história de infarto ou angina e medidas plasmáticas de lípides e homocisteína, apenas os níveis séricos de IL-6 ($\beta = 0,003$, $p = 0,02$), proteína amilóide A ($\beta = 0,005$, $p = 0,001$) e homocisteína total ($\beta = 0,011$, $p < 0,001$) mantiveram-se significativamente correlacionados com o diâmetro aórtico corrigido ($r^2 = 0,26$).

Protocolo II. Marcadores imunoinflamatórios plasmáticos e fatores de risco para doença cardiovascular

Distribuição dos dados: A Figura 6 demonstra a distribuição dos níveis de sICAM-1 e PCR entre os participantes deste protocolo (n=948 para sICAM-1 e n=1374 para PCR). Os níveis plasmáticos de sICAM-1 variaram de 59 a 675 ng/ml e tiveram distribuição aproximadamente normal. Os valores da média e mediana para este grupo foram de 238 e 229 ng/ml, respectivamente. Os níveis séricos de PCR variaram de 0,02 a 27,38 mg/l e não tinham distribuição normal. Os valores da média e mediana para este grupo foram de 2,2 e 1,3 mg/l, respectivamente. Os níveis de PCR foram transformados em valores logarítmicos, como demonstrado na Figura 7.

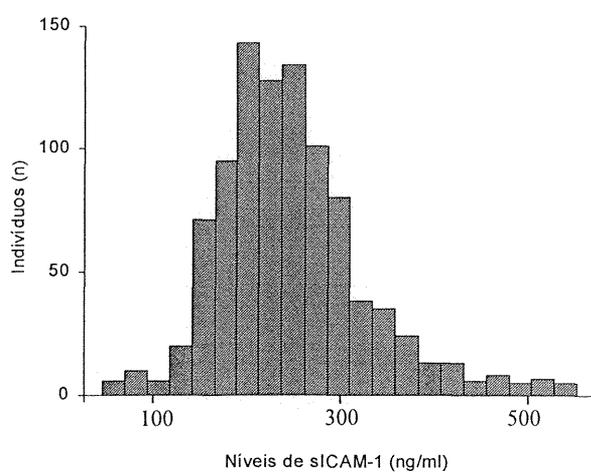


Figura 6 – Histograma de distribuição dos níveis de sICAM-1 entre homens aparentemente saudáveis.

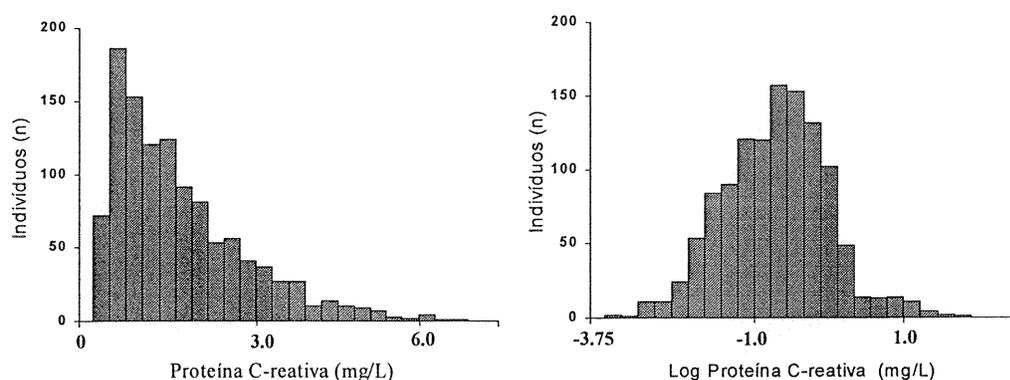


Figura 7 – Histograma de distribuição dos níveis de PCR (antes e após transformação logarítmica) entre homens aparentemente saudáveis.

Análise univariada: A Tabela 6 demonstra os níveis de sICAM-1 e de PCR de acordo com a presença ou ausência de diversos fatores de risco cardiovascular definidos pelos participantes do estudo. As concentrações plasmáticas de sICAM-1 e PCR foram significativamente maiores em indivíduos com história de hipertensão arterial sistêmica ($p < 0,05$). Como demonstrado nas Figuras 8 e 9, as concentrações de sICAM-1 e PCR também aumentaram progressivamente, de acordo com os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica, categorizadas em incrementos de 10 mmHg. Indivíduos com pressão arterial sistólica maior que 140 mmHg, por exemplo, tinham níveis plasmáticos médios de sICAM-1 de 248 ± 71 ng/ml, enquanto aqueles com pressão arterial sistólica menor que 110 mmHg tinham níveis de 210 ± 54 ng/ml (p para tendência < 0.001).

Tabela 6. Valores de sICAM-1 e PCR de acordo com fatores de risco cardiovascular definidos pela história clínica.

Fator de Risco *	N	sICAM-1 (ng/ml)	P	N	Log PCR (ng/ml)	P
História de hipertensão						
Não	725	235±68		882	0,1±0,9 (1,1)	
Sim		246±71	<0,01	285	0,5±0,9 (1,6)	<0,001
História de <i>diabetes mellitus</i>						
Não	909	237±68		1093	0,2±0,9 (1,2)	
Sim	35	258±73	0,09	75	0,4±1 (1,5)	0,08
História de dislipidemia						
Não	746	237±70		935	0,2±0,9 (1,2)	
Sim	103	239±69	0,70	117	0,4±1 (1,5)	0,02
Tabagismo						
Nunca	420	222±56		468	0±0,9 (1)	
Passado	386	238±67		476	0,2±0,9 (1,2)	
Presente	140	284±85	<0,001	224	0,7±1 (2,0)	<0,001
Frequência de exercício						
> uma vez/semana	640	235±70		809	0,2±0,9 (1,2)	
< uma vez/semana	298	244±66	<0,01	348	0,3±1 (1,3)	<0,01
Ingesta de álcool						
Nunca ou rara	163	230±58		194	0,2±1 (1,2)	
Semanal ou mensal	553	236±70		639	0,2±1 (1,2)	
Diária	230	248±71	0,02	334	0,3±0,9 (1,3)	0,5
Índice de massa corporal						
< 27,8 kg/m ²	804	235±68		1158	0,1±0,9 (1,1)	
≥ 27,8 kg/m ²	146	251±68	<0,01	216	0,6±0,9 (1,8)	<0,001

* conforme informações fornecidas pelos médicos participantes do estudo.

Valores expressos entre parênteses representam a média geométrica.

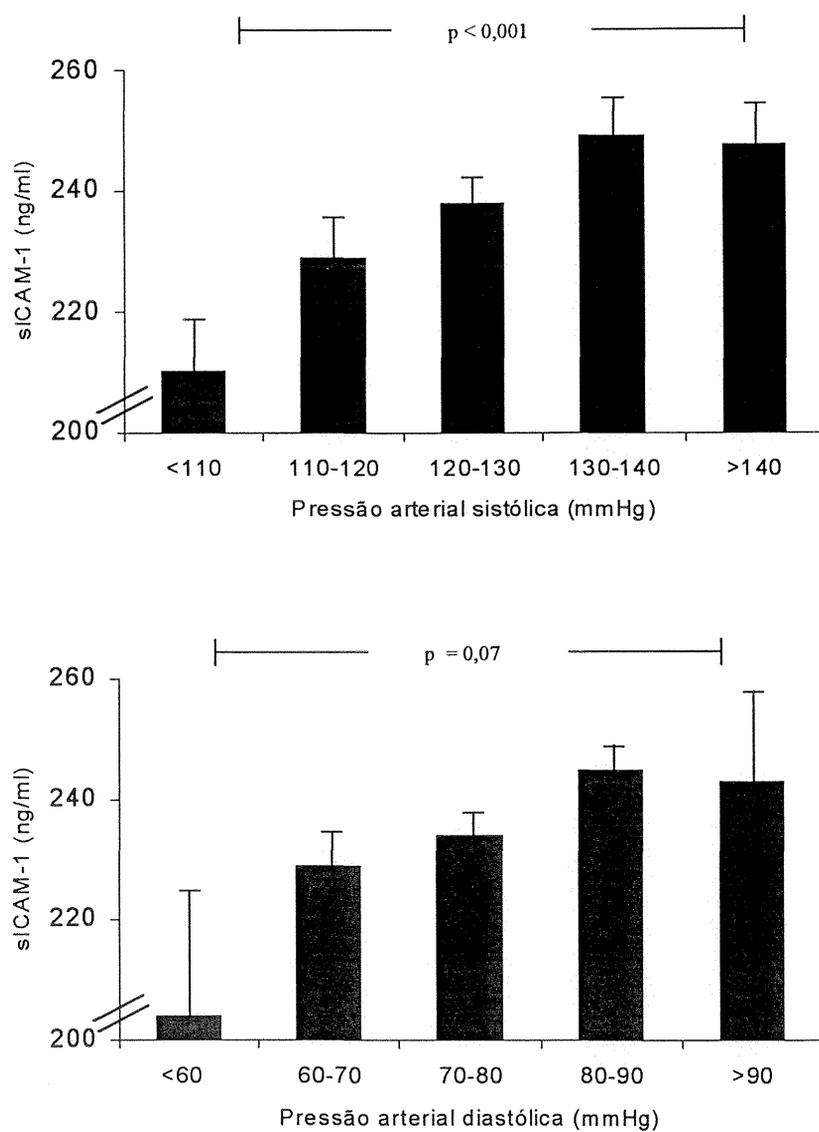


Figura 8. Níveis de sICAM-1 de acordo com os valores de pressão arterial sistólica e diastólica estratificados a cada 10 mmHg. Valores expressos como média aritmética e erro padrão. Valor de p para tendência.

