

**ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES E
ANTIPROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO NA
DOENÇA OBSTRUTIVA SEVERA DE
ARTÉRIAS CARÓTIDAS**

Mateus Recuero Lopes

Porto Alegre, 2006

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

**ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES E ANTIPROTEÍNAS DE CHOQUE
TÉRMICO NA DOENÇA OBSTRUTIVA SEVERA DE ARTÉRIAS
CARÓTIDAS**

AUTOR: MATEUS RECUERO LOPES

ORIENTADOR: PROF. DR. JEFFERSON LUIS BRAGA DA SILVA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. HENRIQUE LUIZ STAUB

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Porto Alegre, agosto de 2006.

L864a Lopes, Mateus Recuero

Anticorpos antifosfolípides e antiproteínas de choque térmico na doença obstrutiva severa de artérias carótidas / Mateus Recuero Lopes; orient. Jefferson Braga da Silva; co-orient. Henrique Luiz Staub. Porto Alegre: PUCRS, 2006.
143f.: tab.

Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. ANTICORPOS ANTIFOSFOLIPÍDEOS. 2. PROTEÍNAS DO CHOQUE TÉRMICO. 3. DOENÇAS DAS ARTÉRIAS CARÓTIDAS. 4. ANTICORPOS ANTICARDIOLIPINAS. 5. GLICOPROTEÍNAS/imunologia. 6. AUTOIMUNIDADE. 7. ARTERIOSCLEROSE. 8. CHAPERONINA 60. 9. ESTUDOS DE CASOS E CONTROLES. I. Silva, Jefferson Braga da. II. Staub, Henrique Luiz. III. Título.

C.D.D. 616.136

C.D.U. 616.13-004.6:577.27(043.2)

N.L.M. QU 55.6

Dedico este trabalho:

- ✓ ***A meus pais, Romeu (in memoriam) e América, que me proporcionaram a vida e ensinaram-me a vivê-la.***
- ✓ ***A Sueli pelo carinho, compreensão e apoio.***
- ✓ ***A meus mestres responsáveis pela minha formação intelectual e profissional ao longo desta vida.***

AGRADECIMENTOS

- ✓ Algumas pessoas tiveram uma participação decisiva para que este trabalho pudesse ser desenvolvido e concluído. De todas tenho a melhor recordação e o dever de citá-las como forma de gratidão.
- ✓ Ao Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva pelo estímulo à pesquisa e pela eficiente e determinada orientação.
- ✓ Ao Prof. Dr. Henrique Luiz Staub pela prestimosa co-orientação nos aspectos imunológicos deste trabalho.
- ✓ Ao Prof. Dr. Carlos Alberto von Mühlen, do Serviço de Reumatologia do HSL da PUCRS, pelo auxílio e apoio a este estudo.
- ✓ Ao Prof. Dr. João Batista Petracco pela disponibilização do Serviço de Cirurgia Vasculardo HSL da PUCRS para a realização deste estudo.
- ✓ Ao Dr. Luciano Cabral Albuquerque, do Serviço de Cirurgia Vasculardo HSL da PUCRS, pelo auxílio, apoio técnico e científico.
- ✓ À Dra. Luciane Barreneche Narvaes, do Serviço de Cirurgia Vasculardo HSL da PUCRS, pela contribuição técnica e científica.
- ✓ Ao Dr. João Rubião Hoefel F^o e Dr. Maurício Barreira Marques, do Serviço de Hemodinâmica do HSL da PUCRS, pela realização e interpretação das RNM, de fundamental importância para este estudo.
- ✓ Ao Serviço de Ortopedia do Hospital São Lucas da PUCRS por disponibilizar pacientes para o grupo-controle.
- ✓ Ao Serviço de Ortopedia do Hospital Independência da Ulbra por disponibilizar pacientes para o grupo-controle.

- ✓ À Inova Diagnostics, Inc. San Diego, EUA, pela colaboração nos testes sorológicos.
- ✓ Ao Bioquímico Gary Norman, San Diego, EUA, pela valorosa ajuda na testagem dos auto-anticorpos.
- ✓ À Bioquímica Ana Ligia Bender e sua auxiliar Vera Lúcia Gatelli da Silva, do Laboratório de Imunologia do HSL da PUCRS, pelo auxílio com o processamento e armazenamento dos soros.
- ✓ À Coletadora Ondina Schaeffer Mattos pela sua responsabilidade na coleta de sangue.
- ✓ Ao Prof. Dr. Mario Wagner pela ajuda na área de Epidemiologia e Estatística.
- ✓ À Bibliotecária Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia pela orientação nas referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.
- ✓ Ao Giquitibá Moraes de Melo pelo valoroso auxílio gráfico.
- ✓ À Secretária Sonia e secretários Maurício e Miguel pelos serviços prestados.
- ✓ À Rosa Homem pela sua responsabilidade e competência na condução dos aspectos burocráticos e arte final desta pesquisa.
- ✓ Aos pacientes que se doaram e entenderam a importância deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE TABELAS.....	XI
RESUMO	XII
SUMMARY	XIV
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Célula Endotelial e o Endotélio.....	16
1.1.1 Disfunção Endotelial	17
1.1.2 Aterosclerose.....	18
1.1.3 Aterogênese	20
1.1.3.1 Teoria Oxidativa	21
1.1.3.2 Placa Aterosclerótica.....	24
1.2 Artérias Carótidas.....	27
1.2.1 Doença Obstrutiva de Artérias Carótidas (DOAC).....	30
1.2.2 Doença Obstrutiva Severa das Artérias Carótidas – DOSAC	37
1.2.3 Fatores de Risco.....	38
1.2.4 História Natural.....	43
1.2.5 Diagnóstico Diferencial	44
1.2.6 Angioressonância Nuclear Magnética (ARM)	45
1.3 Anticorpos Antifosfolípides	46
1.4 Síndrome Antifosfolipídica (SAF).....	47
1.5 Beta2-Glicoproteína I.....	49
1.6 Proteínas de Choque Térmico.....	52
1.7 Anticorpos AntiLDL Oxidado.....	57
1.8 Justificativas do Estudo	58
2 HIPÓTESES	60
2.1 Hipótese Conceitual	60
2.2 Hipótese Operacional	60
3 OBJETIVO	61
4 PACIENTES E MÉTODOS	62
4.1 Delineamento do Estudo	62
4.2 Amostras Envolvidas no Estudo.....	62
4.3 Definições.....	63

4.3.1 DOSAC	63
4.3.2 Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).....	63
4.3.3 Tabagismo	63
4.3.4 Diabete Mellitus (DM)	64
4.3.5 Hipercolesterolemia	64
4.4 Critérios de Inclusão	64
4.5 Critérios de Exclusão.....	65
4.5.1 Critérios de Exclusão Somente Para o Grupo-Controle	66
4.6 Casos e Controles	66
4.6.1 Casos	66
4.6.2 Controles	66
4.7 Métodos.....	67
4.7.1 Angioressonância Nuclear Magnética (ARM)	68
4.7.2 Detecção de anticorpos anticardiolipina (aCL)	69
4.7.3 Detecção de anticorpos antibeta2 – gpl	70
4.7.4 Detecção de anticorpos anti-Hsp 60 e anti-Hsp 65.....	72
4.8 Controle do Erro Sistemático.....	74
4.8.1 Vieses de Seleção	74
4.8.2 Vieses de Aferição.....	75
4.8.3 Vieses de Confusão.....	75
4.9 Análise Estatística	76
5 RESULTADOS	78
6 DISCUSSÃO.....	84
7 CONCLUSÕES.....	103
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
9 ANEXOS.....	131
ANEXO I – Termo de Consentimento Informado, Livre e Esclarecido - População Alvo – Casos.....	132
ANEXO II - Termo de Consentimento Informado, Livre e Esclarecido - Grupo Controle – Pacientes Internados no Serviço de Ortopedia	136
ANEXO III - Protocolo de Avaliação Clínica e Laboratorial - População Alvo – Casos.....	140
ANEXO IV - Protocolo de Investigação de AAF e Anti-Hsp no Grupo-Controle.....	142
ANEXO V - Ficha Angiográfica	143

LISTA DE ABREVIATURAS

AAF:	anticorpos antifosfolípidos
aCL:	anticorpos anticardiolipinas
AL:	anticoagulante lúpico
AIT:	ataque isquêmico transitório
ATC:	aterosclerose
ARM:	angiografia por ressonância nuclear magnética / angioressonância magnética
AVC:	acidente vascular cerebral
AVCi:	acidente vascular cerebral isquêmico
Beta2-gpl:	beta2-glicoproteína I
CE:	célula endotelial
CML:	célula muscular lisa
CL:	cardiolipina
DAC:	doença arterial coronariana
DAP:	doença arterial periférica
DAPs:	doença arterial periférica sintomática
DE:	disfunção endotelial
DOAC:	doença obstrutiva das artérias carótidas
DOSAC:	doença obstrutiva severa das artérias carótidas

DM:	diabete mellitus
EC:	endarterectomia carotídea
ELISA:	ensaio de imunoabsorção ligado à enzima – <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FL:	fosfolípidos
HAS:	hipertensão arterial sistêmica
HDL:	lipoproteína de alta densidade - <i>high density lipoprotein</i>
Hsp 60:	proteína de choque térmico de 60 kDa - <i>heat-shock protein</i>
Hsp 65:	proteína de choque térmico de 65 kDa
IAM:	infarto agudo do miocárdio
IC:	intervalo de confiança
IC 95%:	intervalo de confiança de 95%
ICAM-1:	molécula de adesão intercelular-1 - <i>intercellular adhesion molecules-1</i>
IgA:	imunoglobulina A
IgG:	imunoglobulina G
IgM:	imunoglobulina M
IL:	interleucinas
INF:	interferon
KDa:	quilodalton
LDL:	lipoproteína de baixa densidade - <i>low density lipoprotein</i>
LDLox:	lipoproteína de baixa densidade oxidada
LES:	lupus eritematoso sistêmico
LT:	linfócito T

M-CSF:	fator estimulador de colônia de macrófagos - <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MCF:	macrófagos
MCP-1:	proteína 1 quimioatraente de monócitos - <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MNC:	monócitos
MSIs:	membros inferiores
NO:	óxido nítrico
OR:	<i>odds ratio</i> ou razão de chances
PDG-F:	fator de crescimento derivado de plaquetas - <i>platelet-derived growth factor</i>
RNM:	ressonância nuclear magnética
SAF:	síndrome antifosfolipídica
TNF:	fator de necrose tumoral - <i>tumoral necrosis factor</i>
UI:	unidades internacionais
VCAM 1:	molécula de adesão da célula vascular - <i>vascular-cell adhesion molecules</i>
VDRL:	<i>veneral disease research laboratory</i>
VLDL:	lipoproteína de muito baixa densidade – <i>very low density protein</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela de magnitude de <i>odds ratio</i> (OR).....	77
Tabela 2	Entidades nosológicas nos 93 pacientes do grupo-controle internados em enfermarias de ortopedia	79
Tabela 3	Características demográficas e clínicas dos pacientes com DOSAC e controles	80
Tabela 4	Perfil de fatores de risco em casos e controles	81
Tabela 5	Frequência de teste positivo para anticorpos aCL, antibeta2-gpl e anti-Hsp em casos e controles.....	82
Tabela 6	OR ajustados para associação entre DOSAC e anticorpos aCL, antibeta2-gpl e anti-Hsp 60 e anti-Hsp 65.....	83

RESUMO

Base teórica - A doença obstrutiva severa de artérias carótidas (DOSAC) está relacionada à aterosclerose (ATC). Mecanismos de inflamação e auto-imunidade podem influenciar o deflagramento da ATC. Neste contexto, incluem-se anticorpos antifosfolípides (AAF), marcadores da síndrome antifosfolipídica (SAF) e anticorpos contra proteínas de choque térmico (anti-Hsp). A beta2-glicoproteína I (beta2-gpl) e as Hsp de 60 e 65 kilodaltons (kDa) são moléculas encontradas em ateromas. O relato é o primeiro a incluir a pesquisa de IgA anticardiolipina (aCL), IgG/IgM/IgA antibeta2-gpl e anti-HSP em casuísticas de DOSAC.

Objetivo - Avaliar a associação, se alguma, entre ocorrência de AAF/anti-Hsp e DOSAC.

Pacientes e Métodos - Neste estudo de caso-controle, os casos consistiram de uma população de pacientes com DOSAC (sintomática ou assintomática). A presença de DOSAC foi definida pela anamnese, exame físico, angiografia por ressonância nuclear magnética (ARM) e endarterectomia de carótida. Os *controles* foram selecionados de enfermarias de ortopedia. Ambos os grupos foram avaliados quanto aos fatores de risco: *idade, sexo, raça, hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, diabete mellitus (DM) e hipercolesterolemia*. Anticorpos IgG/IgM/IgA aCL, IgG/IgM/IgA antibeta2-gpl, IgG anti-Hsp 60 kDa humana recombinante e IgG anti-Hsp 65 kDa de *Mycobacterium bovis* foram detectados através de ensaio enzimático. Para estimar o grau de associação dos anticorpos com DOSAC, razão de chances (*odds ratios*, OR) foram calculadas

com seus respectivos IC 95%. Regressão logística foi utilizada para ajuste de fatores de confusão.

Resultados - Entre os 57 casos e 93 controles estudados, a média de idade foi de $66 \pm 8,7$ anos nos casos e de $47,5 \pm 18,8$ anos nos controles ($P < 0,001$). A raça negra predominou no grupo controle. O sexo masculino foi mais freqüente nos casos (61,4%), situação que se inverteu nos controles (49,5%). As presenças de HAS (OR=21,0; IC95% 8,0 a 57,1; $P < 0,001$) e de hipercolesterolemia (OR=25,5; IC95% 9,5 a 70,9; $P < 0,001$) determinaram, entre os fatores de risco conhecidos, as mais fortes associações com DOSAC. Anticorpos IgA antibeta2-gpl foram detectados em 33,3% dos casos e em 9,7% dos controles (OR ajustado 4,7; IC95% 1,0 a 23,7; $P = 0,06$). A freqüência dos outros anticorpos testados não diferiu significativamente em casos e controles.

Conclusão - Não houve associação entre ocorrência de aCL, IgG/IgM antibeta2-gpl, anti-Hsp e desfecho DOSAC. A presença de anticorpos IgA antibeta2-gpl se configurou como fator de risco independente para DOSAC (OR ajustado 4,7), embora com significância limítrofe ($P = 0,06$). A associação de IgA antibeta2-gpl com DOSAC pode representar um dos elos na relação auto-imunidade e aterosclerose carotídea.

Palavras-chave: anticorpos anticardiolipina, anticorpos antibeta2-glicoproteína I, anticorpos anti-Hsp, doença obstrutiva severa de artérias carótidas.

SUMMARY

Theoretical basis – Severe obstructive carotid artery disease is related to atherosclerosis (ATC). Mechanisms of inflammation and self-immunity may have influence on the occurrence of ATC. This includes antiphospholipid antibodies (AAP), antiphospholipid syndrome markers (APS) and antibodies against heat shock proteins (anti-Hsp). A beta 2-glycoprotein I (beta2-gpl) and the 60 and 65 kilodaltons (kDa) Hsp are molecules present in atherosclerotic plaques. This is the first report including research on IgA anticardiolipin (aCL), IgG/IgM/IgA anti-beta2-glycoprotein I and anti-HSP in severe obstructive carotid artery disease cases.

Objective – To determine the association, if any, between the presence of AAP/anti-Hsp and the occurrence of severe obstructive carotid artery disease.

Patients and Methods – In our control case study the cases consisted of patients with either symptomatic or asymptomatic severe obstructive carotid artery disease. The presence of the disease was determined by anamnesis, physical examination, MR angiography (MRA) and carotid endarterectomy. The control group consisted of patients admitted to orthopedic wards. Both groups were assessed for risk factors: *age, sex, race, hypertension, smoking, diabetes mellitus (DM) and hypercholesterolemia*. IgG/IgM/IgA aCL, IgG/IgM/IgA anti-beta2-gpl, IgG anti-Hsp 60 kDa recombinant human and IgG anti-Hsp 65 kDa of *Mycobacterium bovis* antibodies were detected by enzymatic test. In order to assess the degree of association between antibodies with severe obstructive carotid artery disease,

(odds ratios, OR) were calculated with their respective confidence intervals (IC 95%). Logistic regression was used to adjust the confusion factors.

Results – 57 case patients and 93 control patients were studied and the average age was 66 ± 8.7 years for case patients and 47.5 ± 18.8 years for control patients ($P < 0.001$). There was a predominance of black race individuals in the control group. Most case patients were male individuals (61.4%), but there were less male individuals (49.5%) among control patients. The presence of hypertension (OR=21.0; IC 95% 8.0 to 57.1; $P < 0.001$) and hypercholesterolemia (OR=25.5; IC 95% 9.5 to 70.9; $P < 0.001$) determined the strongest associations between the risk factors already known and severe obstructive carotid artery disease. IgA antibeta2-gpl antibodies were detected in 33.3% of the case patients and in 9.7% of the control patients (OR adjusted 4.7; IC 95% 1.0 to 23.7; $P = 0.06$). The frequency of other non-tested antibodies was not significantly different in cases and controls.

Conclusion – No association was found between the presence of aCL, IgG/IgM antibeta2-gpl, anti-Hsp and the occurrence of severe obstructive carotid artery disease. The presence of IgA antibeta2-gpl antibodies was found to be an independent risk factor for severe obstructive carotid artery disease (OR adjusted 4.7), although with borderline significance ($P = 0.06$). The association of IgA antibeta2-gpl with severe obstructive carotid artery disease may be one of the links between auto-immunity and carotid.

Key-words: Anticardiolipin antibodies, anti-beta2-glycoprotein I antibodies, anti-Hsp antibodies, severe obstructive carotid artery disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Célula Endotelial e o Endotélio

A célula endotelial é a unidade do endotélio que, na sua integridade estrutural e funcional, compõe uma monocamada de epitélio pavimentoso localizado entre o sangue circulante e a camada média dos vasos, posição estratégica para a manutenção da homeostasia. O endotélio reveste todo o sistema vascular desde o coração, as grandes artérias até os capilares e toda a rede venosa e linfática. Anatomicamente, devido à privilegiada extensão, tem a capacidade de detectar mínimas alterações e, através de imensa rede de transmissão de dados, controla ativamente o tônus vascular, a coagulação, a trombólise, a remodelação vascular e a resposta inflamatória e imune. Funcionalmente, seu conjunto comporta-se como um órgão de impacto a quase todas as doenças, sendo o primeiro a reagir(1).

As modificações são detectadas pelo endotélio em qualquer local do organismo e as informações são transmitidas por meio de comunicações intercelulares para todas as outras células endoteliais que participam local ou sistemicamente, dependendo da repercussão da agressão. Considera-se a célula endotelial o mais perfeito sensor biológico existente (2).

O endotélio normal é um órgão multifuncional versátil, além da **manutenção da barreira à permeabilidade**, tem inúmeras propriedades sintéticas e metabólicas que interpretam e respondem a estímulos físicos e químicos. As principais propriedades e funções da célula endotelial são:

elaboração de anticoagulantes e de moléculas antitrombóticas (prostaciclina, trombomodulina, fator tissular ativador do plasminogênio, moléculas semelhantes à heparina); **elaboração de moléculas protrombóticas** [fator de von Willebrand (Fator VIIIa), fator tecidual, inibidor do ativador do plasminogênio]; **produção de matriz extracelular** (colágeno, proteoglicanos); **modulação do fluxo sanguíneo e da reatividade vascular** [vasoconstritores - endotelinas, enzima conversora da angiotensina (ACE) (AI \Rightarrow All), vasodilatadores - óxido nítrico/fator de relaxamento derivado do endotélio (NO/EDRF), prostaciclina]; **regulação da inflamação e da imunidade** [interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8)]; moléculas de aderência [molécula de adesão da célula vascular - *vascular-cell adhesion molecules* (VCAM), molécula de adesão intercelular - *intercellular adhesion molecules* (ICAM), integrinas e selectinas, antígenos de histocompatibilidade]; **regulação do crescimento celular** [estimuladores do crescimento - fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator estimulador de colônias (CSF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e inibidores do crescimento-heparina, fator beta de transformação do crescimento (TGF- β)]; **oxidação da LDL** (3).

1.1.1 Disfunção Endotelial

A disfunção endotelial (DE) ocorre quando há desequilíbrio na produção de substâncias pelo endotélio e o nível oscila para o lado das substâncias vasoconstritoras, protrombogênicas, pró-inflamatórias e proliferativas (3). Considera-se a DE o estágio inicial de uma série de doenças de natureza inflamatória como as vasculites e a aterosclerose (4).

A disfunção endotelial é o ponto inicial da aterosclerose (ATC). Atualmente, sabe-se que a DE resultante de uma agressão sistemática promove respostas compensatórias que alteram a homeostase do endotélio, sobretudo através da ativação de leucócitos e plaquetas, bem como da alteração de sua permeabilidade às lipoproteínas e outros constituintes plasmáticos. A resposta vascular à lesão induzida pelos fatores de risco é do tipo inflamatório e envolve a interação de diversos grupos celulares, tais como: células endoteliais, monócitos (MNC), macrófagos (MCF), linfócitos T (LT) e células musculares lisas (CML) (5).

Esta resposta inflamatória normalmente ocorre em proporções fisiológicas após estímulo induzido pela lipoproteína de baixa densidade - *low density lipoprotein* (LDL) que é protetora para o endotélio. No entanto essa resposta pode se perpetuar com o recrutamento contínuo de monócitos e LT para a região subendotelial através da liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Também ocorre indução de moléculas de adesão, migração de células musculares lisas e formação de tecido fibrótico, processos inerentes à formação da placa aterosclerótica (4).

1.1.2 Aterosclerose

A aterosclerose humana é um processo inflamatório e fibroproliferático crônico, sistêmico e progressivo, determinado por respostas celulares e moleculares, altamente específicas, às agressões da parede arterial (6, 7). Ela acomete lentamente, por intermédio de disfunção endotelial, inflamação, proliferação celular e alteração da matriz extracelular (8), todos os territórios arteriais, com destaque para a aorta e seus ramos principais, como as artérias carótidas, renais, ilíacas e femorais, assim como o leito coronariano ao longo da

vida dos indivíduos. Estágios iniciais da doença aterosclerótica desenvolvem-se na infância de maneira silenciosa e progressiva. Estrias gordurosas, provavelmente a lesão mais precoce da aterosclerose, aparecem na aorta e nas artérias carótidas, independente de etnia, sexo ou ambiente (9-13) e são observadas nas artérias coronárias e cerebrais na adolescência (10). As primeiras manifestações clínicas aparecem, geralmente no adulto (14), sob a forma de complicações vasculares, como angina de peito e infarto agudo do miocárdio (IAM) por doença arterial coronariana (DAC), de acidentes vasculares encefálicos, de claudicação intermitente e de aneurismas, entre as mais comuns (15).

As doenças conseqüentes às complicações vasculares da aterosclerose são hoje a principal causa de morbimortalidade nos países desenvolvidos, sendo responsáveis por mais de 50% dos óbitos em centros urbanos industrializados (16, 17). Relatos da Organização Mundial de Saúde estimam que até o ano 2020 a aterosclerose será a causa de 40% das mortes de todo planeta (18).

No Brasil, em especial no Rio Grande do Sul, o impacto desse grupo de patologias é também bastante expressivo. Censo do Ministério da Saúde revela que as doenças cardiovasculares ocupam o primeiro lugar com 32% dos óbitos nas estatísticas de mortalidade por grupo de causas na população brasileira. São também responsáveis por cerca de 10% de todas as hospitalizações no Sistema Único de Saúde (19).

A aterosclerose resulta da inter-relação multifatorial e complexa entre endotélio vascular, lipídios, macrófagos, linfócitos T e células musculares lisas, modulada pela presença de uma série de fatores de risco, alguns com importante determinante genético e outros basicamente ambientais. Do primeiro grupo citam-se: as hiperlipidemias e a hipercolesterolemia familiar (20), hipertensão arterial

(21, 22), diabetes mellitus, síndrome metabólica (23), história familiar de DAC (24) e hiperhomocisteinemia (25). Tabagismo (26), alimentação rica em colesterol e gorduras saturadas (20) e agentes infecciosos (27) fazem parte do segundo grupo.

A associação entre colesterol e aterosclerose e suas complicações é evidente. O advento de potentes fármacos redutores do colesterol como os inibidores da enzima hidroximetilglutaril-coenzima A redutase (HMGCoA), genericamente conhecidos como estatinas, traduziu-se em um decréscimo significativo na morbimortalidade cardiovascular em pacientes hipercolesterolêmicos (28). Com efeito, estudos clínicos e experimentais desenvolvidos nas últimas décadas atestam o papel central do colesterol na formação e desenvolvimento iniciais da placa (aterogênese), na sua evolução, nas complicações e nos desfechos clínicos (20).

1.1.3 Aterogênese

A maior concentração do colesterol circula no plasma sob a forma de moléculas de lipoproteína de baixa densidade (LDL). As partículas esféricas de LDL possuem um núcleo lipofílico formado de ésteres de colesterol e triglicerídios. Sua superfície polar é constituída por colesterol não esterificado e fosfolipídios, os quais estão envoltos em um polipeptídeo que é a apolipoproteína B-100 (apoB). Parte considerável de seu conteúdo lipídico é representada por ácidos graxos poliinsaturados (29).

As moléculas de LDL circulantes atravessam o endotélio por difusão passiva ao nível das junções intercelulares. A entrada da LDL na parede vascular é diretamente proporcional à sua concentração plasmática. Quando ocorre a DE,

por diminuição ou perda das propriedades vasodilatadoras do endotélio, resulta um aumento da permeabilidade às lipoproteínas (30). Logo abaixo do endotélio, confinadas a proteoglicanos da matriz extracelular por diferença na polaridade externa entre as duas moléculas, acontece retenção de LDL no fluído intimal, situação determinante para o desenvolvimento da aterosclerose (31). Neste espaço subintimal a LDL sofre modificações químicas e enzimáticas que incluem oxidação, lipólise, proteólise e agregação da sua molécula, transformando-se em LDL “modificada”. Bem diferente da LDL nativa, a LDL modificada é aterogênica, determinando uma série de respostas inflamatórias, imunomediadas, que precedem a formação e o desenvolvimento da placa (32).

1.1.3.1 Teoria Oxidativa

A oxidação é uma das mais significantes modificações da LDL e ocorre quando ela é exposta aos resíduos oxidativos (radicais livres de oxigênio) do metabolismo celular do endotélio, de macrófagos e de células musculares lisas (33).

Desconhece-se, das características da LDL, qual a que determina maior suscetibilidade à oxidação. Esta se traduz na formação de radicais livres no interior da lipoproteína, seguida de um processo de propagação química em cadeia, a partir da subtração de um átomo de hidrogênio de um grupo metila do ácido graxo poliinsaturado. Tal processo é mediado, entre outros, por lipoxigenases presentes em todos os tipos celulares da parede arterial. Inicialmente, a oxidação restringe-se ao conteúdo lipídico, dando origem à LDL minimamente oxidada. Em seqüência, os ácidos graxos se decompõem, gerando cetonas e aldeídos reativos, os quais, interagindo com grupos lisina e histidina da

apoB, geram aductos lipoprotéicos, alterando a carga elétrica, a densidade e as propriedades eletroforéticas da molécula de LDL (29). A oxidação da LDL é um processo complexo e todos os seus componentes, quer protéico, quer lipídico, são, em maior ou menor escala, atingidos de forma variável. Assim, não existe uma só partícula bioquimicamente definível de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox), mas um amplo espectro de lipídios, fragmentos polipeptídios e formas mistas oxidadas, diferentes tanto na conformação estrutural quanto funcionalmente (34).

A LDLox apresenta carga elétrica negativa e deixa de ser reconhecida pelo seu receptor celular típico. Passa, então, a ser reconhecida pelos chamados receptores de varredura (*scavenger receptors*), moléculas de superfície presentes, entre outros, nos macrófagos e nas células musculares lisas (35, 36).