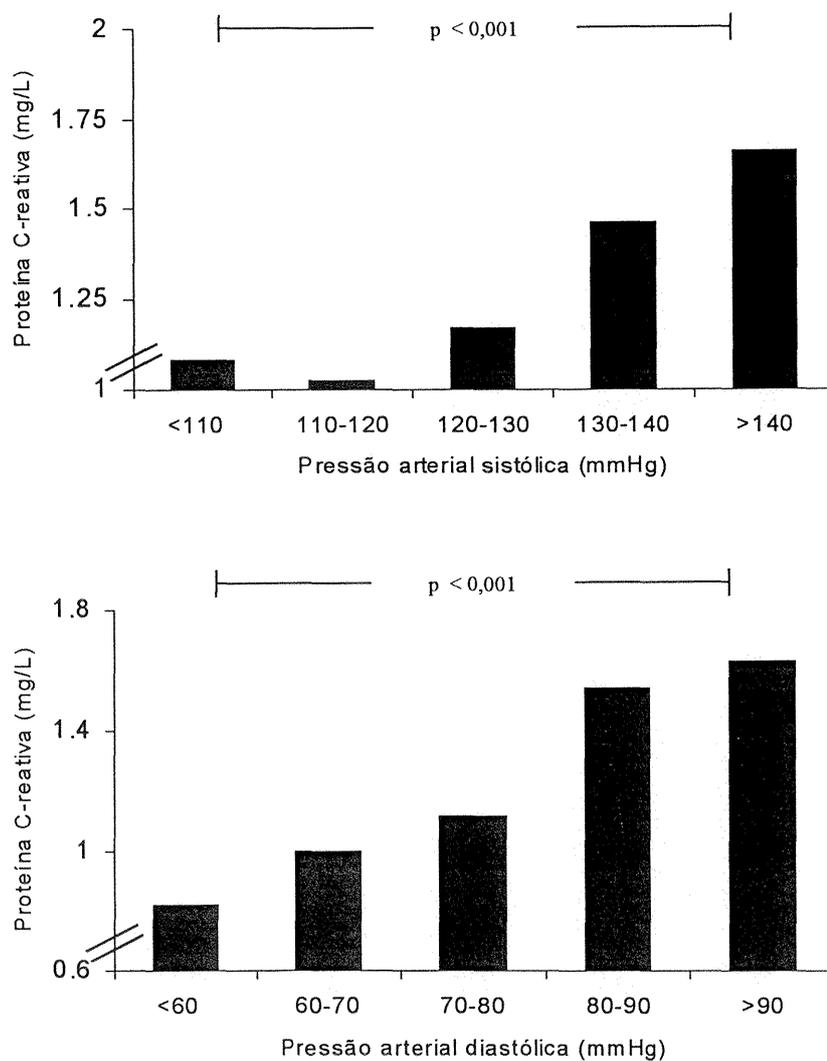


Figura 9. Níveis de PCR de acordo com os valores de pressão arterial sistólica e diastólica estratificados a cada 10 mmHg. Valores expressos em média geométrica. Valor de p para tendência.

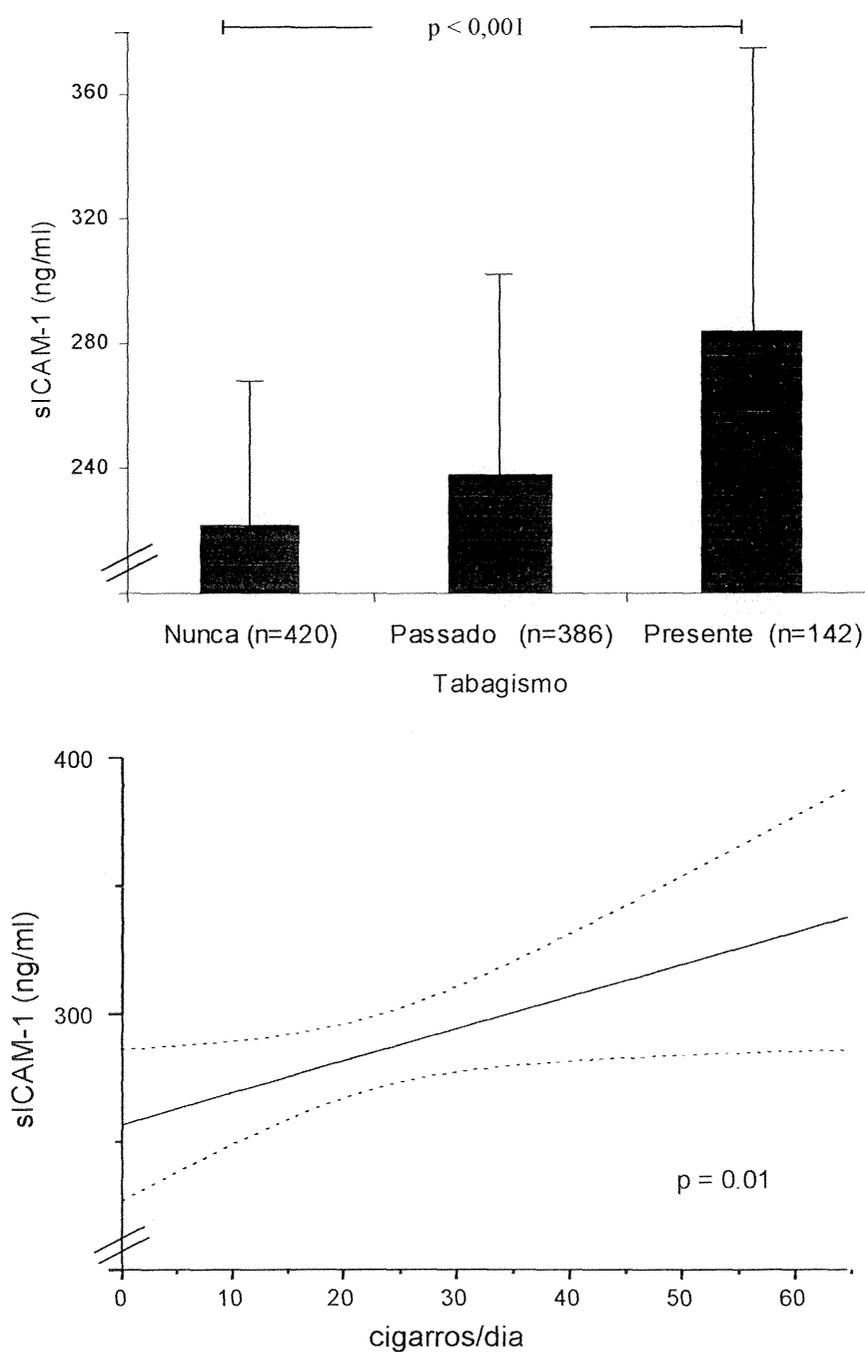


Figura 10 – Níveis de sICAM-1 estratificados pela história de tabagismo (Figura superior). Correlação entre os níveis de sICAM-1 e o número de cigarros fumados por dia entre os fumantes atuais (Figura inferior). Barras correspondem à média e linhas correspondem ao erro padrão da média.

Os níveis de sICAM-1 também aumentaram progressivamente nos indivíduos que nunca fumaram, fumantes no passado e fumantes atuais (Figura 10, parte superior). Adicionalmente, nos fumantes atuais, encontrou-se uma associação positiva entre o número de cigarros fumados por dia e os níveis de sICAM-1 ($r = 0,22$; $p = 0,01$) (Figura 10, parte inferior) e de PCR ($r = 0,29$; $p = 0,01$).

Indivíduos que se exercitavam em média mais do que uma vez por semana tinham níveis plasmáticos de PCR menores que aqueles que não se exercitavam frequentemente ($p < 0,001$ - Tabela 6). Resultados similares foram observados para a molécula de adesão sICAM-1. Uma relação inversa também foi observada entre a frequência de exercício e valores de sICAM-1 estratificadas em quartis, de forma que aqueles indivíduos que se exercitavam mais do que uma vez por semana tinham uma probabilidade menor (22% vs. 32%; p para tendência $< 0,001$) de terem níveis no quartil superior de sICAM-1 (Figura 11). sICAM-1 e PCR também aumentaram de acordo com o índice de massa corporal ($p = 0,02$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Tabela 6). Indivíduos com obesidade clínica (índice de massa corporal $\geq 27,8$ kg/m²), por exemplo, tiveram níveis de sICAM-1 de 251 ± 68 ng/ml, quando comparados com níveis de 235 ± 68 ng/ml para aqueles sem obesidade clínica ($p < 0,01$).

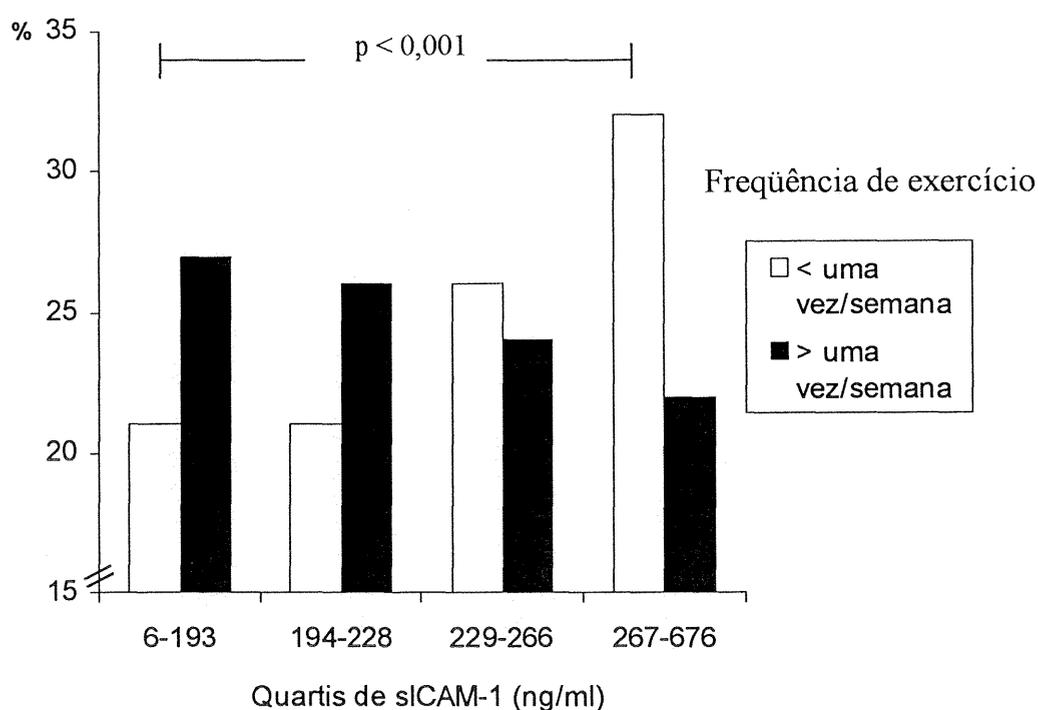


Figura 11. Percentual de homens aparentemente saudáveis que se exercitavam menos ou mais do que uma vez por semana, de acordo com a distribuição em quartis de sICAM-1. Valor de p representa tendência.