A LDLox tem ação quimiotáxica para monócitos e linfócitos T circulantes (37). Por ativação do fator nuclear kapa B (NF- κ B) a LDLox induz transcrição gênica e conseqüente expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial (38). A selectina-P, a selectina-E e a molécula de adesão da célula vascular-1 (VCAM-1) são mediadoras do rolamento e fixação dos leucócitos circulantes ao endotélio (39). Uma vez aderidos, migram, por diapedese, para a íntima sob a ação de quimiocinas como a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) (40). As quimiocinas são produzidas por células endoteliais em resposta a mediadores inflamatórios como o interferon gama (IFN- γ) e por forças locais de cisalhamento entre o endotélio e o sangue circulante. A produção de quimiocinas e de moléculas de adesão é contra-regulada, ao nível de transcrição gênica, pelo óxido nítrico (NO), vasodilatador endógeno produzido pela célula endotelial. Esse mecanismo explica porque as placas desenvolvem-se, preferencialmente, ao nível

de bifurcações e ramificações do leito arterial, onde o estresse hemodinâmico é maior. Nesses sítios ocorre turbilhonamento do sangue, aumento de forças de cisalhamento, expressão de moléculas de adesão e redução da atividade da sintase do NO, enzima responsável pela produção do vasodilatador (41). Os monócitos coletados e co-localizados com LDLox no subendotélio são ativados e se transformam em macrófagos. Nesse processo toma parte fundamental o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), citocina produzida por macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas sob estímulo da LDL oxidada. O M-CSF seleciona macrófagos produtores de mieloperoxidase, enzima que, ao produzir *in vivo* o poderoso oxidante ácido hipoclorídico, propaga a oxidação da lipoproteína e o processo inflamatório (42).

Os macrófagos ativados expressam, em sua superfície, receptores de varredura como: CD36, CD68 (macrossialina), LOX-1, SR-A (receptor acetilado do LDL) e receptores *toll-like* (TL) (43). A interação entre LDLox e seu receptor promove a endocitose da partícula e sua degradação lisossomal. A expressão e a ativação dos receptores de varredura são reguladas pelo fator de transcrição nuclear PPAR- γ (Receptor γ Ativador do Proliferador de Peroxissomo), cujos ligantes são a própria LDLox e citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IFN- γ (44). Com o acúmulo progressivo de ésteres de colesterol no seu interior, os macrófagos transformam-se em células espumosas, reconhecidas como precursoras do processo aterosclerótico (37). Os receptores de varredura não são regulados pelo conteúdo de LDLox intracelular. Ocorre, então, um depósito maciço de colesterol no citoplasma das células espumosas que, uma vez iniciado, tende a amplificar-se por si mesmo. Contudo a LDLox em excesso é citotóxica e, assim, as células espumosas necrosam e liberam seu conteúdo para o espaço

intersticial. O acúmulo de detritos e de colesterol extracelulares forma o núcleo do ateroma. Macrófagos ativados e linfócitos T liberam fatores de crescimento como interleucina-1 que induzem a proliferação e a migração de células musculares lisas da túnica média para o subendotélio (45). Células musculares lisas digerem lipídios extracelulares por fagocitose e contribuem para o aumento do núcleo da lesão. Além disso, se diferenciam em fibroblastos, produzindo macromoléculas da matriz extracelular como colágeno, elastina e proteoglicanos. O colágeno cria uma capa fibrosa ao redor dos depósitos lipídicos que ficam restritos à parede arterial, formando as chamadas estrias gordurosas. Essas placas lipofibrosas caracterizam-se por um núcleo necrótico, conteúdo crescente de cristais de colesterol, matriz extracelular, células inflamatórias e células musculares lisas recobertas por uma capa fibrosa. O conteúdo necrótico da lesão é representado por macrófagos, células espumosas, células musculares lisas que se desintegram, quer por efeito citotóxico direto do seu componente lipídico, quer por apoptose induzida por citocinas produzidas localmente. Com a evolução, as placas ateroscleróticas podem protuberar para o lume vascular, causar remodelamento arterial, ulcerar e/ou calcificar(45).

1.1.3.2 Placa Aterosclerótica

O desenvolvimento da placa e sua conseqüente estabilidade dependem da relação entre os fatores de crescimento e citocinas liberados localmente pelos componentes celulares. Nas últimas décadas, os conhecimentos de biologia vascular refutaram a hipótese de que o ateroma seria um simples acúmulo passivo de gordura substanciando a idéia de um processo inflamatório dinâmico. Por exemplo, o fator de crescimento β produzido por células musculares lisas é

antiinflamatório e estimula a síntese de proteínas da matriz, estabilizando as placas. Por outro lado, os macrófagos produzem metaloproteinases e catepsinas que são enzimas que digerem colágeno e elastina, tornando as lesões vulneráveis à ruptura (46).

Sabe-se hoje que as complicações vasculares agudas da aterosclerose não decorrem apenas do grau de estenose intraluminal que a placa determina, mas, principalmente, da sua composição (47). Estudos histopatológicos revelam que placas vulneráveis apresentam uma fina capa de colágeno recobrimo um núcleo com grande acúmulo de colesterol livre e esterificado na matriz extracelular, alta densidade de macrófagos, células espumosas e linfócitos T (48).

A placa aterosclerótica torna-se instável quando sua capa fibrosa fratura e expõe o conteúdo altamente trombogênico de seu núcleo ao sangue circulante. O conteúdo subcapsular, que é rico em colágeno e em fator tecidual, quando expostos à circulação, promove adesão e ativação plaquetária, ativação da cascata de coagulação e trombose (49). A perda de continuidade da capa fibrosa pode ocorrer por erosão superficial, por hemorragia intraplaca decorrente de neoangiogênese intimal e por ruptura. A ruptura da capa fibrosa é o mecanismo mais comum da instabilidade da placa e dá início aos processos hemostáticos que conduzem à formação de trombos intravasculares e síndromes agudas. Ocorre mais freqüentemente em suas margens, ou seja, nos sítios de junção com a parede arterial. Nesse local, as placas vulneráveis são particularmente ricas em macrófagos e linfócitos T ativados, apresentando poucas células musculares lisas e pequeno arcabouço colágeno (50).

Na metade da década de 80, modernas técnicas imunohistológicas evidenciaram que linfócitos T e células imunocompetentes estão presentes desde

as etapas iniciais da formação e desenvolvimento da lesão aterosclerótica, chegando a perfazer 20% da celularidade nos sítios de ruptura das lesões (51). Constatou-se que a secreção de citocinas pelas células T modula todo processo inflamatório (52, 53). Assim, surgiram hipóteses de que respostas imunológicas, moduladas por auto-anticorpos e/ou imunocomplexos, em resposta às propriedades antigênicas da placa aterosclerótica e dos seus componentes, poderiam ser o gatilho para a instabilidade de lesões vulneráveis (54-59).

A bifurcação carotídea é uma das áreas particularmente predispostas à formação e ao desenvolvimento de placas de ateroma, ocorrendo principalmente ao nível da origem da carótida interna, enquanto que a carótida primitiva e a carótida interna distal se encontram geralmente poupadas(60).

A geometria da bifurcação carotídea é um fator importante pelas condições hemodinâmicas que favorecem a formação de placa. O bulbo carotídeo tem uma área de secção duas vezes maior do que a carótida interna imediatamente distal. Essa configuração, em combinação com o ângulo da bifurcação, resulta em larga área de separação de fluxo e baixas e oscilatórias forças de cisalhamento ao nível da parede externa do bulbo que cria uma região de fluxo laminar e unidirecional através da parede interna do bulbo (60).

As modificações hemodinâmicas existentes ao nível da bifurcação carotídea, incluindo a turbulência que pode dar expressão ao característico sopro auscultatório, podem igualmente comprometer a integridade de placas preexistentes e acelerar a sua tendência para fissuração, ulceração e desenvolvimento de fenômenos tromboembólicos(60).

A placa carotídea responsável por aproximadamente 70% de todos os AVCs isquêmicos é encontrada em vários estágios de evolução em pacientes sintomáticos e assintomáticos (61-63). Na sua forma menos complexa, ela é composta de espessamento fibromuscular intimal, branco aperolado, com uma superfície lisa composta de células achatadas, provavelmente, células musculares lisas transformadas, formando uma superfície não-trombogênica. É referida como placa “dura” (64).

A placa “mole”, na sua forma complexa, contém coágulo sangüíneo ou “debris” ateromatosos encistados dentro da placa (65-67). Ela pode aumentar rapidamente (hemorragia intraplaca) e obstruir o fluxo, ulcerar, romper e desprender seu conteúdo como material embólico para o cérebro ou acumular trombos e resultar em oclusão total do vaso (68-71).

1.2 Artérias Carótidas

No homem, ao contrário do que ocorre em outros mamíferos, há uma quase independência entre circulação arterial intracraniana e extracraniana. Desta forma, anastomoses que unem artérias oriundas do sistema da carótida interna e carótida externa são, na espécie humana, relativamente pobres e, em grande parte das vezes, insuficientes para manter uma circulação colateral útil em casos de oclusões no território carotídeo(72).

As artérias responsáveis pelo suprimento sangüíneo cerebral têm origem no arco aórtico, cujo primeiro ramo é o tronco braquiocefálico direito que dá origem às artérias subclávia direita e carótida comum direita. A artéria vertebral direita nasce na primeira porção da artéria subclávia direita. A artéria carótida comum esquerda é o segundo ramo do arco aórtico, nascendo em tronco único. O

terceiro ramo do arco aórtico é a artéria subclávia esquerda, onde tem origem a artéria vertebral esquerda(72).

As artérias carótidas comuns bifurcam-se, habitualmente, no nível da borda superior da cartilagem tireóide, em artérias carótida interna e carótida externa. Na porção terminal da artéria carótida comum e proximal da carótida interna existe uma região de dilatação conhecida como bulbo carotídeo em cuja porção posterior encontra-se o glomo carotídeo. A artéria carótida externa emite vários ramos no pescoço, enquanto que a artéria carótida interna, que se situa lateralmente à artéria carótida externa, só emite o seu primeiro ramo em sua porção intracraniana, após ter perfurado a dura-máter, que é a artéria oftálmica. Existe uma importante rede de colaterais formando anastomose entre as artérias carótidas interna e externa do mesmo lado, assim como entre as duas artérias carótidas externas, que são importante via de suplência da circulação cerebral, quando ocorrem estenoses ou oclusões da artéria carótida interna. Os ramos terminais da artéria carótida interna são as artérias cerebral anterior e a cerebral média(73).

As artérias vertebrais se juntam no nível da ponte formando a artéria basilar que, após um curto percurso, dá origem às artérias cerebrais posteriores. As artérias cerebrais anterior e média, ramos do sistema carotídeo, se comunicam com as artérias cerebrais posteriores, ramos do sistema vértebro-basilar, formando a mais importante rede anastomótica entre esses dois sistemas: o polígono de Willis (73).

No sistema cérebro-vascular extracraniano, a aterosclerose acomete mais comumente a bifurcação da artéria carótida comum, particularmente na região do

bulbo carotídeo. As regiões mais acometidas são: bifurcação carotídea (38%), vasos intracranianos (33%), origem das vertebrais (20%) e arco aórtico (9%) (74).

O fluxo sanguíneo normal para o tecido encefálico do adulto é, em média, de 50 a 55 ml por 100 g de encéfalo por minuto. Para todo o encéfalo, isso corresponde a aproximadamente 750 ml/min, ou seja, 15 a 20% do débito cardíaco em repouso. Além da ampla rede anastomótica formada pelo polígono de Willis, a vascularização do encéfalo apresenta sofisticado mecanismo de autorregulação, o que implica em proteção à instalação de isquemia. Os estímulos à vasodilatação são a hipóxia, a acidose, a hipotensão e a hipoglicemia (75).

Estabelecida uma região de isquemia por oclusão da nutrição arterial, ramos arteriais que formam a circulação colateral podem recuperar total ou parcialmente o trofismo do tecido nervoso (71-75).

O acidente vascular cerebral (AVC), originado pela presença de placa de ateroma na bifurcação das carótidas, pode ser causado por dois mecanismos. O primeiro, e menos freqüente, é o acidente vascular cerebral de causa hemodinâmica provocado por hipofluxo distal à placa de ateroma. Na maior parte das pessoas, como o polígono de Willis é funcionante, estenoses intensas ou mesmo oclusões completas podem ser bem toleradas. O AVC hemodinâmico ocorre em situações de baixo débito cardíaco (hipotensão ou arritmia) em associação com estenose promovida pela placa de ateroma (71-75).

O segundo mecanismo é o ateroembolismo conseqüente ao desprendimento de fragmentos e trombos das placas ateroscleróticas, causando obstrução do fluxo sanguíneo, fenômeno vaso-oclusivo que caracteriza o AVC (71-75).

1.2.1 Doença Obstrutiva de Artérias Carótidas (DOAC)

A doença cerebrovascular de origem aterosclerótica é a terceira maior causa de morte nos EUA, sendo a obstrução parcial ou total das artérias carótidas extracranianas responsável por um terço dos casos (76). No Brasil, morrem cerca de 85.000 pessoas por ano por doença cerebrovascular de origem aterosclerótica, número que representa 9% do obituário geral do país (77).

A doença aterosclerótica é a causa mais comum da obstrução carotídea, sendo freqüente sua concomitância com doença obstrutiva ou aneurismática de outros territórios vasculares como a aorta, artérias coronárias e artérias de membros inferiores (78, 79).

A DOAC é insidiosa, podendo o acidente vascular cerebral (AVC) ser a primeira manifestação e o sopro carotídeo, o primeiro sinal clínico (78).

A incidência de sopro carotídeo na população entre 45 e 54 anos é de 1% a 2% e 8,2% nos indivíduos com idade superior a 75 anos (80). Sacco *et al.* demonstraram, no estudo de Framingham, que indivíduos assintomáticos com sopro carotídeo têm 2,6 vezes mais probabilidade de desenvolver AVC que a população geral na mesma faixa etária (81). Johson *et al.*, em um estudo prospectivo de dez anos, verificaram que a estenose de artéria carótida evolui para obstrução moderada ou de moderada para severa em 23% da população estudada (82). Justifica-se o simples pensamento: “pacientes que têm maior grau de estenose carotídea estão sujeitos a maior risco de AVC” (83).