Os níveis de sICAM-1 e PCR aumentaram significativamente de acordo com a idade ($r=0,15$ e $r=0,10$; $p<0,001$, respectivamente). Coeficientes de correlação entre sICAM-1 e PCR e outros fatores de risco cardiovascular estão descritos na Tabela 7. Foram encontradas associações positivas entre esses marcadores e níveis de pressão arterial sistólica (ambos $p<0,001$) e diastólica (ambos $p<0,001$), triglicerídeos (ambos $p<0,001$), fibrinogênio (ambos $p<0,001$), antígeno ativador de plasminogênio tecidual (ambos $p<0,001$) e homocisteína total ($p=0,02$ e $p<0,001$; respectivamente). Também foi

observada uma correlação inversa entre sICAM-1 e PCR com níveis plasmáticos de colesterol HDL (ambos $p < 0,001$). O ajuste dos coeficientes para idade teve um impacto pequeno nas associações descritas acima.

Tabela 7. Coeficientes de correlação não-ajustados e ajustados para idade entre os níveis plasmáticos de sICAM-1 e PCR e fatores de risco cardiovascular.

Fator de risco	Não-ajustados		Ajustados	
	r	P	r	P
sICAM-1				
Índice de massa corporal (kg/m^2)	0,08	0,02	0,05	0,14
Pressão arterial sistólica (mmHg)	0,17	< 0,001	0,11	< 0,001
Pressão arterial diastólica (mmHg)	0,10	0,004	0,07	0,04
Colesterol total (mg/dl)	-0,05	0,17	- 0,03	0,48
Colesterol HDL (mg/dl)	-0,15	< 0,001	-0,14	< 0,001
Triglicerídeos (mg/dl)	0,15	< 0,001	0,10	0,02
Lipoproteína (a) (mg/dl)	0,001	0,98	0,02	0,53
Fibrinogênio (mg/dl)	0,21	< 0,001	0,15	0,004
t-PA (ng/ml)	0,17	< 0,001	0,11	0,03
Homocisteína total ($\mu\text{mol/l}$)	0,09	0,02	0,11	0,003
Proteína C-reativa				
Índice de massa corporal (kg/m^2)	0,24	<0,001	0,25	<0,001
Pressão arterial sistólica (mmHg)	0,19	<0,001	0,16	<0,001
Pressão arterial diastólica (mmHg)	0,19	<0,001	0,17	<0,001
Colesterol total (mg/dl)	0,14	<0,001	0,16	<0,001
Colesterol HDL (mg/dl)	-0,18	<0,001	-0,17	<0,001
Triglicerídeos (mg/dl)	0,20	<0,001	0,15	<0,001
Lipoproteína (a) (mg/dl)	0,07	0,04	0,06	0,08
Fibrinogênio (mg/dl)	0,34	<0,001	0,28	<0,001
t-PA (ng/ml)	0,24	<0,001	0,24	<0,001
Homocisteína total ($\mu\text{mol/l}$)	0,14	<0,001	0,12	<0,001

t-PA – Antígeno ativador do plasminogênio tecidual.

Para melhor descrever a associação de sICAM-1 e PCR com fatores de risco lipídicos e com os níveis de fibrinogênio, esses fatores de risco também foram analisados de acordo com os quartis da distribuição de sICAM-1 e PCR (Tabela 8). Nessas análises, observamos associações significativas de sICAM-1 e PCR com níveis de triglicerídeos, fibrinogênio e HDL colesterol.

Tabela 8. Fatores de risco cardiovascular plasmáticos estratificados por quartis de sICAM-1 e PCR.

	Quartis de sICAM-1				p
	60-193 ng/ml	194-228 ng/ml	229-267 ng/ml	267-676 ng/ml	
Colesterol total (mg/dl)	221±37	223±40	216±36	220±36	0,4
Colesterol HDL (mg/dl)	49±13	49±12	48±13	44±13	<0,001
Triglicerídeos (mg/dl)	174±152	168±116	163±97	211±137	0,007
Fibrinogênio (mg/dl)	242±65	256±83	289±110	283±81	<0,001
	Quartis de LogPCR				p
	<0,5 mg/l	-0,5-0,2 mg/l	0,2-0,8 mg/l	>0,8 mg/l	
Colesterol total (mg/dl)	205±31	214±38	220±36	223±45	<0,001
Colesterol HDL (mg/dl)	50±14	49±13	49±13	45±13	0,002
Triglicerídeos (mg/dl)	159±133	171±111	182±128	206±144	0,03
Fibrinogênio (mg/dl)	254±95	273±118	279±104	327±120	<0,001

Impacto cumulativo dos fatores de risco: Para a avaliação do impacto cumulativo de múltiplos fatores de risco nas concentrações plasmáticas de sICAM-1 e PCR, esses marcadores foram avaliados de acordo com a presença de diversos fatores de risco tradicionais: idade superior a 65 anos, presença de *diabetes mellitus*, tabagismo atual ou passado, pressão arterial sistólica superior a 140 mmHg, pressão arterial diastólica superior a 90 mmHg, colesterol total acima de 240 mg/dl (apenas para PCR), colesterol HDL abaixo de 35 mg/dl e triglicerídios acima de 200 mg/dl. Como demonstrado na Figura 12, sICAM-1 e PCR elevaram-se progressivamente de acordo com a prevalência desses fatores de risco. Especificamente, os níveis de sICAM-1 foram de 206 ± 48 , 235 ± 71 , 251 ± 79 , 253 ± 58 e 274 ± 85 ng/ml para aqueles indivíduos com 0, 1, 2, 3 e mais de 4 fatores de risco, respectivamente (p para tendência < 0,001). Os níveis de PCR foram de $1,2 \pm 1,2$, $1,8 \pm 2,3$, $2,2 \pm 3,3$, $2,4 \pm 2,2$ e $2,5 \pm 1,8$ ng/ml para aqueles indivíduos com 0, 1, 2, 3 e mais de 4 fatores de risco, respectivamente (p para tendência < 0,001) (Figura 12).

Análise multivariada: Em análise multivariada, as variáveis associadas de forma independente com os níveis de sICAM-1 foram idade superior a 50 anos (p<0,01), tabagismo (p<0,001), história de *diabetes mellitus* (p=0,02), história familiar positiva para doença coronariana (p=0,04), níveis de pressão arterial sistólica (p<0,01), níveis séricos de homocisteína total (p=0,02) e fibrinogênio (p=0,05). Juntas elas explicaram 28% da variância dos níveis de sICAM-1. As variáveis que se associaram de forma independente com os níveis de PCR foram idade (p=0,04), tabagismo (p=0,01), índice de

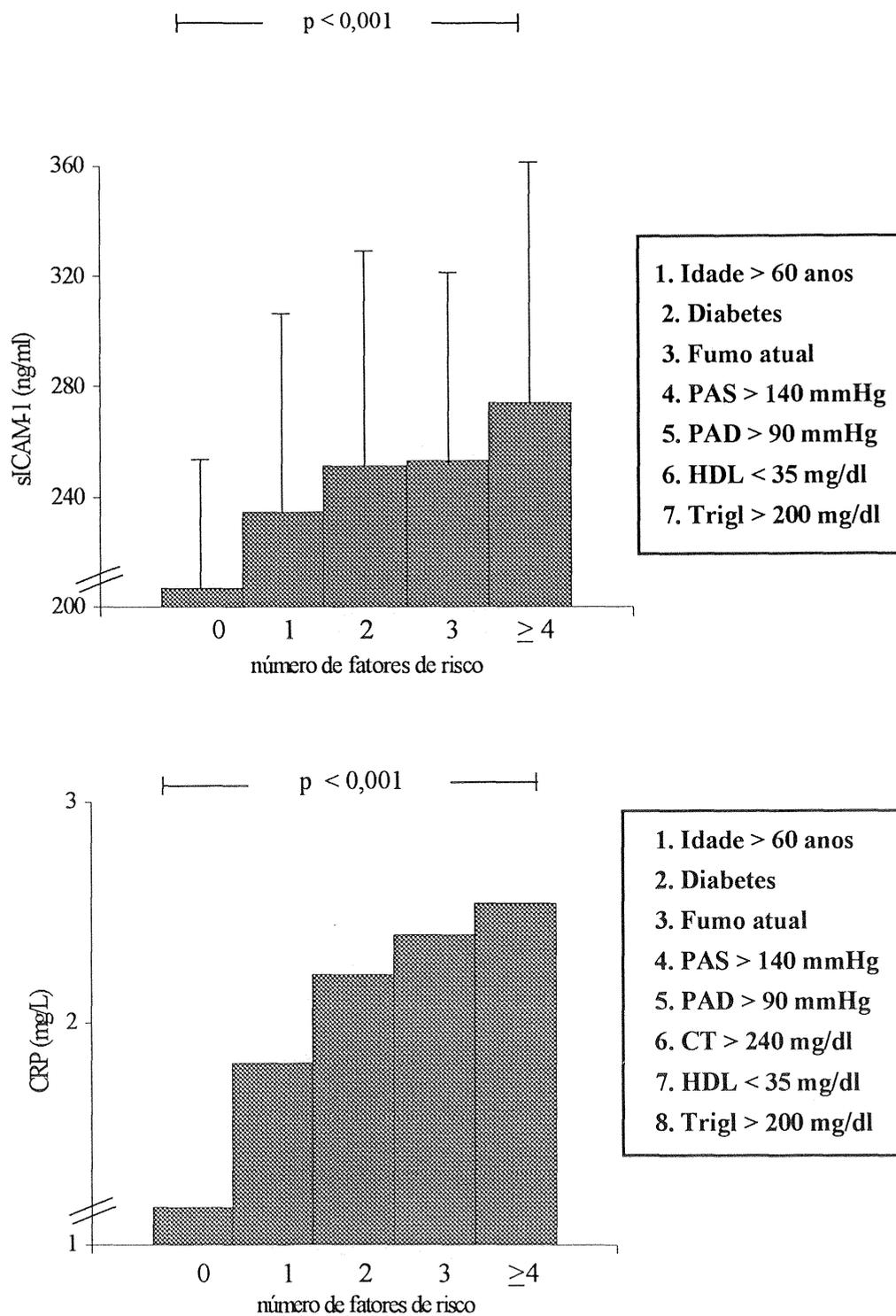


Figura 12- Níveis de sICAM-1 e PCR de acordo com o número de fatores de risco tradicionais presentes entre homens aparentemente saudáveis. PAS – pressão arterial sistólica; PAD – pressão arterial diastólica; Trigl. – triglicerídeos, CT – colesterol total.