A estenose carotídea pode ser classificada como leve quando a redução da luz situa-se entre 0% e 49%; moderada, entre 50% e 69%; severa, entre 70% e 99% e oclusão total. Vários estudos demonstram que pacientes com estenose acima de 60% apresentam maiores riscos de AVC (84).

Achado de extrema importância é a presença de lesão ulcerada na placa aterosclerótica de carótida, situação que aumenta consideravelmente a incidência de AVC por fenômenos tromboembólicos. As lesões ulceradas podem ser classificadas em pequenas (A), grandes (B) e complexas (C). Dixon *et al.*, em um estudo prospectivo de dez anos (n=113), constataram taxa de AVC de 3% em pacientes com lesão ulcerada no tipo A, 19% no tipo B e 21% no tipo C (85).

Os indivíduos que apresentam estenose de artérias carótidas podem permanecer assintomáticos, desenvolver sintomas neurológicos menores ou apresentar AVC como primeira manifestação. O diagnóstico dos sintomas é fundamental e as principais manifestações neurológicas são:

- ✓ *ataque isquêmico transitório (AIT)* - déficit neurológico sensitivo ou motor, com regressão total em menos de vinte e quatro horas, mais comumente em minutos. O risco de AVC no primeiro ano é de 10% com diminuição progressiva a partir do terceiro ano (86). Deve-se ter em mente que um episódio de AIT deve ser considerado como sinal premonitório de AVC (74).
- ✓ *amaurose fugaz* - episódio de cegueira momentânea. Pode ser total ou parcial, afetar todo o campo visual ou apenas um segmento. O risco estimado de AVC é de 8% no primeiro ano (87).
- ✓ *déficit neurológico reversível* - déficit neurológico com regressão total após vinte e quatro horas. O risco de AVC é de 9% ao ano nos pacientes que o apresentaram (87).
- ✓ *ataque isquêmico de repetição* - ocorrência de AIT ou amaurose fugaz repetidamente. Implica alto risco de AVC (88).

- ✓ *acidente vascular cerebral* - infarto cerebral estabelecido, com seqüelas neurológicas menores ou maiores, dependendo da extensão do comprometimento do parênquima cerebral. Aproximadamente 30-50% dos AVC são precedidos de AIT (74).

O tratamento da doença carotídea tem como principal objetivo a prevenção do AVC nos pacientes assintomáticos ou sintomáticos (AIT, amaurose fugaz), bem como evitar a ocorrência de novo episódio entre os que já apresentaram essa doença e encontram-se neurologicamente estáveis. Estudos demonstram que aproximadamente um quinto dos pacientes que apresentaram quadro de isquemia cerebral apresentou um segundo evento e 7% apresentam um terceiro acidente, o que contribui para aumentar o grau de incapacidade funcional desses pacientes (89).

O tratamento clínico está indicado nos pacientes com estenose carotídea leve, com contra-indicação para a cirurgia da carótida. Também está indicado no seguimento após esse procedimento para reduzir a progressão da doença aterosclerótica. O tratamento clínico baseia-se no controle dos fatores de risco (hipertensão, dislipidemia, tabagismo e diabete mellitus) e na utilização de antiagregantes plaquetários (90, 91).

O tratamento cirúrgico, endarterectomia de carótida (EC), nos atuais moldes técnicos, foi realizado pela primeira vez em 7 de agosto de 1953, por Michael De Bakey, em Houston, EUA (92). Sua utilização cresceu em todo o mundo com indicação, tanto para estenose leve quanto moderada e severa, e também na fase aguda da doença. Devido a isso, houve questionamento da validade do método nos anos 80 (93, 94). Na década de 1990, foram publicados

cinco grandes estudos prospectivos que demonstraram a eficácia da EC na prevenção do AVC em seguimento de longo prazo, bem como sua superioridade sobre o tratamento clínico nas estenoses moderadas e severas:

✓ ***North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET)***

Este estudo foi elaborado pelo *National Institute of Neurology Diseases and Stroke* (NINDS), divisão do Instituto Nacional de Saúde dos EUA. Iniciou em 1987, em 50 centros médicos dos EUA e Canadá. Foram randomizados 659 pacientes com estenose sintomática da carótida entre 70 e 99% (331 para o tratamento clínico e 328 para o tratamento cirúrgico (EC)). Após dois anos de seguimento, o risco cumulativo de infarto cerebral ipsilateral foi de 26% para o grupo clínico e de 9% para o grupo cirúrgico. O grau de estenose foi rigorosamente determinado, por comparação do diâmetro linear mais estreitado do vaso com o diâmetro da artéria carótida interna normal, além do bulbo carotídeo. Em 1998 foi publicada uma continuação deste estudo que confirmou a eficácia da EC nos pacientes sintomáticos com estenose superior a 50% (95, 96).

✓ ***European Carotid Surgery Trial (ECST)***

Este estudo envolveu 80 centros de Neurologia e Cirurgia Vascular de 14 países da Europa. Realizado entre 1981 e 1993, incluiu 1.243 pacientes que apresentavam indícios de isquemia cerebral não-incapacitante (amaurose fugaz ou AIT), com placa de ateroma na carótida extracraniana ipsilateral com qualquer grau de estenose, ou seja, de 19% a 99%. Para o tratamento dos pacientes com estenose grave, foram randomizados 778 pacientes com estenose entre 70% e 90% (455 pacientes cirúrgicos (EC) contra 323 pacientes clínicos) para

comparação dos resultados entre EC e tratamento clínico. A taxa de morbimortalidade cirúrgica foi de 7,5%. Após três anos de seguimento, o total de AVC grave ou fatal foi de 6% no grupo cirúrgico e de 11% no grupo clínico. Este estudo também demonstrou claramente que a cirurgia não beneficia pacientes com estenose igual ou menor que 30% (97).

✓ ***Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study (ACAS)***

Estudo realizado em 39 centros médicos dos EUA e Canadá entre dezembro de 1987 e dezembro de 1993. Os 1.659 pacientes com estenose de carótida igual ou superior a 60%, foram randomizados em dois grupos: 834 para tratamento clínico e 825 para cirurgia (EC). Ao final de trinta e dois meses, a taxa cumulativa de AVC no grupo submetido a tratamento clínico foi de 11% e no grupo cirúrgico, de 5,1%, incluindo as complicações da arteriografia diagnóstica (1,2%) e da cirurgia (2,3%). A redução do risco absoluto de AVC foi de 5,8% e do risco relativo foi de 55%. Este estudo foi interrompido dois anos antes de sua conclusão e todos os pacientes do grupo clínico foram encaminhados para cirurgia (98).

✓ ***VA Asymptomatic Study – Veterans – Administration Asymptomatic Carotid Stenosis Study***

Estudo multicêntrico, iniciado em 1986, envolveu 11 hospitais de veteranos de guerra dos EUA. Foram randomizados 444 pacientes do sexo masculino, com estenose de carótida de 50% ou mais. Separados em dois grupos, 233 pacientes participaram do grupo de tratamento clínico e 211 pacientes no de tratamento cirúrgico (EC). O seguimento foi de 35 a 78 meses, com média de 47,9 meses. A

mortalidade perioperatória foi de 1,9% (quatro óbitos por IAM) e a taxa de AVC foi de 4,7%, incluindo 0,4% de morbidade causada pela arteriografia diagnóstica. Após o período de seguimento, a incidência de eventos neurológicos ipsilaterais foi de 8% no grupo cirúrgico e de 20,6% no grupo submetido a tratamento clínico. O risco absoluto de evento neurológico ipsilateral foi reduzido em 12,6% e o risco absoluto de todos os eventos cerebrais (ipsilaterais ou contralaterais) foi reduzido em 11,6%. Este estudo foi o primeiro a demonstrar a superioridade do tratamento cirúrgico sobre o tratamento clínico (99).

✓ ***VA Symptomatic Study – Veterans Affairs Cooperative Study for Carotid Endarterectomy***

Estudo multicêntrico que envolveu 18 hospitais de veteranos de guerra dos EUA, entre 1986 e 1991. Foram randomizados 193 pacientes do sexo masculino que apresentavam sintomas de isquemia cerebral (AIT, amaurose fugaz e AVC com boa recuperação) e estenose carotídea de, pelo menos, 50%. Cento e um pacientes compunham o grupo tratamento clínico (aspirina e controle de fatores de risco) e 92 foram submetidos a tratamento cirúrgico (EC).

Após o seguimento médio de 11,9 meses, o risco de eventos neurológicos no grupo cirúrgico foi de 7,7% e no grupo clínico de 19,4%, representando uma redução de risco absoluto de 11,7% e de risco relativo de 60%. A redução do risco relativo no grupo com estenose maior que 70% foi de 72% (100).

Publicações posteriores demonstraram a possibilidade de reprodução dos resultados desses *trials* em diversos centros, sendo a EC considerada, atualmente, o procedimento “padrão-ouro” para o tratamento intervencionista da doença aterosclerótica carotídea (101, 102).

Com base nos resultados de estudos multicêntricos e em publicações de grandes séries cirúrgicas, as indicações aceitas para endarterectomia da carótida, atualmente, são (95-102):

Pacientes sintomáticos:

- estenose acima de 60%;
- estenose entre 50% e 60% com lesão complexa;
- estenose entre 50% e 60% em pacientes com indicação para cirurgia de grande porte;
- presença de trombo aderido à placa de ateroma;
- reestenose carotídea com sintomas neurológicos ipsilaterais ou estenose acima de 80% ou acima de 70% com oclusão contralateral;
- estenose acima de 50% com oclusão contralateral.

Pacientes assintomáticos:

- estenose acima de 75%;
- estenose acima de 50% com lesão ulcerada complexa.

Indivíduos com lesões em artérias carótidas, assintomáticos, apresentam risco anual de AVC de 5% e naqueles com lesões sintomáticas o risco é de 10% em comparação com o risco de 1 a 2% de AVC no pós-operatório de cirurgia de carótida por ano (74).

O envolvimento carotídeo isolado e unilateral representa a lesão patológica ideal para a intervenção cirúrgica. Sendo a doença aterosclerose generalizada, os vasos pares têm, geralmente, um envolvimento simultâneo, embora a extensão

deste comprometimento possa ser desigual. A estenose de carótida, mais oclusão contralateral com indicação cirúrgica, tem um risco maior de intolerância ao pinçamento e cria um risco maior de AVC perioperatório (103, 104). A oclusão da artéria carótida interna pode ocorrer como uma lesão isolada em associação com placas situadas na bifurcação ou pode fazer parte de uma trombose extensa das artérias carótida comum e interna (105).

O princípio básico da endarterectomia da artéria carótida é a remoção em bloco da camada íntima afetada pelo ateroma e de parte da camada média, aproveitando-se o plano de clivagem intraparietal (106). A cirurgia é realizada por um acesso cervical, dissecação das artérias carótidas comum, interna e externa, pinçamento destas, arteriotomia e remoção da placa. O fechamento pode ser realizado mediante sutura primária ou pela colocação de um remendo (*patch*) para se evitar estenose. A derivação temporária (*shunt*) pode ser utilizada para evitar a interrupção prolongada do fluxo sanguíneo por essas artérias (106).

Associação Americana de Cardiologia (AHA) recomenda que a taxa de morbidade e de mortalidade em qualquer procedimento cirúrgico para estenose de carótida não ultrapasse 3% em pacientes assintomáticos e 6% nos sintomáticos (16).

1.2.2 Doença Obstrutiva Severa das Artérias Carótidas - DOSAC

Quando o estreitamento compromete mais de 50% do lúmen da artéria, ele passa a ter importância hemodinâmica quanto ao fluxo cerebral, acima de 70% passa a ser considerado lesão crítica para o desenvolvimento de isquemia cerebral. Nessa situação pode ocorrer trombose arterial aguda, seguida de trombose secundária, de extensão variável (74).

Muitos AVCs acontecem sem sintomas de alerta e quando ocorrem, às vezes, é impossível reverter completamente a isquemia e obter a recuperação integral (107). É fundamental detectar quais pacientes estão em risco de AVC para que ele possa ser evitado. Tem-se demonstrado claramente, através de ensaios clínicos multicêntricos de endarterectomia carotídea, que o AVC pode ser evitado em pacientes sintomáticos com estenose carotídea grave (95, 97).

Como a placa carotídea é, às vezes, a conseqüência de um processo que pode evoluir rapidamente e o AVC freqüentemente ocorre sem aviso prévio, deve-se concluir que uma redução de 50-70% do diâmetro (75% da área) determinada por uma placa na presença de sintomas característicos de ataques isquêmicos transitórios, sem nenhuma outra fonte de microembolia, constitui uma indicação para tratamento cirúrgico. Além disso, quando houver tal grau de estenose, mesmo na ausência de sintomas, o tratamento cirúrgico tem apoio de estudos clínicos randomizados (98, 99) e trabalhos não-randomizados (108, 109) que dão respaldo ao conceito de que a determinação precisa da natureza do processo patológico da bifurcação carotídea é fator de risco determinante para a necessidade de cirurgia na prevenção do AVC (110-112).

1.2.3 Fatores de Risco

Todos os fatores de risco para aterosclerose, assim como suas conseqüências, são mais prevalentes conforme se avança nos grupos etários.

Os fatores de risco para a DOSAC devido a ATC são semelhantes àqueles de outros leitos vasculares e incluem: idade, sexo, raça, diabete mellitus (DM), tabagismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e hipercolesterolemia (113).

Idade

As doenças degenerativas são processos que necessitam de tempo para se instalarem; assim, o raciocínio clínico deve ser o de que as pessoas com mais idade apresentam, com maior frequência, os sinais e sintomas de aterosclerose, portanto a incidência de DOSAC não foge à regra, aumentando com a idade. Nesse caso, com o aumento da expectativa de vida, espera-se que a DOSAC se torne mais freqüente. Para homens acima dos 50 anos a prevalência aumenta e evolução similar é vista também em mulheres (113).

Sexo

O processo de aterosclerose e DOAC aparecem com mais freqüência entre os homens em idade mais precoce do que nas mulheres que estão com atividade ovárica plena, isto é, ainda estão apresentando períodos menstruais. A partir do climatério a estatística se iguala entre os dois sexos. Isso se deve porque o colesterol é utilizado pelo organismo da mulher para a produção do hormônio estrogênico; assim, a hipercolesterolemia, na maioria das mulheres, só atinge nível aterogênico após o climatério. A prevalência de DOSAC em homens acima de 50 anos é o dobro do que nas mulheres. Após 70 anos, a freqüência se torna semelhante em homens e mulheres (113).

Raça

Achados da literatura, estudos que relacionam doenças com fatores raciais, demonstram que a raça negra é levemente mais propensa a episódios de AVC isquêmico do que a caucasóide, assim como evidências epidemiológicas revelam que a HAS, fator de risco importante na doença cardiovascular, também é mais encontrada na população negra (114-116).

Hipercolesterolemia

Existe grande evidência epidemiológica e de estudos intervencionistas que demonstram a importância do alto nível de colesterol na formação de placas ateroscleróticas. Das lipoproteínas pesquisadas (VLDL, LDL e HDL) a LDL é a que contém a maior concentração de colesterol (60-70% do colesterol sérico total) (117).

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Deve ser enfatizado que a hipertensão, por si só, não é aterogênica. Em estudos utilizando animais de laboratório com níveis normais de colesterol a hipertensão não induziu aterosclerose (118). Entretanto tem sido demonstrado que a hipertensão ou hipertensão relativa podem acelerar o processo aterosclerótico. Por exemplo, as veias não sofrem processo aterosclerótico a não ser quando submetidas a pressões como no caso do seu uso como enxerto autólogo em revascularizações arteriais. Similarmente vasos pulmonares que normalmente trabalham sob baixa pressão e ambiente de baixa resistência raramente exibem alterações ateroscleróticas. Esses achados mudam na presença de hipertensão pulmonar (119).

A hipertensão pode promover a aterogênese por um efeito direto na arquitetura vascular. Artérias expostas à hipertensão aumentam a permeabilidade vascular, permitem a migração das macromoléculas, incluindo as lipoproteínas, na camada íntima. Já as células musculares lisas residem no subendotélio arterial e não são expostas a ponto de estresse devido a sua localização medial na parede arterial. Entretanto as CML são afetadas por estresse cíclico causado pela distensão pulsátil do vaso ocasionada pela pressão do sangue. A pressão transferida aumenta conforme aumenta a pressão sanguínea. Essa pressão aumentada induz a alterações na forma, orientação, proliferação e secreção de substâncias da matriz extracelular das células musculares lisas que contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose (120).

Diabete mellitus

A diabete mellitus também pode promover a aterosclerose como evidencia o fato de 75% das hospitalizações de diabéticos estarem relacionadas a complicações cardiovasculares. Pacientes diabéticos apresentam alterações significativas no seu perfil lipídico e a hipertensão é duas vezes mais prevalente nesses pacientes do que na população em geral. Há consenso de que a aterosclerose é mais acelerada e difusa em diabéticos e que o mecanismo responsável é multifatorial (121).

Observação interessante é a de que pacientes com níveis elevados de glicose, mas não-diabéticos, mantêm o risco elevado de desenvolver aterosclerose (122).

A glicosilação não-enzimática da LDL é estimulada por diabetes. Essa glicosilação parece alterar a ligação da LDL ao seu receptor resultando em

hiperlipidemia. Tem sido demonstrado que a LDL glicosilada aumenta a formação de células espumosas encontradas na fase inicial da aterosclerose. Alguns dados demonstram que mecanismos imunes também têm papel importante no desenvolvimento de aterosclerose em paciente diabético. Lipoproteínas modificadas dão início à formação de auto-anticorpos que interagem com LDL oxidado e, esses complexos, englobados pelos macrófagos, estimulam a liberação de citocinas e fatores de crescimento que levarão à progressão da formação da placa (123).

Além de afetar as células musculares lisas, a hiperglicemia afeta também os componentes da matriz extracelular. Em pacientes com diabetes, a membrana basal, normalmente uma estrutura amorfa, composta de colágeno tipo IV, glicoproteínas e proteoglicanos está espessada, podendo atingir a estabilidade da parede do vaso (123).

Tabagismo

O tabagismo tem sido associado ao aumento da incidência de infarto agudo do miocárdio, morte súbita e acidente vascular encefálico. Existem claras evidências entre o hábito de fumar e as doenças arteriais, parecendo que o tempo de duração do hábito, o tipo de fumo e a quantidade diária têm certa relação. A fumaça do cigarro contém mais de 4.000 compostos. Desses, a nicotina, os hidrocarbonetos aromáticos, os ésteres, os aldeídos, as nitrilas, os éteres cíclicos e os compostos sulfurados são os mais importantes. A nicotina promove hiperlipidemia através da estimulação da lipólise, aumenta o LDL e diminui o HDL, promove um aumento do tônus vascular, submetendo o vaso, algumas vezes, a um maior estresse pela distensão cíclica elevada de suas paredes, causa edema

nas células endoteliais, afeta as células musculares lisas, convertendo-as de um fenótipo contrátil em um fenótipo sintético (124).

Os gases oxidantes da fumaça do cigarro resultam em altos níveis de LDL oxidado, o que confere um risco aumentado de aterosclerose observado nos pacientes tabagistas. O dano endotelial secundário ao tabagismo tem sido bem documentado (124).

Recentemente, foi demonstrado que o fumo pode exercer atividade acumulativa e irreversível sobre as artérias, pela medida do espessamento das paredes da artéria carótida. Num período de três anos, foi mostrado que, no fumante atual, ocorria um aumento de 50% na progressão da aterosclerose, sendo de 25% nos ex-fumantes e de 20% em fumantes passivos em relação ao não-fumante (124, 125).

Outros efeitos do cigarro que elevam a aterosclerose incluem aumento dos níveis de fibrinogênio, aumento da atividade plaquetária e aumento da viscosidade sangüínea (125).

1.2.4 História Natural

Apesar de ter sido observado um decréscimo de mortes nas últimas décadas, a doença vascular carotídea continua sendo uma das causas mais importantes de incapacidade entre indivíduos, principalmente entre os idosos. Aproximadamente um quinto dos pacientes que apresentaram quadro de isquemia cerebral apresentou um segundo evento e 7% apresentaram um terceiro acidente, o que contribui para aumentar o grau de incapacidade funcional desses pacientes (89). Dentre as causas de isquemia cerebral, o infarto cerebral aterotrombótico representa a causa mais importante com cerca de 44%, o

embolismo cerebral com aproximadamente 20%, o ataque isquêmico cerebral em torno de 22%, a hemorragia subaracnóidea em torno de 7%, a hemorragia intracerebral, 5% e outras causas, 2% (126).

Estima-se que 75% dos pacientes com manifestações clínicas de isquemia cerebral ou infarto têm, pelo menos, uma lesão obstrutiva acessível à cirurgia e em mais de 50% a doença encontra-se limitada apenas às artérias extracranianas. A característica segmentar dessas lesões torna possível a cirurgia com êxito na maioria das vezes (126).

A endarterectomia é a técnica considerada hoje o “padrão ouro” no tratamento da doença aterosclerótica das carótidas. Sua eficácia por longo prazo, na prevenção do AVC e sua baixa morbimortalidade perioperatória, foram demonstradas por estudos multicêntricos e grandes séries cirúrgicas publicadas. O desenvolvimento da técnica operatória e anestésica, o aperfeiçoamento dos métodos de proteção cerebral e a definição precisa das indicações cirúrgicas permitiram que se alcançassem baixos índices de complicações, mesmo em pacientes considerados de alto risco - critérios de exclusão do *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial* - NASCET e do *Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study* - ACAS (95, 98).

1.2.5 Diagnóstico Diferencial

A aterosclerose é um processo patológico que afeta, predominantemente, a circulação arterial extracraniana, onde a atenção clínica está focalizada na relação entre a estenose da artéria carótida interna e o acidente vascular cerebral (AVC). Uma variedade de outras patologias, no entanto, também pode acometer a circulação cerebral extracraniana. Os processos não-ateroscleróticos que

envolvem alterações da parede arterial, incluem várias formas de inflamação, vasculites, anormalidades da arquitetura como alongamentos e tortuosidades da artéria carótida, defeitos estruturais na parede arterial que englobam degeneração aneurismática e dissecação espontânea, displasia fibromuscular, os efeitos de uma patologia adjacente, tais como tumor do corpo carotídeo e respostas à manipulação dos vasos carotídeos, incluindo a doença da artéria carótida, induzida pela irradiação, e a reestenose por hiperplasia miointimal, após endarterectomia carotídea (74, 76).

1.2.6 Angioressonância Nuclear Magnética (ARM)

A angiografia por ressonância nuclear magnética (angiorressonância magnética - ARM) é uma técnica não-invasiva que apresenta imagens do fluxo sanguíneo sem a utilização de contrastes nefrotóxicos. É um método custo-efetivo na avaliação pré-operatória das artérias carótidas, aorta abdominal e torácica, circulação periférica e pélvica, bem como da anatomia venosa (127). Além disso, esta tecnologia não-invasiva, em constante evolução, proporciona uma visão privilegiada das relações espaciais circunjacentes aos vasos como, por exemplo, informações a respeito da morfologia da placa, da anatomia vascular anômala e do tecido parenquimatoso adjacente (127).

Embora a arteriografia carotídea seja aceita como método de referência nos exames por imagem das artérias carótidas, estudos recentes sugerem que as técnicas de imagem não-invasivas podem apresentar maior sensibilidade, melhor relação custo-benefício e maior segurança em relação à arteriografia convencional (128). Comparações prospectivas da ARM com a arteriografia carotídea demonstram uma sensibilidade e especificidade média para estenoses

críticas de 93% e 88%, respectivamente (129). Também é interessante observar que quando se compararam os resultados da arteriografia carotídea, da ultrassonografia com doppler e mapeamento de fluxo colorido e da ARM com os achados nas peças cirúrgicas, os dois últimos métodos apresentaram uma melhor correlação do que a arteriografia convencional. A ultrassonografia com doppler e mapeamento de fluxo colorido e a ARM são suficientes para o planejamento da endarterectomia carotídea. Pelo fato da arteriografia carotídea associar-se a desfechos significativos de AVC, muitos cirurgiões vasculares a utilizam somente quando há discordância de resultados entre a ultrassonografia com doppler e mapeamento de fluxo colorido e ARM ou resultados não conclusivos destes dois métodos (130).

1.3 Anticorpos Antifosfolípides

Os anticorpos antifosfolípides (AAF) constituem um grupo de auto-anticorpos de grande complexidade e heterogeneidade. Os alvos antigênicos destes anticorpos são fosfolípides (FL) e co-fatores fosfolipídicos da cascata da coagulação e de membranas celulares, principalmente as de plaquetas e de CE (131).

Os AAF clássicos, anticorpos anticardiolipina (aCL) e anticoagulante lúpico (AL) estão, comprovadamente, associados a infecções, neoplasias, uso de drogas e a uma diátese trombótica conhecida como síndrome antifosfolipídica (SAF) (132).

Os anticorpos antifosfolípides são encontrados em 1% a 5% dos indivíduos jovens, hígidos, sem terem tido nenhum episódio trombótico prévio. Essa prevalência aumenta com a idade e com as doenças crônicas. Em pacientes com

lupus eritematoso sistêmico (LES) a presença desses anticorpos varia de 10% a 30% para anticardiolipina e 15% a 34% para anticoagulante lúpico. No entanto a presença desses anticorpos aumenta em cinco vezes o risco de trombose. (133).

Apesar de não sabermos ao certo como ocorre o mecanismo trombótico, várias hipóteses têm sido postuladas.

A primeira implica a ativação da célula endotelial pela regulação na expressão de moléculas de adesão, secreção de citocinas e metabolismo das prostaglandinas. Os anticorpos antifosfolípidos reconhecem beta2-gpl ligadas à célula endotelial (134).

O segundo mecanismo se baseia na mediação da lesão endotelial pelo estresse oxidativo. Sabe-se que anticorpos anticardiolipina têm reação cruzada com o LDL oxidado e esta é a alteração inicial para a formação da placa de ateroma. Anticorpos antifosfolípidos podem estar presentes em associação a auto-anticorpos para oxidar o LDL. Os AAF podem se acoplar a LDL oxidada, possivelmente contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose (135).

O terceiro mecanismo sugere a interferência dos anticorpos antifosfolípidos com a função de proteínas que se ligam aos fosfolípidos diretamente ativos na cascata da coagulação (136).

1.4 Síndrome Antifosfolipídica (SAF)

Em reunião de consenso ocorrida em 1999, os critérios para o diagnóstico de SAF foram criticamente revisados. Definiu-se que trombozes arteriais/venosas e morbidade gestacional compõem os achados clínicos fundamentais da doença. Os critérios laboratoriais incluem um teste positivo para aCL IgG/IgM em níveis

moderados ou altos ou presença de AL. Um segundo teste positivo em um prazo mínimo de 6 semanas é mandatório (137).

A SAF, nos dias de hoje, é considerada a diátese trombótica adquirida mais comum do adulto jovem. Pode ser classificada como primária ou secundária. Na forma primária, definida em 1989, os eventos trombóticos não se acompanham de qualquer outra entidade auto-imune. A SAF secundária, menos freqüente do que a forma primária, ocorre paralelamente a situações como: LES, síndrome lúpica incompleta, outras doenças do tecido conjuntivo, a púrpura trombocitopênica, uso de drogas (como procainamida, clorpromazina e anticoncepcionais orais), neoplasias e infecções (como síndrome da imunodeficiência adquirida, sífilis e hanseníase) (131, 132, 138).

Em pacientes com SAF primária predominam trombooses venosas profundas (TVPs) de membros inferiores (54%), oclusões arteriais (44% principalmente em artérias cerebrais) e abortamentos recorrentes (34%). A circulação coronariana é menos afetada do que a cerebral e a placentária (139). A princípio os fenômenos trombóticos atingem tanto vasos arteriais quanto venosos de tamanhos variados. Artérias periféricas e a circulação de supra-renais e também do sistema portal podem ser afetados na doença (140).