massa corporal ($p < 0,001$), níveis séricos de homocisteína ($p = 0,03$), lipoproteína (a) ($p = 0,009$), antígeno ativador do plasminogênio tecidual ($p < 0,001$) e fibrinogênio ($p < 0,001$) ($r^2 = 0,28$).

CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO

Protocolo I – Associação entre marcadores imunoinflamatórios com parâmetros ecográficos

Estudo da EIM carotídea

Os resultados deste estudo demonstram uma associação direta entre as frações solúveis das moléculas de adesão sVCAM-1 e sICAM-1 e a EIM carotídea avaliada por ultra-som. Esta associação foi pouco influenciada pela maioria dos fatores de risco cardiovascular avaliados. Estes achados estão de acordo com diversos estudos experimentais que avaliaram o papel das moléculas de adesão no processo aterosclerótico e adicionam informações potencialmente relevantes no entendimento dos processos fisiopatológicos iniciais que levam ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas definidas.

Vários estudos indicam que as moléculas de adesão têm um papel crítico em diversas etapas do processo aterosclerótico. A expressão focal de VCAM-1 já foi bem documentada em placas ateroscleróticas humanas (29,30), ocorrendo particularmente no endotélio neovascular e em células musculares lisas. Estudos patológicos em artérias coronárias humanas também demonstraram que existe uma correlação direta entre a expressão de moléculas de adesão e a densidade de macrófagos nas lesões ateroscleróticas (30). Além disso, a expressão de VCAM-1 em células endoteliais aumenta rapidamente depois de uma dieta aterogênica e parece preceder a infiltração de leucócitos (28,31). Estudos de células endoteliais em cultura (33,88-91) também demonstraram que substâncias derivadas de lipoproteínas modificadas ou outros produtos

derivados de lípidos podem regular a expressão de VCAM-1. Recentemente, dois estudos (93,94) utilizando camundongos com deleção programada dos genes de diversas moléculas de adesão (ICAM-1, P-selectina e CD18) identificaram uma redução significativa do desenvolvimento de estrias gordurosas depois de uma dieta rica em gorduras e colesterol. Finalmente, dados prospectivos de uma grande coorte de homens aparentemente saudáveis indicam que níveis elevados da fração solúvel de VCAM-1 estão associados a um risco aumentado de desenvolver infarto agudo do miocárdio futuro (27).

Níveis circulantes de sVCAM-1 foram previamente associados com a extensão de aterosclerose clínica avaliada por angiografia quantitativa em pacientes com doença arterial periférica (36). Clausell, Prado e Ribeiro recentemente identificaram um aumento significativo dos níveis de sVCAM-1 em pacientes com angina instável, porém sem lesões coronarianas avaliadas pela angiografia convencional (100). Enders e col. (94), através de imunolocalização histoquímica, também demonstraram uma expressão acentuada de VCAM-1 em placas ateroscleróticas avançadas, enquanto ICAM-1 foi detectada apenas em artérias morfologicamente normais. Nossos dados estão de acordo com esses achados, uma vez que apenas a concentração plasmática de sVCAM-1 estava significativamente elevada em pacientes com placas ateroscleróticas carotídeas. Por outro lado, Blann e McCollum (60) não identificaram níveis aumentados de sVCAM-1 em pacientes com aterosclerose definida clinicamente quando comparados com indivíduos controles aparentemente saudáveis. Os achados aparentemente conflitantes desse estudo podem ser resultado, pelo menos em parte, da presença de doença aterosclerótica assintomática nos controles. Nossos dados reforçam e estendem os achados recentes de

Caterina e col. (37). Nesse estudo, uma associação significativa entre sVCAM-1 e EIM carotídea foi demonstrada em uma amostra pequena e selecionada de pacientes com hipertensão arterial sistêmica. Nossos resultados foram similares em uma população mais heterogênea, após a exclusão de pacientes com doença aterotrombótica prévia e depois do ajuste para diversos fatores de risco cardiovascular. Uma sub-análise recente do estudo *Atherosclerosis Risk in Communities*, entretanto, não identificou diferenças nos níveis de sVCAM-1 em pacientes com aterosclerose carotídea e doença coronariana, quando comparados com indivíduos controles (26). As razões para as diferenças entre nossos resultados e os achados dessa sub-análise não são claras, mas podem ser parcialmente explicadas por diferenças nas populações estudadas, uma vez que o *Atherosclerosis Risk in Communities* é um estudo de base populacional. Os níveis médios de sVCAM-1 nos nossos pacientes, por exemplo, foram substancialmente mais elevados do que nos grupos avaliados no referido estudo. Neste sentido, pode-se hipotetizar que a dinâmica das frações solúveis das diferentes moléculas de adesão pode ser distinta, de acordo com a atividade de processo aterosclerótico de cada população em estudo.

A associação de sVCAM-1 e sICAM-1 com a EIM carotídea encontrada no presente estudo enfatiza o papel dessas proteínas nas fases iniciais da aterogênese. A avaliação da EIM através de ultra-som é um método de avaliação não-invasivo seguro, confiável e reprodutível de alterações vasculares incipientes (8,71). Medidas da EIM carotídea avaliadas por ultra-som são rotineiramente utilizadas em estudos populacionais como desfecho substituto para aterosclerose pré-clínica ou inicial e diversos estudos demonstraram uma associação significativa entre EIM e fatores de risco tradicionais para a doença cardiovascular (13-15). Recentemente, títulos de citomegalovírus e níveis de

homocisteína plasmática também foram associados com aterosclerose carotídea avaliada por parâmetros baseados em ultra-som (72-74). Nossos dados concordam com o conceito de que moléculas de adesão circulantes podem potencialmente ser utilizadas como marcadores plasmáticos de aterosclerose pré-clínica (36,37) e consolidam a associação entre inflamação e patologia vascular aterosclerótica em humanos.

Moléculas de adesão estão presentes em uma grande variedade de tipos de células, incluindo o endotélio, macrófagos, linfócitos e certas células tumorais (26,30,31). Os mecanismos relacionados com surgimento de frações solúveis das diversas moléculas de adesão não estão completamente estabelecidos, mas podem envolver a clivagem proteolítica da superfície celular. A concentração plasmática de moléculas de adesão avaliada neste estudo pode refletir a atividade aterosclerótica corporal total, uma vez que essas moléculas estão expressas de forma não específica nos diversos sítios vasculares. Dessa forma, os dados deste trabalho reforçam a hipótese de que a concentração plasmática de moléculas de adesão pode ser um marcador molecular não-específico de aterosclerose corporal total (27).

Algumas limitações do delineamento deste protocolo devem ser consideradas. A espessura carotídea medida por ultra-som bidimensional não é um desfecho substituto perfeito para aterosclerose pré-clínica (14), uma vez que áreas com espessamento da camada íntima-média não necessariamente progridem de forma inexorável para placas ateromatosas (tipo V). Entretanto, como referido previamente, a história natural das alterações estruturais relacionadas à aterosclerose já está bem documentada e sabidamente progride por estágios de espessamento difuso da camada íntima (7). Além disso, como mencionado acima, espessamento carotídeo vem sendo usado de forma

efetiva como desfecho substituto após intervenções terapêuticas em diversos estudos (19). As associações encontradas neste estudo também devem ser consideradas no contexto das características da população estudada. Como os pacientes estudados neste protocolo foram referidos para um laboratório não-invasivo de cardiologia, a generalização dos nossos achados pode ser limitada. Os valores médios de EIM da artéria carótida comum e da bifurcação carotídea na nossa amostra, por exemplo, foram mais elevados do que aqueles descritos para populações mais jovens e relativamente mais saudáveis (17).

Em síntese, sVCAM-1 e sICAM-1 estão associadas com a EIM carotídea, um índice de aterosclerose precoce. Esta associação parece ser pouco afetada por outros fatores de risco cardiovascular. Nossos achados estão de acordo com evidências que sugerem que inflamação tem um papel crítico em diversas síndromes ateroscleróticas (27,36,37,78,100). Outros estudos prospectivos de larga escala são necessários para determinar o valor prognóstico desses marcadores e sua utilização como desfecho terapêutico nas diversas síndromes ateroscleróticas clínicas.

Estudo ultra-sonográfico das dimensões aórticas

Os dados deste estudo indicam que concentrações plasmáticas de IL-6, proteína amilóide A e de homocisteína total aumentam progressivamente com o diâmetro aórtico abdominal entre indivíduos com dimensões aórticas normais. Esses achados sugerem que citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda possam ter um papel relevante nas fases iniciais da patogênese de aneurismas abdominais, mesmo antes de dilatação franca estar estabelecida. Nossos dados, assim, concordam com o conceito de que inflamação crônica participa na patogênese da doença vascular aórtica assintomática. No que diz respeito à

homocisteína, nossos achados concordam com diversas evidências que sugerem um papel importante desse aminoácido no processo aterosclerótico.