Em termos gerais, o isotipo IgG aCL é mais preditivo para eventos trombóticos da SAF do que o isotipo IgM (141). Quanto maior o nível sérico de IgG aCL (em particular o IgG2) maior a probabilidade de trombofilia (142).

A despeito de ter sido reportado concomitantemente ao teste para IgG/IgM aCL, o ensaio para detecção de IgA aCL ainda não foi internacionalmente padronizado. Por conseqüência a positividade para IgA aCL não constitui critério laboratorial para SAF de acordo com o consenso de 1999. Os ensaios

enzimáticos para anticorpos antibeta2-gpl ainda carecem de padronização e não fazem parte dos critérios clássicos para diagnóstico de SAF (137).

1.5 Beta2-Glicoproteína I

A beta2-gpl é uma glicoproteína plasmática muito estudada em anos recentes nas áreas de ATC, coagulação e SAF. A beta2-gpl é um anticoagulante natural de 50 quilodaltons (kDa) altamente glicosilado e é sintetizada principalmente no fígado. A codificação ocorre no cromossomo 17. Digno de nota, o mRNA, na sua codificação, já foi encontrado nas CE, células placentárias, neurônios, astrócitos e MNC (143-145).

O corrente interesse pelo estudo de anticorpos antibeta2-gpl decorre das seguintes informações:

- ✓ beta2-gpl se liga a LDL e a FL de carga negativa (146);
- ✓ beta2-gpl é alvo de aCL (147);
- ✓ o uso de beta2-gpl como imunógeno em modelos animais gera aCL, anticorpos antibeta2-gpl e SAF (148);
- ✓ os anticorpos contra beta2-gpl reconhecem o alvo em superfícies celulares quando a glicoproteína está acoplada à FL ou à LDLox (149);
- ✓ nas CE a beta2-gpl induz a expressão de fator tecidual, ICAM 1 e VCAM 1 (150);
- ✓ a interação da beta2-gpl com FL aniônicos aumenta cerca de 100 vezes na presença de anticorpos antibeta2-gpl (143);
- ✓ é possível que os AAF estejam direcionados primordialmente contra a porção beta2-gpl do complexo FL-beta2-gpl (151);

- ✓ existem evidências indicando a beta2-gpl como antígeno principal para AAF detectados em pacientes com SAF (152);
- ✓ os AAF do soro de pacientes com SAF reconhecem uma estrutura alterada da beta2-gpl que interage com FL de carga negativa em ensaios de fase sólida (153).

De acordo com Subang *et al.*, a interação da CL com beta2-gpl acarreta modificações estruturais na última, fazendo com que epitopos altamente antigênicos sejam expostos. A presença de ácidos graxos insaturados parece essencial no processo de interação entre as duas moléculas, dado que sugere a importância da oxidação neste contexto (154).

A beta2-gpl parece inativar o complexo ativador da protrombina ao interagir com FL de carga negativa, possivelmente na superfície plaquetária. Os efeitos da beta2-gpl sobre a cascata da coagulação são aparentemente desregulados por AAF, o que resultaria em trombozes a partir de agregação plaquetária e inibição da fibrinólise (155).

Anticorpos antibeta2-gpl aumentam a afinidade da beta2-gpl por FL de carga negativa. Os complexos anticorpo-cofator competem com fatores da coagulação pela ligação com FL (156).

De acordo com os achados de Hanly & Smith, AAF podem acelerar ou inibir a formação de trombina. Uma vez que beta2-gpl inibe a conversão da protrombina em trombina, anticorpos antibeta2-gpl seriam providos de efeitos coagulantes na SAF. Os mesmos autores sugeriram que anticorpos antibeta2-gpl inibem a ligação da anexina V (um anticoagulante natural) às superfícies fosfolipídicas pró-coagulantes, o que também poderia gerar trombozes (157).

Conti *et al.* demonstraram que os monócitos são capazes de sintetizar e expressar beta2-gpl em sua superfície e que esta expressão se encontra aumentada em pacientes com SAF e LES. A hiperexpressão de beta2-gpl em monócitos leva a uma persistente exposição de fator tecidual na superfície destas células, o que poderia levar à trombogênese (144).

Os anticorpos antibeta2-gpl interagem com plaquetas que passam a expor o antígeno fosfatidilserina (alvo de AAF) em sua superfície. Ao interferir com o ciclo celular, os anticorpos, paralelamente, facilitariam a fagocitose de plaquetas (158).

Anticorpos antibeta2-gpl purificados, obtidos de pacientes com SAF, parecem se ligar a células endoteliais e promover síntese de adesinas pelas mesmas; o achado, em última análise, significa que os anticorpos podem causar ativação do endotélio (159).

Na placa aterosclerótica a beta2-gpl se liga diretamente a LDLox formando o complexo LDLox/beta2-gpl que, subseqüentemente, é reconhecido por um anticorpo (antiLDLox/beta2-gpl). Formam-se complexos estáveis entre LDLox e beta2-gpl devido a ligações eletrostáticas promovidas pelos ligantes oxLig1 e oxLig2 (160).

O complexo LDLox/beta2-gpl é dependente do respectivo anticorpo para que possa ser fagocitado por macrófagos (149). A ligação do antiLDLox/beta2-gpl com macrófagos ocorre através do receptor para porção Fc da IgG. A captação de imunocomplexos contendo LDLox, através de receptores Fc gama tipo 1, transforma macrófagos em células espumosas e acelera o processo aterosclerótico. É interessante que os auto-anticorpos contra o complexo

LDLox/beta2-gpl estão associados com trombose arterial, mas não venosa, na SAF (160).

Desta forma, a resposta imune contra o complexo LDLox/beta2-gpl pode estar envolvida nos mecanismos de desenvolvimento da aterosclerose (149).

A beta2-gpl é abundantemente encontrada na região subendotelial e na borda medial da íntima arterial e se co-localiza com linfócitos e células mononucleares nas placas ateroscleróticas humanas (160). A contigüidade com linfócitos CD4 positivos sugere que a beta2-gpl pode ser alvo de auto-imunidade no ateroma (161).

A indução de aterosclerose em camundongos deficientes em receptores de LDL, após imunização com beta2-gpl, foi recentemente demonstrada. Todos os animais imunizados desenvolveram altos títulos de anticorpos antibeta2-gpl (162).

De acordo com Afek *et al.*, camundongos deficientes em apolipoproteína E tiveram processo aterosclerótico acelerado após imunização com beta2-gpl. O efeito pró-aterogênico da imunização com beta2-gpl manteve-se independente de hipercolesterolemia (163).

Hasunuma *et al.* verificaram que a ligação da LDLox com macrófagos era inibida quando se adicionava um competidor para o receptor lixeiro (ácido poliinosínico). Esta ligação se intensificava quando se adicionavam anticorpos antibeta2-gpl ou anticorpos aCL. Os dados sugerem que a beta2-gpl funciona como proteína antiaterogênica e que a resposta auto-imune contra beta2-gpl pode influir no deflagramento da ATC (153).

1.6 Proteínas de Choque Térmico

A resposta celular ao choque térmico é conhecida há cerca de 30 anos. Atualmente, esta resposta é associada a uma síntese abrupta de moléculas

conhecidas como proteínas de estresse (*heat-shock proteins-Hsp*). As Hsp estão entre as mais abundantes proteínas na natureza, sendo sintetizadas por inúmeras espécies (164).

Vários agentes, ao gerarem estresse celular, podem induzir a síntese de Hsp. Além do choque térmico propriamente dito, a exposição das células a metais pesados, a agentes oxidantes, a etanol e a infecções pode deflagrar a síntese de Hsp (165).

Após indução destas proteínas, a célula se torna tolerante a agressões posteriores. Desta forma, a ação de Hsp, altamente conservada no decorrer da evolução das espécies, é protetora e adaptativa no microambiente celular (165).

As Hsp são correntemente agrupadas em famílias de acordo com o peso molecular (166). As funções das Hsp em termos moleculares incluem (cada uma exerce uma larga variedade de funções fisiológicas) (167):

- ✓ modulação da resposta de receptores protéicos; transdução de sinais; participação no ciclo e proliferação celular (Hsp 90 e Hsp 70);
- ✓ transporte intracelular e translocação de peptídeos agindo como chaperones; previne agregação de proteínas desnaturadas (*in vitro*) (Hsp 60);
- ✓ formatação de proteínas nascentes (Hsp 60 e Hsp 70);
- ✓ facilitam a degradação de proteínas agindo como co-fator no sistema proteolítico (Hsp 60);
- ✓ auto-regulação da resposta ao choque térmico; potencial função de molécula apresentadora de antígenos em células tumorais (Hsp 70);

- ✓ suprimem a agregação e inativação de proteínas com o calor (*in vitro*); conferem termotolerância através da estabilização de microfilamentos (pequenas Hsp);
- ✓ atividade antiapoptótica (pequenas Hsp e Hsp 70).

Na aterosclerose, a infiltração da parede arterial por macrófagos e células musculares lisas se acompanha da placa ateromatosa, cujo centro necrótico é circundado por deposição de colesterol que, em circunstâncias evolutivas, levam a ulceração ou calcificação (6).

Células endoteliais produzem Hsp 60 e moléculas de adesão em grande quantidade quando expostas a fatores de risco como HAS e hipercolesterolemia. Reações auto-imunes contra Hsp 60 humana potencialmente lesam o endotélio e contribuem para o desencadeamento do processo aterosclerótico (6, 168).

Investigações em coelhos e humanos evidenciaram a presença, na camada íntima arterial, de células T capazes de reagir contra Hsp 60/65 kDa. Anticorpos anti-Hsp 60/65 foram observados no soro de pacientes com aterosclerose. Estas alterações precoces no processo aterosclerótico são potencialmente reversíveis desde que os fatores de risco paralelos sejam removidos (169).

A hipótese imunológica para a aterogênese se fundamenta na existência de reações humorais e celulares contra Hsp 65 bacterianas. Dada a homologia molecular de 60% entre Hsp 65 bacteriana e Hsp humana endotelial (5), reações cruzadas podem ocorrer no endotélio (168, 169).

Os dados envolvendo a participação das Hsp como potenciais auto-antígenos na placa aterosclerótica são mais consistentes na família Hsp 60. A família Hsp 60 compreende: hHsp 60 (mamíferos), cHsp 60 (*Chlamydia*

pneumoniae) mHsp 65 (micobactéria) e GroEL (Escherichia coli) (170). Os membros da família Hsp 60 são filogeneticamente conservados desde as bactérias até os humanos. Desta forma, anticorpos contra Hsp de bactérias podem atuar contra Hsp 60 humanas através de reatividade cruzada (171).

Em particular, as Hsp de 60 e 65 kDa são altamente imunogênicas. Infecções bacterianas levam a reações humorais e celulares por parte do hospedeiro. As Hsp micobacteriana de 65 kDa e a Hsp humana de 60 kDa exibem homologia molecular de 60%. Assim sendo, uma resposta imune contra Hsp 65 bacteriana pode levar à auto-imunidade devido a reações cruzadas contra Hsp humana de 60 kDa (172).

A hipótese de mímica molecular entre Hsp de bactérias (Escherichia coli e Chlamydia pneumoniae) e Hsp humanas foi testada por Mayr *et al.* Anticorpos anti-Hsp 60/65 de pacientes ateroscleróticos reagiram cruzadamente com Hsp 60 humana, Hsp 60 de Chlamydia pneumoniae e Hsp 60 de Escherichia coli. Os achados sugerem que reações humorais contra Hsp bacterianas podem levar à injúria vascular aterosclerótica por meio de mimetismo molecular (173).

Lesões ateroscleróticas podem ser induzidas em coelhos normocolesterolêmicos imunizados com Hsp 65. Reconhecidamente, Hsp de 65 kDa é expressa em altas concentrações na placa aterosclerótica (174). De interesse, a terapêutica imunossupressora, por meio de anticorpos monoclonais antiCD3, e a prednisolona bloquearam o aparecimento de ateromas nestes animais (175).

O papel dos anticorpos anti-Hsp na aterosclerose pode não ser apenas de auxílio diagnóstico. Eventualmente, poderiam ser patogênicos. Em laboratório,

causam lise de células endoteliais ativadas (análogas às expostas a fatores de risco como HAS), mas não daquelas em repouso (176).

A aterosclerose, desta forma, deve ser analisada em contexto multifatorial. A presença de fatores de risco como HAS e hipercolesterolemia levam a dano endotelial manifesto por síntese de Hsp 60. Os fenômenos auto-ímmunes direcionados contra Hsp 60/65 aqui descritos podem culminar na formação de ateromas (168, 175).

A LDLox é a chave inicial no desenvolvimento da ATC, mas os mecanismos não são claros. Frostegard *et al.* reportaram expressão aumentada de Hsp 60 em MNC expostos a LDLox. A IL-1 beta exerceu efeito semelhante sobre a expressão da Hsp 60. Estes resultados indicam que a expressão de Hsp 60 por MNC na parede vascular pode ser aumentada pela LDLox. É possível que o processo inflamatório crônico que caracteriza a ATC seja perpetuado por células T auto-reativas que reconheçam Hsp 60 (177).

A relação de anticorpos anti-Hsp 60/65 kDa com aterosclerose é intrigante. Mayr *et al.* estudaram, em pacientes com doença aterosclerótica, a possibilidade da existência de mímica molecular entre Hsp de bactérias (*Escherichia coli* e *Chlamydia pneumoniae*) e Hsp humana. Anticorpos contra Hsp 60/65 reagiram cruzadamente com Hsp 60 humana, Hsp 60 de *Chlamydia pneumoniae* e Hsp 60 de *Escherichia coli*. Além disso, anticorpos contra Hsp se correlacionaram à presença de anticorpos contra *Chlamydia pneumoniae* e exibiram citotoxicidade contra células endoteliais humanas. Os achados sugerem que a reação humoral contra Hsp bacterianas pode levar à injúria vascular aterosclerótica através de mimetismo molecular (173).

Shett *et al.* imunizaram 120 coelhos com vários antígenos com e sem adjuvantes. Alguns grupos receberam dieta rica em colesterol. Após seis semanas, verificaram que apenas o grupo imunizado com Hsp 65 apresentou lesão aterosclerótica na íntima do arco aórtico: seu colesterol sérico era normal. O estudo imunohistopatológico revelou que as lesões continham 20% de LT, 10 a 30% de MCF e 10 a 40% de CML. As lesões estavam correlacionadas positivamente com a presença, no sangue periférico, de LT reativos para Hsp 65, sugerindo que a Hsp 65 está envolvida na indução das lesões de ATC. A combinação de imunização com Hsp e dieta rica em colesterol provocou o aparecimento de lesões mais severas de ATC com aparecimento de células espumosas. Os autores concluem que uma resposta auto-imune contra Hsp pode deflagrar ATC e que o nível alto de colesterol é um fator de risco importante (176).

Zhu *et al.*, por sua vez, avaliaram a possibilidade de anticorpos contra Hsp 60 humana funcionarem como fatores de risco para aterosclerose coronariana. Dos 391 pacientes submetidos à coronariografia 75% apresentaram teste positivo para IgG anti-Hsp 60. A presença do anticorpo esteve também associada à severidade da doença: títulos altos se relacionaram à doença em maior número de vasos. A associação se confirmou após ajuste para fatores de risco (178).

1.7 Anticorpos AntiLDL Oxidado

A oxidação da LDL causa extensa degradação e fragmentação da partícula, o que modifica suas características estruturais e suas propriedades físico-químicas. *In vivo*, a oxidação ocorre por ação de proteases presentes na circulação e/ou ligadas às células e tecidos (179). A formação de neo-epitopos é múltipla e heterogênea. Uma grande variedade de anticorpos pode se

desenvolver contra esses epitopos. Neo-epitopos imunogênicos podem gerar-se também nas moléculas de fosfolipídios devido a sua degradação por lipólise (180). Além disso, placas ateroscleróticas são ricas em beta2-glicoproteína I. Esta molécula liga-se a LDLox por forte atração iônica determinando a formação de complexos intermediários circulantes, anticorpos específicos e imunocomplexos altamente associados à trombose arterial (181).

AntiLDLox estão presentes na circulação e na placa de indivíduos com aterosclerose (182, 183) e diversas evidências correlacionam a presença desses anticorpos com as manifestações clínicas da doença. Recentemente, pesquisadores do Laboratório de Imunorreumatologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul descreveram a associação de auto-anticorpos IgA contra beta2-glicoproteína I em pacientes com acidente vascular encefálico (184), na fase aguda do IAM (185) e na doença arterial periférica (186).

Estima-se que os níveis de anticorpos contra LDLox possam ser uma maneira indireta de medir a formação da LDLox *in vivo* e que, por isso, possam estar relacionados com o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose. Resultados de pesquisas que atribuem ao antiLDLox um papel pró-aterogênico constataam que a elevação dos níveis de antiLDLox associa-se à progressão de aterosclerose carotídea (187), à incidência e mortalidade por IAM (188) e à presença e severidade da DAC (189).

1.8 Justificativas do Estudo

São escassos os relatos acerca de AAF/anticorpos anti-Hsp em pacientes com DOSAC e o papel etiopatogênico destes anticorpos na DOSAC é incerto. O número de estudos controlados é limitado.

Além disso, pode-se arrolar as seguintes justificativas para este estudo:

- a) a DOSAC é uma doença prevalente e associada à morbidade significativa. A pesquisa de causas imunológicas que possam estar envolvidas a esta situação clínica, incluindo-se AAF e anti-Hsp, é relevante nessas circunstâncias;
- b) a frequência de IgG, IgM e IgA aCL em pacientes com DOSAC é motivo de discussão, porque em nosso meio não há dados definidos a respeito;
- c) a pesquisa de anticorpos IgG, IgM e IgA antibeta2-gpl em DOSAC pode trazer novos subsídios para a compreensão do papel da auto-imunidade nesta afecção;
- d) o papel dos anticorpos anti-Hsp 60 e anti-Hsp 65 é motivo de debate em pacientes com DOSAC;
- e) a presença dos AAF nos paciente com DOSAC pode trazer benefícios práticos para diagnóstico, tratamento e prognóstico;
- f) o desenvolvimento de métodos sorológicos capazes de funcionar como marcadores do processo aterosclerótico poderá ser de valia em termos diagnósticos e terapêuticos.

2 HIPÓTESES

2.1 Hipótese Conceitual

A presença de anticorpos contra cardiolipina, beta2-gpl e Hsp 60/65 kDa se associa a risco aumentado de DOSAC.

2.2 Hipótese Operacional

A presença de anticorpos contra cardiolipina, beta2-gpl e Hsp 60/65 kDa não se associa a risco aumentado de DOSAC.

3 OBJETIVO

Verificar se anticorpos contra cardiolipina, beta2-gpl e Hsp 60/65 kDa se associam à presença de DOSAC.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Delineamento do Estudo

- ✓ Estudo de caso-controle.
- ✓ Fator de exposição: aCL, antibeta2-gpl e anti-Hsp.
- ✓ Desfecho: DOSAC com indicação de endarterectomia de carótida.

4.2 Amostras Envolvidas no Estudo

Casos

- ✓ Os casos foram definidos como pacientes que preenchiam os critérios de inclusão e de exclusão, internados no Hospital São Lucas da PUC, com DOSAC.

Controles

- ✓ Os controles foram definidos como pacientes que atendiam aos critérios de inclusão e de exclusão, internados em enfermaria de ortopedia do Hospital São Lucas da PUC e Hospital Independência da Ulbra, sem DOSAC.

4.3 Definições

4.3.1 DOSAC

O diagnóstico de DOSAC foi realizado por neurologista e cirurgião vascular habilitados. A confirmação do diagnóstico foi por ARM, realizada e analisada por dois radiologistas experientes que quantificaram os percentuais de estenose de artérias carótidas utilizando os critérios do NASCET (95).

4.3.2 Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)

Considerou-se portador de hipertensão arterial o paciente com história de doença e/ou em uso de fármacos anti-hipertensivos; pacientes sem tratamento, mas portadores de HAS, tendo o diagnóstico confirmado através da média de duas ou mais medidas de pressão sistólica e diastólica superiores a, respectivamente, 140 mm Hg e 90 mm de Hg ou histórico compatível com estes critérios (190).

4.3.3 Tabagismo

Para os propósitos do estudo, o conceito de tabagismo obedeceu aos critérios do *Medical Research Council* da Inglaterra, onde são considerados fumantes leves os consumidores de 1 a 10 cigarros/dia; fumantes moderados aqueles que consomem de 11 a 14 cigarros/dia; fumantes pesados os consumidores de mais de 15 cigarros/dia; não fumantes, aqueles que nunca fumaram mais de 1 cigarro/dia no último ano ou aqueles que deixaram de fumar (191).

De forma arbitrária, na casuística, os tabagistas (fumantes de cigarros ou assemelhados) foram estratificados em: fumantes ativos, aqueles indivíduos com hábito de fumar atual e que haviam fumado no último ano; ex-fumantes, indivíduos que haviam abandonado o hábito de fumar há mais de 1 ano.

4.3.4 Diabete Mellitus (DM)

Considerou-se portador de diabete mellitus o paciente com história de alteração metabólica e/ou em uso de terapia hipoglicemiante (dietética, insulino-terapia ou tratamento com fármacos hipoglicemiantes orais). Para estudos epidemiológicos desta natureza, o histórico de DM foi previamente documentado por médico da área clínica; o critério absoluto foi glicemia de jejum de, no mínimo, 126 mg/dl em, pelo menos, duas ocasiões em separado (192).

4.3.5 Hipercolesterolemia

Considerou-se portador de hipercolesterolemia o paciente história de alterações do colesterol sérico e/ou em uso de fármacos hipolipemiantes. O histórico de hipercolesterolemia foi também obtido através de informações com o paciente ou dos níveis de colesterol: colesterol total acima de 200 mg/dl ou colesterol LDL acima de 130 mg/dl ou relação colesterol total/HDL acima de 5 (193).

4.4 Critérios de Inclusão

Foram convidados a participar do estudo indivíduos de ambos os sexos que, na ausência de qualquer critério de exclusão, preencheram os seguintes itens:

- ✓ concordância em participar do estudo;
- ✓ idade a partir de 18 anos;
- ✓ pacientes com DOSAC confirmada por ARM (casos);
- ✓ pacientes sob acompanhamento hospitalar em serviços de ortopedia devido a afecções ortopédicas e sem DOSAC (grupo-controle);
- ✓ assinatura do Termo de Consentimento Informado, Livre e Esclarecido após informação verbal e escrita sobre os propósitos da pesquisa.

4.5 Critérios de Exclusão

Para casos e controles foram considerados inelegíveis:

- ✓ pacientes com válvulas cardíacas protéticas;
- ✓ pacientes com história clínica de endocardite infecciosa;
- ✓ pacientes com história de infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida, *Treponema pallidum* e outras infecções ativas;
- ✓ pacientes com história de neoplasia presente ou passada;
- ✓ pacientes com história de doença do tecido conjuntivo previamente diagnosticado, de acordo com os respectivos critérios clínicos;
- ✓ pacientes com SAF previamente diagnosticada, de acordo com os critérios de 1999 (137);
- ✓ pacientes com histórico de afecções potencialmente causadoras de trombose arterial (homocistinúria, disfibrinemia e hemoglobinúria paroxística noturna);
- ✓ pacientes com história de vasculite;
- ✓ pacientes com história de trombose arterial aguda.

4.5.1 Critérios de Exclusão Somente Para o Grupo-Control

Para o controle foram considerados inelegíveis:

- ✓ pacientes com evidência clínica de DOSAC;
- ✓ pacientes com evidência clínica de osteonecrose (194).

4.6 Casos e Controles

4.6.1 Casos

A população-alvo (casos) consistiu de pacientes (idade mínima 43 anos) com diagnóstico de DOSAC, de acordo com os critérios clínico-cirúrgicos do *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial* (NASCET) (95) e do *European Carotid Surgery Trial* (ECST) (97).

Para inclusão no estudo, os sintomas deveriam justificar a indicação de RNM pelo neurologista e/ou cirurgião vascular.

Os pacientes foram catalogados no estudo entre abril de 2004 e dezembro de 2005, enquanto internados na enfermaria da cirurgia vascular do Hospital São Lucas da PUC. A avaliação dos sinais e sintomas (anamnese e exame físico) foi criteriosamente efetuada por neurologista e cirurgião vascular. A confirmação do diagnóstico de DOSAC foi a ARM.

4.6.2 Controles

O grupo-controle consistiu de pacientes hospitalizados nos serviços de ortopedia do Hospital São Lucas da PUC e Hospital Independência da ULBRA devido a fraturas, distúrbios músculo-ligamentares ou deformidade ortopédicas congênitas.

4.7 Métodos

Laboratorial:

- ✓ dez mililitros de sangue foram obtidos por punção venosa periférica de cada paciente (casos) na sala de cirurgia, imediatamente antes da indução anestésica (no momento de obtenção do acesso venoso) e colocados em tubos de vidro; após centrifugação, o soro foi armazenado a –20 graus Celsius para posterior aferição dos anticorpos.
- ✓ dez mililitros de sangue foram obtidos por punção venosa periférica de cada paciente (controle). O material foi colocado em tubos de vidro; após centrifugação, o soro foi armazenado a – 20 graus Celsius para posterior aferição dos anticorpos.

Aspectos éticos

O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica da FAMED da PUCRS e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da mesma instituição. O trabalho envolveu risco mínimo e os procedimentos estiveram de acordo com orientações nacionais e internacionais para pesquisas envolvendo seres humanos. Cada paciente forneceu, por escrito, o Termo de Consentimento Informado, Livre e Esclarecido de participação no trabalho (seção Anexos: casos - Anexo I e controles-Anexo II), após informação verbal e escrita sobre os propósitos e métodos da pesquisa.

Ficha clínica

Os pacientes com DOSAC, assim como os do grupo-controle, foram submetidos a uma avaliação clínica completa utilizando-se como instrumento os

modelos sistematizados e testados no Serviço de Cirurgia Vasculiar Periférica do Hospital São Lucas da PUC. Esse procedimento permitiu avaliar, em cada paciente, os critérios de inclusão e exclusão, as variáveis demográficas, os fatores de risco cardiovasculares conhecidos, as variáveis prognósticas e as condições clínicas associadas.

As variáveis de interesse foram:

- a. demográficas: idade, sexo e raça;
- b. clínicas: HAS, tabagismo, histórico de DM e hipercolesterolemia.

Os dados clínicos e laboratoriais nos casos foram obtidos de acordo com protocolo que se encontra na seção de Anexos (Anexo III).

No grupo-controle, o protocolo clínico envolvendo fatores de risco para DOSAC e pesquisa dos auto-anticorpos foi também aplicado. O protocolo se encontra na seção de Anexos (Anexo IV).

4.7.1 Angioressonância Nuclear Magnética (ARM)

Todos os exames de angiografia por ARM foram realizados no aparelho *Siemens Magnetom Vision Plus®*, com os pacientes acordados, utilizando-se a mesma janela de aquisição das imagens, em duas etapas distintas: angiografia para definição do percentual de estenose e seqüência ponderada para detecção de áreas de hemorragia intraplaca.

A angiografia foi realizada por técnica convencional, em seqüências ponderadas de pulso 3D TOF (*time-of-flight*), correspondendo à fase sem contraste e gradiente 3D Turboflash, relativa à fase contrastada (gadólíneo intravenoso). O percentual de estenose foi determinado pelos critérios do NASCET (95) a partir da relação entre o menor diâmetro da zona de

estreitamento e o maior diâmetro da carótida interna, distal à lesão. A graduação da estenose foi adaptada de Nederkoorn e cols. (195), com divisão em 3 categorias: estenose entre 50% e 69%, estenose entre 70% e 90% e estenose acima de 90%. Os exames foram interpretados por dois examinadores independentes, “cegos” para os dados clínicos e laboratoriais, prevalecendo o percentual maior de estenose em casos de discordância. O protocolo se encontra na seção de Anexos (Anexo V).

4.7.2 Detecção de anticorpos anticardiolipina (aCL)

A detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA aCL foi efetuada através de ensaio enzimático (ELISA) seguindo descrições prévias (196-198).