Estudos prévios avaliaram os níveis de marcadores inflamatórios circulantes em diversas síndromes ateroscleróticas. Dados recentes do *Physicians Health Study*, por exemplo, indicam que níveis basais de PCR predizem o risco de desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral (24) e doença arterial periférica sintomática (25) em homens aparentemente saudáveis. De forma similar, níveis de IL-6 (85) e de proteína amilóide A (77) estão elevados em indivíduos com angina instável e identificam pacientes com um pior prognóstico a curto prazo. Do ponto de vista experimental, Szekanecz e col. demonstraram que culturas teciduais de aneurismas aórticos humanos produzem significativamente mais IL-6 e interferon- δ do que culturas de tecido aórtico normal (23). Da mesma forma, Juvonen e col. recentemente demonstraram que níveis plasmáticos de IL-6, IL-2 e fator de necrose tumoral- α estão elevados em pacientes com aneurismas aórticos abdominais quando comparados com controles aparentemente saudáveis, apesar de ter sido observada uma sobreposição considerável de níveis plasmáticos individuais entre os grupos (22).

Diversas linhas de evidência sugerem que a inflamação tecidual induzida por citocinas tem um papel importante na patogênese e progressão dos aneurismas aórticos abdominais (101,102). Uma série de citocinas inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral- α e a IL-6, podem regular a expressão de metaloproteinases de matrix extracelular pelos macrófagos. Essas enzimas já foram identificadas em aneurismas aórticos abdominais em humanos (103-105) e podem degradar componentes específicos da matrix extracelular, processo considerado crítico no remodelamento e expansão de

lesões vasculares. McMillan e col. exploraram a relação entre o remodelamento vascular extracelular e as dimensões da aorta abdominal avaliadas por tomografia computadorizada e demonstraram que níveis de transcrição de ácido ribonucléico de colagenase tipo IV, uma metaloproteinase de matrix, diferia de acordo com as dimensões aórticas abdominais (106). Recentemente, Allaire e col. demonstraram que a redução dos níveis de metaloproteinases de matrix induzidas pela expressão exacerbada do inibidor do ativador do plasminogênio tecidual-1 pode prevenir o desenvolvimento e ruptura de aneurismas (107). Nossos achados estendem os resultados de estudos anteriores, uma vez que demonstramos que marcadores inflamatórios circulantes correlacionam-se com as dimensões aórticas avaliadas por ultra-som em um grupo de pacientes ambulatoriais estáveis sem dilatação aórtica franca. Além disso, nesse grupo de pacientes, nenhuma outra característica clínica ou mensuração plasmática, à exceção de níveis de homocisteína total, foi associada com as dimensões aórticas.

A associação positiva entre a concentração plasmática de homocisteína total e o diâmetro aórtico está de acordo com diversos estudos clínicos que sugerem que níveis de homocisteína total estão associados com um risco aumentado de oclusões arteriais e se correlacionam com a extensão de doença aterosclerótica (73). Malinow e col. encontraram uma prevalência elevada de hiperhomocisteinemia entre pacientes com doença arterial periférica oclusiva, quando comparados a um grupo de idosos saudáveis (106). Recentemente, Robinson e col. também demonstraram que níveis elevados de homocisteína estão associados a um risco aumentado de doença vascular periférica, independentemente de diversos fatores de risco tradicionais para doença cardiovascular (109). Além disso, relatos de casos sugerem a existência de uma associação significativa

entre hiperhomocisteinemia e aneurismas múltiplos (110). Os mecanismos pelos quais níveis elevados de homocisteína podem causar dano vascular e posteriormente refletir as dimensões vasculares não são claros. Diversos estudos *in vitro* sugerem que a presença de formas reduzidas de homocisteína pode induzir danos no endotélio vascular (111) e modificar a composição de lipoproteínas de baixa densidade (112).

As razões para a falta de associação entre níveis de PCR e dimensões aórticas não são claras, uma vez que as informações clínicas e a dinâmica de expressão da proteína amilóide A e da PCR são usualmente muito similares (77). PCR pode ser muito inespecífica para identificar uma relação entre processos inflamatórios iniciais e remodelamento vascular. Diferenças entre a depuração da PCR e da proteína amilóide A também podem explicar parcialmente estes achados (113). Por fim, não podemos excluir a possibilidade de que estas associações não tenham sido detectadas pelo tamanho relativamente pequeno da nossa amostra ou pela inclusão de poucos pacientes com aterosclerose avançada.

Algumas potenciais limitações deste protocolo também devem ser consideradas. Dimensões aórticas nos limites superiores daquelas consideradas normais não indicam necessariamente dilatação progressiva. Entretanto, características ultra-sonográficas que possam prever a progressão de lesões ateroscleróticas e a progressão de dilatação vascular ainda não foram estabelecidas. Na verdade, poucos estudos prospectivos avaliaram, de forma sistemática, características de risco para o desenvolvimento e progressão de aneurismas aórticos abdominais (114). A coexistência de dimensões lúminais maiores e aortoesclerose difusa (extra-aórtica) também pode ter influenciado nossos achados. Esta possibilidade parece ser improvável, uma vez que modelos de

análise multivariada demonstraram que fatores de risco tradicionais e outras comorbidades cardiovasculares não alteraram substancialmente as associações observadas.

Em resumo, nossos dados indicam que IL-6, proteína amilóide A e homocisteína total estão associadas com as dimensões aórticas abdominais, mesmo em indivíduos sem dilatação aórtica franca. Nossos achados sugerem que alguns dos marcadores inflamatórios comumente associados com síndromes aterotrombóticas (24,25,77,79-81) também estão envolvidos nas fases iniciais da doença aórtica vascular. Novos estudos serão necessários para avaliar se níveis circulantes desses marcadores podem prever a progressão para dilatação ou identificar um subgrupo de pacientes nos quais um acompanhamento clínico mais cuidadoso deva ser planejado.

Protocolo II – Associação entre marcadores imunoinflamatórios e fatores de risco cardiovascular

Moléculas de adesão (sICAM-1)

A função primária dessas moléculas é a de promover a adesão e migração de leucócitos circulantes através da parede endotelial, etapas consideradas críticas na aterogênese. Recentemente, níveis basais de pelo menos uma dessas moléculas, sICAM-1, demonstraram-se preditores do risco de desenvolvimento de infarto agudo do miocárdio futuro (26-27). Entretanto, apesar desses achados provocativos, dados que caracterizem as potenciais interrelações entre sICAM-1 e fatores de risco cardiovascular são escassos.

Nesse estudo transversal de homens de meia-idade, aparentemente saudáveis, observamos que níveis plasmáticos de sICAM-1 estão positivamente associados com diversos fatores de risco cardiovascular estabelecidos, incluindo idade, tabagismo,

hipertensão, *diabetes mellitus* e níveis séricos de triglicérides, fibrinogênio, homocisteína, e antígeno ativador do plasminogênio tecidual. Apesar da magnitude destas correlações ser modesta, elas acrescentam informações potencialmente importantes no entendimento do papel dessas moléculas no processo aterogênico. Além disto, as associações observadas para sICAM-1 são similares em magnitude àquelas encontradas para outros fatores de risco, incluindo níveis de colesterol total e HDL colesterol.

A maioria dos trabalhos prévios que estudaram a relação entre sICAM-1 e fatores de risco cardiovascular são limitados por avaliarem amostras populacionais pequenas e resultarem em achados inconsistentes (37,115). Nossos resultados, envolvendo 948 indivíduos, descrevem uma relação progressiva entre sICAM-1 e níveis de pressão arterial, um achado intrigante, uma vez que estudos experimentais sugerem que hipertensão pode aumentar a responsividade do endotélio a fatores que promovem a adesão leucocitária (50-52). Neste sentido, a liberação de sICAM-1 de células endoteliais submetidas à deformação mecânica mostrou-se dependente do grau de deformação celular em estudos experimentais de culturas celulares (53). Caterina e col., entretanto, não encontraram diferenças significativas entre os níveis de sICAM-1 em indivíduos com hipertensão não complicada e controles normais. Essas observações, porém, foram limitadas a um grupo de 11 pacientes hipertensos e 11 indivíduos normotensos (37).

Tabagismo também está sabidamente associado a alterações na função endotelial e aumento da adesão leucocitária. A expressão imunohistoquímica de ICAM-1 está significativamente aumentada em vasos pulmonares periféricos de fumantes, quando comparada à expressão em não-fumantes (116,117). Estudos experimentais, utilizando condensado de fumaça de cigarro, demonstraram um aumento da aderência de monócitos

a células endoteliais em cultura, concomitantemente a um aumento da expressão de ICAM-1 e ELAM-1 (118). Nossos resultados reforçam o conceito de que os efeitos deletérios do consumo de cigarros pode ser mediado, pelo menos em parte, pela expressão exacerbada de moléculas de adesão (26,119).

Estudos experimentais também sugeriram que lipoproteínas modificadas ou seus constituintes modulam a expressão de moléculas de adesão (31-33). Cokerill e col. demonstraram que lipoproteínas de alta densidade inibem a expressão de VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina induzida por citocinas em culturas de células endoteliais (88). Além disso, a realização de aferese lipídica em pacientes com hipercolesterolemia familiar está associada com decréscimo concomitante dos níveis de moléculas de adesão circulante (95). Apesar de estudos clínicos, envolvendo um número pequeno de pacientes (37,120), sugerirem que níveis plasmáticos de moléculas de adesão estejam elevados em pacientes com dislipidemia, um estudo recente conduzido em uma grande coorte de pacientes sem doença cardiovascular evidente não demonstrou uma associação significativa entre níveis de sICAM-1 e níveis de triglicerídeos, colesterol total e lipoproteínas de alta e baixa densidade (26). As associações significativas entre sICAM-1 e níveis de triglicerídeos e de colesterol HDL observadas no presente estudo, entretanto, estão de acordo com o conceito de que o metabolismo lipídico pode exercer um papel relevante na modulação das moléculas de adesão. Este tipo de modulação concorda com muitas evidências experimentais que indicam que moléculas de adesão pode ser um dos elos entre dislipidemia, lesão endotelial e infiltração leucocitária. Depois de uma dieta aterogênica rica em lípidos, por exemplo, a expressão de VCAM-1 em células endoteliais aumenta rapidamente e parece preceder a infiltração de leucócitos (28,31). Estudos de

células endoteliais em cultura (33,88-91) também demonstraram que substâncias derivadas de lipoproteínas modificadas ou outros produtos derivados de lípidos podem regular a expressão de VCAM-1.

Evidências clínicas sugerem que inflamação induzida pelo uso de álcool ou seus metabólitos pode ser uma etapa importante das lesões teciduais da doença alcoólica hepática (121,122). Bautista e col. demonstraram, recentemente, que ratos alimentados com álcool têm a expressão de ICAM-1 em neutrófilos significativamente aumentada (122). A associação significativa entre ingestão frequente de bebidas alcoólicas e níveis plasmáticos de sICAM-1, observada no presente estudo, estende esses achados e levanta a possibilidade de novos mecanismos que podem interligar o consumo de álcool, aterogênese e morbidade cardiovascular.

Poucos estudos exploraram a associação entre a frequência de exercício e níveis plasmáticos de moléculas de adesão celular. A observação do presente estudo de que homens que se exercitam regularmente têm níveis mais baixos de sICAM-1 está de acordo com os reconhecidos efeitos benéficos da atividade física regular. Um estudo recente, envolvendo 12 indivíduos, entretanto, sugeriu que sessões de exercício intenso podem elevar de forma significativa os níveis de diversas moléculas de adesão (123).

Por fim, as associações entre fibrinogênio, antígeno ativador do plasminogênio e homocisteína total com sICAM-1 enfatizam as interrelações complexas entre o sistema de coagulação, a adesão leucocitária e aterogênese. Nesse sentido, estudos experimentais recentes sugerem que o fibrinogênio medeia a adesão leucocitária ao endotélio vascular através de mecanismos dependentes da expressão de ICAM-1 (124,125).

Proteína C-reativa

Diversos estudos prospectivos de base populacional demonstraram uma associação positiva entre níveis de PCR e o risco de eventos cardiovasculares futuros (24,25,34,35,77-82). PCR parece ser um marcador de risco cardiovascular em pacientes com infarto prévio (83), angina estável e instável (77,79) e pacientes assintomáticos, mas considerados de alto-risco (80,81), bem como indivíduos sem evidência de doença cardiovascular prévia (24,25,34,82). Os achados do presente estudo, em homens aparentemente saudáveis, demonstram que PCR está significativamente associada a diversos fatores de risco cardiovascular, incluindo idade, tabagismo, hipertensão, índice de massa corporal, frequência de exercício e diversas mensurações plasmáticas. Além disso, esta associação parece ter um caráter cumulativo, uma vez que níveis mais elevados de PCR foram observados naqueles indivíduos com maior número de fatores de risco cardiovascular.

Poucos estudos anteriores exploraram as interrelações entre PCR e fatores de risco cardiovascular. Em um estudo transversal de base populacional em 303 homens, foram encontradas associações positivas com tabagismo, sero-positividade para *Helicobacter pylori* e *Chlamydia pneumoniae* e diversas mensurações de lípidos plasmáticos (126). De forma similar, um sub-estudo do *European Concerted Action on Thrombosis and Disability Angina Pectoris Study Group* demonstrou que níveis basais de PCR estão associados com o surgimento de eventos coronarianos em pacientes com angina pectoris (79), além de correlacionarem-se com marcadores de coagulação e atividade fibrinolítica, particularmente com níveis séricos de fibrinogênio (78). No *Cardiovascular Health Study*, um estudo de pacientes idosos livres de doença

cardiovascular aparente (127), entretanto, níveis de PCR não se associaram de forma consistente com fatores de risco cardiovascular tradicionais, como idade, tabagismo, hipertensão e frequência de exercício. De forma inesperada, indivíduos fumantes e não fumantes apresentaram níveis similares de PCR. Além disso, PCR não se associou com nenhum parâmetro de doença cardiovascular subclínica, incluindo a EIM carotídea (127). No presente estudo, foram encontradas associações modestas, mas estatisticamente significativas, entre PCR e a maioria dos fatores de risco cardiovascular avaliados. Concentrações plasmáticas de PCR associaram-se com idade, pressão arterial sistólica e diastólica, uso e quantidade de cigarros fumados por dia, diversos lípides plasmáticos, marcadores de fibrinólise e homocisteína total.

Estudos anteriores que avaliaram as interrelações entre níveis de PCR e outros fatores de risco comportamentais também são escassos. Tisi e col. avaliaram diversos marcadores de gravidade de doença em um estudo randomizado de condicionamento físico em 49 pacientes com claudicação intermitente (128). Tanto proteína amilóide A como PCR foram significativamente reduzidas após 3-6 meses de atividade física regular. A observação do presente estudo de que homens que se exercitam com frequência regular tinham níveis reduzidos de PCR está de acordo com esses achados. Mendall e col. também detectaram um aumento progressivo do índice de massa corporal de acordo com quintis de PCR (126). De forma similar, um estudo recente sugere que a perda de peso poderia regular proteínas de fase aguda em pacientes idosos e obesos (129).

Em síntese, nossos dados demonstram que tanto sICAM-1 quanto PCR estão associados de forma significativa a diversos fatores de risco cardiovascular bem

estabelecidos, um achado interessante, uma vez que ambos marcadores estão associados, de forma independente, a um risco aumentado de eventos cardiovasculares futuros. Essas associações tiveram um caráter cumulativo, uma vez que níveis mais elevados de ambos marcadores foram observados naqueles indivíduos com maior número de fatores de risco cardiovascular. Esses achados concordam com a hipótese de que marcadores inflamatórios podem ser medidas de utilidade clínica em indivíduos aparentemente saudáveis, mas em risco de desenvolver eventos cardiovasculares. Outros estudos são necessários para determinar se estas associações refletem o papel dessas moléculas apenas como marcadores de aterosclerose pré-clínica ou se implicam uma relação de causalidade.

Como as análises descritas no protocolo II foram realizadas em amostras derivadas de estudos de caso-controle do *Physicians' Health Study*, é importante questionar se as associações encontradas não seriam diferentes entre aqueles indivíduos que, posteriormente, desenvolveram eventos cardiovasculares. No que se refere às associações entre sICAM-1 e outros determinantes de risco cardiovascular, não se identificaram diferenças significativas nas associações entre aqueles indivíduos que desenvolveram ou não eventos cardiovasculares subsequentes. Em relação às associações entre PCR e outros fatores de risco cardiovascular, identificou-se uma interação significativa entre tabagismo, níveis de PCR e eventos cardiovasculares futuros, de tal forma que a diferença nos níveis de PCR entre casos e controles era mais pronunciada naqueles indivíduos fumantes atuais ($p < 0,05$ para termo de interação). A interação entre cigarro, fatores de risco e eventos futuros foi recentemente explorada em um sub-estudo do *Cardiovascular Health Study* em indivíduos idosos aparentemente saudáveis (127).

Esse tipo de interação com PCR não se reproduziu para os outros fatores de risco estudados.

Considerações finais

Os trabalhos apresentados nesta tese descrevem associações entre marcadores imunoinflamatórios séricos e diversas características de risco para o desenvolvimento de doença aterosclerótica clinicamente manifesta. Foram demonstradas correlações significativas entre diversos marcadores séricos de inflamação e várias características clínicas de risco cardiovascular, como níveis pressóricos e mensurações de lípidos circulantes, bem como com parâmetros ecográficos, como a EIM carotídea. Nossos achados estão de acordo com outras evidências experimentais e clínicas que sugerem que processos inflamatórios têm um papel crítico em diversas etapas do surgimento e progressão de síndromes ateroscleróticas. Embora as associações observadas nesses estudos tenham sido de magnitude discreta ou moderada, elas reforçam o conceito de que o processo aterosclerótico tem origem multifatorial e que muitos mecanismos patogênicos podem estar ativos em momentos distintos de sua evolução temporal. Por outro lado, o papel biológico específico de cada marcador imunoinflamatório durante o processo aterosclerótico, particularmente das proteínas de fase aguda, é essencialmente desconhecido. É plausível que as respostas de fase aguda representem uma reação de proteção paralela a um processo inicial nocivo, sem relação direta com a patogênese da doença aterosclerótica. Além disso, considerando o caráter observacional do nosso delineamento, pouco se pode especular sobre uma relação direta de causa e efeito entre inflamação e doença vascular. Um achado que reforça a hipótese de causalidade, entretanto, foi demonstrado nos sub-estudos do *Physicians' Health Study*, uma vez que o

valor prognóstico da PCR foi significativamente menor naqueles indivíduos alocados para o uso de aspirina. Nesse sentido, são necessários novos estudos prospectivos, nos quais se possa atuar de forma direta e comparativa, em aspectos imunoinflamatórios associados com o processo aterosclerótico. Embora ainda seja precoce que se recomende a dosagem desses marcadores na prática clínica diária, novas estratégias de estratificação de risco cardiovascular que incorporem esses conceitos também devem ser avaliadas prospectivamente.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES

Protocolo I

1. *Estudo da EIM carotídea:* Os resultados desse estudo demonstram uma associação direta entre as frações solúveis das moléculas de adesão sVCAM-1 e sICAM-1 e a EIM carotídea avaliada por ultra-som. Esta associação foi pouco influenciada pela maioria dos fatores de risco cardiovascular avaliados.

2. *Estudo ultra-sonográfico das dimensões aórticas:* Os dados deste estudo indicam que concentrações plasmáticas de IL-6 aumentam progressivamente com o diâmetro aórtico abdominal entre indivíduos com dimensões aórticas normais. Associações semelhantes foram observadas para níveis de proteína amilóide A e homocisteína total.

Protocolo II

1. Os dados deste estudo demonstram que tanto sICAM-1 quanto PCR estão associados de forma significativa a diversos fatores de risco cardiovascular. Além disto, estas associações parecem ter um caráter cumulativo, uma vez que níveis mais elevados desses marcadores foram observados naqueles indivíduos com maior número de fatores de risco cardiovascular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pyörälä K, De Backer G, Graham I, Poole-Wilson P, Wood D on behalf of the Task Force. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 1994;15:1300-31.
2. Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, Schaefer EJ. Prevalence of risk factors in men with premature coronary disease. *Am J Cardiol* 1991;67:1185-9.
3. Wilson PW, Castelli WP, Kannel WB. Coronary risk prediction in adults. *Am J Cardiol* 1987;29:91G-94G.
4. Favarato D, Da Luz PL. Aterosclerose não associada à hipercolesterolemia. *Rev Soc Cardiol Est SP* 1988;8:356-65.
5. Da Luz PL, Favarato D. Doença coronária crônica. *Arq Bras Cardiol* 1999;72:5-21.
6. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
7. Velican C, Velican D. The precursors of coronary atherosclerotic plaques in subjects up to 40 years old. *Atherosclerosis* 1980;37:33-46.
8. Salonen R, Salonen JT. Determinants of carotid intima-media thickness: a population-based ultrasonography study in Eastern Finish men. *J Intern Med* 1991;229:225-231.
9. Zimmermann-Paul GG, Quick HH, Vogt P, von Schulthess GK, Kling D, Debetin JF. High-resolution intravascular magnetic resonance imaging: monitoring of plaque formation in heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 1999;99:1054-61.

10. Yuan C, Beach KW, Smith LH Jr, Hatsukami TS. Measurement of atherosclerotic carotid plaque size in vivo using high-resolution magnetic resonance imaging. *Circulation* 1998;98:2666-71.
11. Engman ML. An update on EBCT (Ultrafast CT) scans for coronary artery disease. *J Insur Med* 1998;30:175-9.
12. O'Leary DH, Polak JF, Wolfson SK, et al., on behalf of the Cardiovascular Healthy Study Collaborative Research group. Use of sonography to evaluate carotid atherosclerosis in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Stroke* 1991;22:1155-163.
13. O'Leary DH, Polak JF, Krommal RA, et al., on behalf of the CHF Collaborative Research Group. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the Cardiovascular Healthy Study. *Stroke* 1992;23:1752-60.
14. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R, Chambless LE, Szklo M, Alzola C for the ARIC investigators. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factor in the ARIC study. *Am J Epidemiol* 1991;134:250-6.
15. Salonen JT, Salonen R. Ultrasonographically assessed carotid morphology and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1245-1249.
16. Wofford JL, Kahl FR, Howard GR, McKinney WM, Toole JF, Crouse III FR. Relation of extent of extracranial carotid artery atherosclerosis as measured by B-mode ultrasound to the extent of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1786-94.

17. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors. The Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol* 1997;146:483-94.
18. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and the risk of stroke and myocardial infarction. The Rotterdam Study. *Circulation* 1997;96:1432-37.
19. Furberg CD, Adams HP Jr, Applegate WB, et al. Effect of lovastatin on early carotid atherosclerosis and cardiovascular events. Asymptomatic Carotid Artery Progression Study (ACAPS) Research Group. *Circulation* 1994;90:1679-87.
20. Pedersen OM, Aslaken A, Vik-Mo H. Ultrasound measurement of the luminal diameter of the abdominal aorta and iliac arteries in patients without vascular disease. *J Vasc Surg* 1993;17:596-601.
21. Ernst CB. Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 1993;328:1167-72.
22. Juvonen J, Surcel HM, Satta J, et al. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2843-47.
23. Szekanecz Z, Shan MR, Pearce WH, Koch AE. Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce interleukin (IL)-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4: The possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation. *Agents Actions* 1994;42:159-62.
24. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and risks of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-79.

25. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998;97:425-28.
26. Hwang S-J, Ballantyne CM, Sharrett R, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases. *Circulation* 1997;96:4219-25.
27. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule-1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998;351:88-92.
28. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-91.
29. Davies MJ, Gordon JL, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *Journal of Pathology* 1993;171:223-29.
30. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, et al. Vascular cell endothelial molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993;92:945-51.
31. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone Jr. MA, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 1993;13:197-204.
32. Sakai A, Kume N, Nishi E, Tanoue K, Miyasaka M, Kita T. P-selectin and vascular adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:310-16.

33. Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone Jr MA, Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1829-1836.
34. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 1998;97:2007-11.
35. Morrow DA, Rifai N, Antman E, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independent of and in combination with troponin T in acute ischemic syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1449-54.
36. Peter K, Nawroth P, Conradt C, et al. Circulating vascular adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:505-12.
37. Caterina R, Basta G, Lazzerini G, et al. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a biohumoral correlate of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2646-54.
38. Stamler J, Wentworth, Neaton JD, for the MRFIT Research Group: Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the MRFIT. *JAMA* 1986;256:2823-8.

39. Committee of Principal Investigators: WHO cooperative trial on primary prevention of ischaemic heart disease with clofibrate to lower serum cholesterol: Final mortality follow-up. *Lancet* 1984;2:600-4.
40. Frick MH, Elo O, Haapa K, et al. Helsinki Heart Study. Primary-prevention trial of genfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia: Safety of treatment changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987;317:1237-45.
41. Hjermann I, Velve Byre K, Holme I, Leren P. Effect of diet and smoking intervention on the incidence of coronary heart disease: Report from the Oslo Study Group of a randomized trial in healthy men. *Lancet* 1981;2:1303-10.
42. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. for the West of Scotland Coronary Prevention Study Group: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;333:1301-7.
43. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group: Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-9.
44. Parthasarathy S, Quinn MT, Schwenke DC, et al. Oxidative modification of beta-very low density lipoprotein: Potential role in monocyte recruitment and foam cell formation. *Arteriosclerosis* 1989;9:398-404.
45. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Bonding site of macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Natl Acad Sci USA* 1979;76:333-7.

46. MacMahon S, Peto R, Cuttler J, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1. Prolonged differences in blood pressure. Prospective observational studies corrected for the regression dilutions bias. *Lancet* 1990;335:765-74.
47. Sytkowski PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WJ. Secular trends in long-term sustained hypertension, long-term treatment, and cardiovascular mortality. The Framingham Heart Study 1950 to 1990. *Circulation* 1996;93:697-703.
48. Kannel WB. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *JAMA* 1996;275:1571-6.
49. Collins R, Peto R, MacMahon S, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2. Short-term reduction in blood pressure. Overview of randomized drug trials in their epidemiological content. *Lancet* 1990;335:827-38.
50. McCarron RM, Wang L, Siren AL, Spatz M, Hallenbeck JM. Monocyte adhesion to cerebrovascular endothelial cells derived from hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol* 1994;267:H2491-H2497.
51. Komatsu S, Panes J, Russell JM, et al. Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997;29:683-89.
52. McCarron RM, Wang L, Siren AL, Spatz M, Hallenbeck JM. Adhesion molecules on normotensive and hypertensive rat brain endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;205:257-62.
53. Cheng JJ, Wung BS, Chao YJ, Wang DL. Cyclic strain enhances adhesion of monocytes to endothelial cells by increasing intercellular adhesion molecule-1 expression. *Hypertension* 1996;28:386-91.

54. Freund KM, Belanger AJ, D'Agostino RB, Kannel WB. The health risks of smoking. The Framingham Study: 34 years of follow-up. *Am Epidemiol* 1993;3:417-24.
55. Kannel WB, Higgins M. Smoking and hypertension as predictors of cardiovascular risk in population studies. *J Hypertens* 1990; Suppl. 8:S3-8.
56. Sigurdsson G Jr., Gudnason V, Sigurdsson G, Humphries SE. Interaction between a polymorphism of the apo A-I promoter region and smoking determines plasma levels of HDL and apo A-I. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1017-22.
57. Pittilo RM, Mackie IJ, Rowles PM, et al. Effects of cigarette smoking on the ultrastructure of rat thoracic aorta and its ability to produce prostacyclin. *Thromb Haemost* 1982;48:173-6.
58. Ogston D, Bennett NB, Ogston CM. The influence of cigarette smoking on the plasma fibrinogen concentration. *Atherosclerosis* 1970;11:349-52.
59. FitzGerald GA, Oates JA, Nowak J. Cigarette smoking and hemostatic function. *Am Heart J* 1988;115:267-71.
60. Blann AD, McCollum CN. Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Hemost* 1994;72:151-4.
61. Schmidt MI, Watson RL, Duncan BB, et al. Clustering of dyslipidemia, hyperuricemia, diabetes, and hypertension and its association with fasting insulin and central and overall obesity in a general population. *Metabolism* 1996;45:699-706.
62. Kaplan NM. The deadly quartet. Upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Int Med* 1989;149:1514-20.

63. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dislipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14:173-94.
64. Bierman EL. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb* 1992;12:647-56.
65. American Heart Association: Heart and Stroke facts:1995 Statistical Supplement. Dallas, American Heart Association, 1994.
66. Lerner DL, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986;111:383-90.
67. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998;7:605-13.
68. Shea S, Ottman R, Gabrieli C, et al. Family history as an independent risk factor for coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1984;4:793-801.
69. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation* 1995;92:1355-74.
70. Fuster V, Gotto AM, Libby P, Loscalzo J, McGill HC. Matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary artery disease events. Pathogenesis of coronary disease: the biologic role of risk factors. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:964-76.

71. Howard G, Burke GL, Evans GW, et al. for the ARIC Investigators. Relations of intimal-medial thickness among sites within the carotid artery as evaluated by B-mode ultrasound. *Stroke* 1994;25:1581-87.
72. Nieto FJ, Adam E, Sorlie P, Farzadegan H, Melnick JL, Comstock GW, Szklo M. Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimal-medial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis. *Circulation* 1996;94:922-27.
73. Selhub J, Jacques PF, Bostom A, et al. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995;332:286-91.
74. McQuillan BM, Beilby JP, Nidorf M, Thompson PL, Hung J. Hyperhomocysteinemia but not the C677T mutation of methylenetetrahydrofolate reductase is an independent risk determinant of carotid wall thickening. *Circulation* 1999;99:2383-88.
75. Cabellon S Jr, Moncrief CL, Pierre DR, Cavanaugh DG. Incidence of abdominal aortic aneurysms in patients with atheromatous arterial disease. *Am J Surg* 1983;146:575-6.
76. Carty GA, Nachtigal T, Magyar R, Herzler G, Bays R. Abdominal duplex ultrasound screening for occult aortic aneurysm during carotid arterial evaluation. *J Vasc Surg* 1993;17:696-702.
77. Liuzzo G, Biazucci LM, Gallmore R, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-24.
78. Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, van de Loo JCW, for the European Concerted Action on Thrombosis, and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1995;332:635-41.

79. Harverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MG. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action in Thrombolysis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997;349:462-6.
80. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meinhahn EN, for the MRFIT Research Group. Relation of C-reactive protein and coronary artery disease in the MRFIT nested case-control study. *Am J Epidemiol* 1996;144:537-47.
81. Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, et al. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly: results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1121-27.
82. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998;98:731-33.
83. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, et al., for the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. Inflammation, Pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *Circulation* 1998;98:839-44.
84. Navab S, Liao F, Hough GP, et al. Interaction of monocytes with co-cultures of human aortic wall cells involves interleukin-1 and -6 with marked increase in connexin-43 message. *J Clin Invest* 1991;87:1763-72.
85. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, et al. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996;94:874-77.

86. Jang Y, Lincoff M, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-601.
87. Osborn L, Hession C, Tizard R, et al. Direct expression of vascular cell adhesion molecule 1. A cytokine-induced endothelial protein that bind lymphocytes. *Cell* 1989;59:1203-11.
88. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1987-94.
89. Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford R. Modified low-density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:1262-70.
90. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992;90:1138-44.
91. Berlinger JA, Territo M, Almada L, Carter A, Shafonski E, Fogelman AM. Monocyte chemotactic factor produced by large vessel endothelial cells in vitro. *Arteriosclerosis* 1986;6:254-58.
92. Enders M, Laufs U, Merz H, Kaps M. Focal expression of intercellular adhesion molecule-1 in the human carotid bifurcation. *Stroke* 1997;28:77-82.
93. Nageh MF, Sandberg ET, Marotti KR, et al. Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1517-20.

94. Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, et al. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 1997;99:1037-43.
95. Sampietro T, Tuoni M, Ferdeghini M, et al. Plasma cholesterol regulates soluble cell adhesion molecule expression in familial hypercholesterolemia. *Circulation* 1997;96:1381-85.
96. Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willet WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991;325:373-81.
97. Ridker PM, Hennekens CH, Selhub J, Miletich JP, Malinow MR, Stampfer MJ. Interrelation of hyperhomocyst(e)inemia, factor V Leiden, and risk of future venous thromboembolism. *Circulation* 1997;95:1777-82.
98. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective study of lipoprotein (a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* 1993;270:2195-99.
99. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Final Report of the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med* 1989;321:129-35.
100. Clausell N, Prado K, Ribeiro JP. Increased plasma levels of soluble vascular adhesion molecule-1 in patients with chest pain and angiographically normal coronary arteries. *Inter J Cardiol* 1999;68:275-80.
101. Freestone T, Tuner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1145-51.

102. Davies MJ. Aortic aneurysm formation. Lessons from human studies and experimental models. *Circulation* 1998;98:193-95.
103. McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, Shively VP, Cipollone M, Pearce WH. In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1139-44.
104. Newman KM, Ogata Y, Malon AM, et al. Identification of matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase-B) in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:1315-20.
105. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, et al. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms: an elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest* 1995;96:318-26.
106. McMillan WD, Tamarina N, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH. Size Matters. The relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997;96:2228-32.
107. Allaire E, Hasenstab D, Kenagy RD, Starcher B, Clowes MM, Clowes AW. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* 1998;98:249-55.
108. Malinow MR, Kang SS, Taylor LM, et al. Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1989;79:1180-88.
109. Robinson K, Arheart K, Refium H, et al. Low circulating folate and vitamin B6 concentration: risk for stroke, peripheral vascular disease and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 1998;97:437-43.

110. Colwell N, Clarke R, Robinson K, Keane F, O'Briain S, Graham I. Hyperhomocysteinaemia and multiple aneurysms. *Postgrad Med J* 1991;67:186-8.
111. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultures porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92:1381-86.
112. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987;262:10098-103.
113. Bauserman LL, Santelli AL, Van Zunden P, Gollaher CJ, Herbert PN. Degradation of serum amyloid A by isolated perfused rat liver. *J Biol Chem* 1987;262:1583-9.
114. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, et al. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. *Ann Intern Med* 1997;126:441-9.
115. DeSouza CA, Dengel DR, Macko RF, Cox K, Seals DR. Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997;10:1335-1341.
116. Schaberg T, Rau M, Oerter R, et al. Expression of adhesion molecules in peripheral pulmonary vessels from smokers and nonsmokers. *Lung* 1996; 174:71-81.
117. Turato G, Di Stefano A, Maestrelli P, et al. Effect of smoking cessation on inflammation in chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1262-67.
118. Kalra VK, Ying Y, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1994; 160:154-62.

119. Blann AD, Steele C, McCollum CN. The influence of smoking on soluble adhesion molecules and endothelial cell markers. *Thromb Res* 1997;85:433-8.
120. Hackman A, Yasunori A, Insull W, et al. Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* 1996;93:1334-8.
121. Adams DH. Leukocytes adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol* 1994;29:249-60.
122. Bautista AP. Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology* 1997;25:335-42.
123. Jilma B, Eichler HG, Stohlawetz P, et al. Effects of exercise on circulating vascular adhesion molecules in healthy men. *Immunobiology* 1997;197:505-12.
124. Languino LR, Plescia J, Duperray A, Brian AA, Plow EF, Geltosky JE, Altieri DC. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1 dependent pathway. *Cell* 1993;73:1423-34.
125. Duperray A, Languino LR, Plescia J, et al. Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. *J Biol Chem* 1997;272:435-41.
126. Mendall MA, Patel P, Ballam L, Strachan D, Northfield TC. C-reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross section study. *BMJ* 1996;312:1061-64.
127. Tracy RP, Psaty BM, Macy E, et al. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2167-76.

128. Tisi PV, Hulse M, Chulakadabba A, Gosling P, Shearman CP. Exercise training for intermittent claudication: does it adversely affect biochemical markers of the exercise-induced inflammatory response? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14:344-50.

129. Calles-Escandon J, Ballor D, Harvey-Berino J, Ades P, Tracy R, Sobel B. Amelioration of the inhibition of fibrinolysis in elderly, obese subjects by moderate energy intake restriction. *Am J Clin Nutr* 1996;64:7-11.

ANEXO I**Manuscritos e trabalhos apresentados produzidos durante o doutorado e diretamente relacionados com a tese:**

- 1a. **Rohde LE**, Lee RT, Briggs WH, Rivero J, Jamacochian M, Nass N, Libby P, Creager MA, Ridker PM. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) correlates with carotid thickness. *J Am Coll Cardiol* 1998;29:168A.
- 1b. **Rohde LE**, Lee RT, Rivero J, Jamacochian M, Arroyo LH, Briggs W, Rifai N, Libby P, Creager MA, Ridker PM. Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1765-1770.
- 2a. **Rohde LE**, Arroyo LH, Rifai N, Creager MA, Libby P, Ridker PM, Lee RT. Plasma concentrations of interleukin-6 and abdominal aortic diameter among subjects without aortic dilatation. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:310A.
- 2b. **Rohde LE**, Arroyo LH, Rifai N, Creager MA, Libby P, Ridker PM, Lee RT. Plasma concentrations of interleukin-6 and abdominal aortic diameter among subjects without aortic dilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1595-1599.
3. **Rohde LE**, Hennekens CH, Ridker PM. A cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1695-1699.
4. **Rohde LE**, Hennekens CH, Ridker PM. A cross-sectional study of protein C-reactive and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am J Cardiol* 1999 (submetido).

Outros manuscritos ou trabalhos apresentados produzidos durante o doutorado:

1. **Rohde LE**, Zhi G, Aranki SF, Beckel NE, Lee RT, Reimold SC. Gender-associated differences in left ventricular geometry in patients with aortic valve disease and effects of distinct overload subsets. *Am J Cardiol* 1997;80:475-480.
2. Aikawa Y, **Rohde LE**, Greaves S, Ridker P, Menapace F, Arnold M, Rouleau J, Pfeffer M, Lee RT, Solomon S. Apical wall stress by finite element analysis predicts subsequent left ventricular remodeling in the Healing and Early Afterload Reducing Trial. *J Am Coll Cardiol* 1998;28:383A.
3. **Rohde LE**, Polanczyk CA, Goldman L, Lee RT, Lee TH. Predictive value of transthoracic echocardiography before noncardiac surgery. *J Am Coll Cardiol* 1998; 30:122A.
4. **Rohde LE**, Goldman L, Polanczyk CA, Cook EF, Lee TH. Does transoperative right heart catheterization reduce cardiac complications after noncardiac surgery? *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 229A.
5. **Rohde LE**, Aikawa M, Cheng GC, Sukhova G, Solomon S, Libby P, Pfeffer J, Pfeffer M, Lee RT. Echocardiographic-derived left ventricular end-systolic regional wall stress and matrix remodeling after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999;33: 835-42.
6. **Rohde LE**, Arroyo LH, Ducharme A, Aikawa M, Sukhova G, Mitchell PG, Libby P, Lee RT. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 1999; 99:3063-70.
7. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Arroyo LH, **Rohde LE**, Kelly R, Lee RT. Targeted deletion of the MMP-9 gene attenuates left ventricular enlargement after myocardial infarction. *Circulation* 1999 (submetido).
8. Frantz S, Ducharme A, **Rohde LE**, Kobzik R, Lee RT, Kelly R. Targeted deletion of the Caspase-1 reduces the rate of left ventricular dilatation following myocardial infarction. *Circulation* 1999 (submetido).