Etapas:

- ✓ 50 ul de solução de CL (*Inova Diagnostics, Inc., San Diego, EUA*) dissolvida em etanol (concentração 50 ug/ml) foram utilizados como antígeno em cada orifício de uma placa de poliestireno;
- ✓ o solvente foi evaporado e a placa foi incubada por uma hora com 100 ul/orifício de soro fetal bovino a 10% em PBS para bloquear sítios antigênicos inespecíficos;
- ✓ os soros a serem testados (diluição 1/50 em FCS a 10%) foram incubados por 3 horas;
- ✓ como segundos anticorpos, conjugados de peroxidase antilgG, antilgM ou antilgA humana, diluídos a 1/10000 em FCS a 10%, foram utilizados em cada orifício da placa;
- ✓ após incubação de uma hora, foram adicionados 50 ul/orifício do substrato (TBM);

- ✓ a reação enzimática foi posteriormente interrompida com 50 ul/orifício de ácido sulfúrico;
- ✓ a detecção de aCL foi concebida em triplicata nos soros de casos e controles, considerando-se o valor médio de três determinações como a titulação correspondente a cada soro;
- ✓ leitura da placa através de fotômetro automático;
- ✓ após cada período de incubação, a placa de poliestireno foi lavada por três vezes com PBS. Todos os passos da reação se deram à temperatura ambiente.

Para expressão dos resultados, calibradores internacionais (Louisville, APL Diagnostics) foram utilizados de acordo com os seguintes parâmetros:

- | | |
|---|--|
| ✓ | IgG ou IgM aCL até 20 UI: teste negativo; |
| ✓ | IgG ou IgM aCL acima de 20 UI: teste positivo; |
| ✓ | IgA aCL até 15 UI: teste negativo; |
| ✓ | IgA aCL acima de 15 UI: teste positivo |

4.7.3 Detecção de anticorpos antibeta2 - gpl

Anticorpos IgG, IgM e IgA antibeta2-gpl foram detectados através de ELISA (199) de acordo com as seguintes etapas:

- ✓ 50 ul de beta2-gpl humana (*Inova Diagnostcs, Inc., San Diego, EUA*) na concentração 10 ug/ml foram colocados em cada orifício da placa de poliestireno (*Costar high binding 3590*) incubados durante a noite;
- ✓ lavagem da placa com PBS;

- ✓ bloqueio da placa com ovalbumina 2% em PBS por uma hora à temperatura ambiente;
- ✓ 100 ul de soros diluídos a 1/100 em ovalbumina a 1% com 0,5% de Tween-20 foram incubados por 3 horas à temperatura ambiente;
- ✓ conjugados de peroxidase e anticorpos de cabra antiIgG, antiIgM e antiIgA humanas (100 ul) foram utilizados como segundos anticorpos e o seu substrato cromogênico (TBM) permitiu a leitura da reação;
- ✓ a detecção de anticorpos anti-beta2-gpl foi concebida em triplicata nos soros de casos e controles, considerando-se o valor médio de três determinações como a titulação correspondente a cada soro;
- ✓ leitura da placa através de fotômetro automático;
- ✓ após cada período de incubação da reação a placa de poliestireno foi lavada três vezes com PBS;
- ✓ após a incubação com beta2-gpl, todos os passos se deram à temperatura ambiente;
- ✓ foram colocadas em cada placa 3 diluições de amostra positiva para anti-beta2-gpl;
- ✓ o grau de pureza da beta2-gpl foi analisado de acordo com descrição prévia;
- ✓ a especificidade do antígeno no ensaio enzimático foi determinada através do uso de anticorpo de coelho anti-beta2-gpl humana como controle positivo.

Os resultados foram expressos em UI de acordo com os seguintes padrões:

- ✓ IgG ou IgM antibeta2-gpl até 20 UI: teste negativo;
- ✓ IgG ou IgM antibeta2-gpl acima de 20 UI: teste positivo;
- ✓ IgA antibeta2-gpl até 25 UI: teste negativo;
- ✓ IgA antibeta2-gpl acima de 25 UI: teste positivo.

4.7.4 Detecção de anticorpos anti-Hsp 60 e anti-Hsp 65

Anticorpos contra Hsp 60 humana recombinante e contra Hsp 65 de *Mycobacterium bovis* (*Inova Diagnostics*, Inc. San Diego, EUA) foram detectados através de ELISA (*Inova Quantalite Hsp 65 e Hsp 60 kits*).

Reagentes:

- ✓ placa de poliestireno coberta com Hsp 60 humana recombinante ou Hsp 65 de *Micobacterium bovis*;
- ✓ soros-controles negativos para os referidos anticorpos (1,2 mL);
- ✓ soros-controle com positividade baixa para os referidos anticorpos (1,2 mL);
- ✓ soros-controles com positividade alta para os anticorpos (1,2 mL);
- ✓ diluentes para o conjugado de peroxidase, solução Tris, solução Tween 20, absorventes e estabilizadores de proteínas (50 mL);
- ✓ solução para lavagem de placas (solução Tris, solução Tween 20), 25 mL;
- ✓ conjugado de cabra antiIgG humana marcado com peroxidase (10 mL);
- ✓ cromogêneo TMB (10 mL);
- ✓ solução para a parada da reação (ácido sulfúrico 0,344M), 10 mL.

A reação obedeceu às seguintes etapas:

- ✓ antígenos (Hsp 60 humana recombinante ou Hsp 65 de *Micobacterium bovis*) na concentração 1ug/ml são acoplados aos orifícios de uma placa de ELISA de poliestireno;
- ✓ 100 ul de soros-controles pré-diluídos e soros dos pacientes a serem testados (diluição 1/100) são adicionados aos orifícios da placa, o que permitiria a ligação dos anticorpos ao antígeno;
- ✓ incubação dos soros por 30 minutos à temperatura ambiente;
- ✓ lavagem da placa com 200-300 ul de soluções padrões é efetuada para que evite ligações inespecíficas de anticorpos;
- ✓ 100 ul de antilgG marcada com peroxidase é adicionada em cada orifício;
- ✓ uma segunda incubação de 30 minutos é, então, procedida, objetivando-se a ligação da antilgG com anticorpos IgG de controles e dos soros dos pacientes;
- ✓ após nova lavagem da placa, a atividade enzimática remanescente é medida acrescentando-se 100 ul do substrato cromogênico TMB;
- ✓ a placa é, então, incubada por 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente;
- ✓ 100 ul da solução de parada da reação é adicionada em cada orifício;
- ✓ a magnitude colorimétrica em soros-controles e soros de pacientes é avaliada no espectrofotômetro no espaço de uma hora;
- ✓ a detecção de anti-Hsp foi concebida em triplicata nos soros de casos e controles, considerando-se o valor médio de três determinações como a titulação correspondente a cada soro;
- ✓ a densidade óptica de cada orifício da placa é lida a 450 nm absorvância.

Foram consideradas positivas para anticorpos IgG anti-Hsp 60 ou IgG anti-Hsp 65 as amostras que atingiram densidade óptica igual ou maior do que 0,5:

- ✓ IgG anti-Hsp 60 ou 65 densidade óptica menor do que 0,5: teste negativo;
- ✓ IgG anti-Hsp 60 ou 65 densidade óptica igual ou maior do que 0,5: teste positivo.

4.8 Controle do Erro Sistemático

4.8.1 Vieses de Seleção

O controle de vieses de seleção foi efetuado, fundamentalmente, pela estrita definição de casos e controles. Os casos de DOSAC foram confirmados por análise clínica e ARM. O fato de se ter coletado amostras de casos de um único centro traz a vantagem da padronização na conduta diagnóstica.

O grupo-controle foi recrutado de enfermarias ortopédicas de mais de um centro hospitalar, o que enfatiza o aspecto “generalização” na obtenção de amostras-controle. A escolha dos controles obedeceu as seguintes premissas:

- a) pacientes oriundos da população geral sem o desfecho de DOSAC;
- b) pacientes com afecções de resolução predominantemente cirúrgicas, o que diminui a chance de vieses clínicos interferirem nos resultados.

4.8.2 Vieses de Aferição

Vieses de aferição foram evitados, a princípio, através de estrita obediência aos critérios de exclusão para casos e controles.

Problemas de memorização (*recall*) nas entrevistas se associam a vieses de aferição. Tanto incapacidade de lembrar fatos passados como a tendência de se obter maior número de eventos prévios nos casos pode ocorrer. Para tal, foi conduta da equipe conduzir homogênea e padronizadamente as entrevistas com pacientes ou familiares nos dois grupos.

Em paralelo, os cuidados com a coleta, o processamento e o armazenamento das amostras de soro a -20° C contribuíram para a confiabilidade dos resultados dos ensaios enzimáticos. Os soros foram armazenados a -20° C por, no máximo, 3 meses antes do procedimento laboratorial.

A análise laboratorial foi efetuada por laboratório independente e geograficamente distinto de onde as amostras originais foram obtidas. Um mesmo bioquímico, alheio em relação à identidade dos pacientes, procedeu aos testes imunoenzimáticos, utilizando-se de instrumentos de alta precisão.

4.8.3 Vieses de Confusão

Conceitualmente, vieses de confusão foram evitados através de:

- ✓ delineamento (estudo de caso-controle) pertinente aos objetivos do estudo e vice-versa;
- ✓ análise estatística apropriada ao delineamento.

Em termos específicos, incluiu-se no estudo exclusivamente casos de DOSAC. Esta escolha, certamente, limitou o número amostral. Além disso, excluiu pacientes que obituaram antes do diagnóstico. Como vantagem, possibilitou uma melhor acurácia diagnóstica.

Casos ou controles com doenças infecciosas, doenças do tecido conjuntivo, SAF e trombofilias genéticas foram excluídos devido à potencial associação destas entidades com AAF/anti-Hsp. Pacientes ortopédicos (controles) que apresentavam osteonecrose também foram excluídos, já que aCL foram eventualmente descritos nesta circunstância (194).

A inclusão dos isotipos IgM/IgA/IgG AAF, cronologicamente associados a respostas agudas e de memória humoral, pode ajudar na interpretação etiológica desta testagem nos pacientes com DOSAC. Para anticorpos anti-Hsp a metodologia disponível contemplou detecção de anticorpos IgG.

4.9 Análise Estatística

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio padrão, enquanto que para as variáveis categóricas foram utilizados a frequência absoluta e o percentual. A força de associação entre os diversos fatores em estudo e o desfecho de interesse (DOSAC) foi avaliada pelo *odds ratio* (OR) e seu intervalo de confiança foi de 95%. As situações nas quais não foi possível obter-se o OR, devido a frequências nulas, foram contornadas utilizando-se a correção de Agresti (200). Para este caso, utilizaram-se intervalos de confiança por método exato.

A significância dos dados quantitativos foi determinada pelo teste t de Student e, para as variáveis categóricas, usou-se o teste de qui-quadrado, seguido pelo teste exato de Fisher, quando necessário.

O impacto de potenciais fatores de confusão nas estimativas brutas de *odds ratio* foi avaliado utilizando-se um modelo de regressão logística múltipla contendo os termos idade, sexo, raça, HAS, tabagismo, DM e hipercolesterolemia. O nível de significância adotado no estudo foi de $\alpha=0,05$.

Os dados foram analisados com auxílio do programa estatístico SPSS versão 11.5.

A escala de magnitude de OR proposta por Hopkins (201), utilizada no estudo, pode ser vista na Tabela 1.

Tabela 1 - Tabela de magnitude de *odds ratio* (OR)

OR	Força da associação
1,0-1,5	Trivial
1,5-3,5	Fraca
3,5-9,0	Moderada
9,0-32	Forte
>32	Muito intensa

A correção de Agresti foi utilizada na presença de frequências extremas (0 ou 100%) de determinada variável em casos ou controles. A referida correção originou valores de OR não-ajustados. Nesta circunstância, intervalos de confiança foram obtidos pelo método exato de obtenção de intervalo de confiança.

Todos os testes estatísticos foram executados no programa SPSS (SPSS para Windows, versão 11.5, Chicago, IL).

5 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 57 pacientes com DOSAC, oriundos do Hospital São Lucas da PUCRS. A população masculina foi de 35 pacientes (61,4%) e a população feminina foi de 22 pacientes (38,6%). A média global de idade foi de 66 anos (43-80 anos) com desvio padrão (DP) de 8,7. A raça branca predominou em 100% dos casos (57 pacientes).

Um ou mais fatores de risco para DOSAC (HAS, tabagismo, histórico de DM e hipercolesterolemia) foram observados em 98,2% dos casos.

Alterações no exame de ARM das artérias carótidas foram documentadas em 57 dos casos (100%). Os percentuais de estenose de artéria carótida após realização do estudo angiográfico, nos 57 pacientes, ficaram assim distribuídos:

- ✓ em 26,3% dos casos (15 pacientes) o grau de estenose da carótida ficou entre 50% a 69%;
- ✓ em 15,8% dos casos (9 pacientes) o grau de estenose da carótida ficou entre 70% a 90%;
- ✓ em 57,9% dos casos (33 pacientes) o grau de estenose da carótida ficou acima de 90%.

Noventa e três pacientes originários de enfermarias de ortopedia (71 do Hospital São Lucas da PUCRS e 22 do Hospital Independência de Porto Alegre) com afecções músculo esqueléticas compuseram o grupo-controle. A população masculina foi de 47 pacientes (50,5%) e a feminina de 46 pacientes (49,5%). A

média global de idade no grupo-controle foi de 47,5 anos (16-84 anos) com DP de 18,8. A raça branca foi observada em 83 pacientes (89,2%) e a raça negra em 10 pacientes (10,8%).

Um ou mais fatores de risco para DOSAC foram documentados em 56 pacientes do grupo-controle (60,2%).

A Tabela 2 detalha os motivos da internação hospitalar nos 93 pacientes do grupo-controle.

Tabela 2 - Entidades nosológicas nos 93 pacientes do grupo-controle internados em enfermarias de ortopedia

	Números absolutos	Percentual
Total de casos	93	100%
Ruptura tendinosa no ombro	1	1,1%
Luxação de ombro	1	1,1%
Lesão ligamentar no tornozelo	1	1,1%
Lesão ligamentar de joelho	4	4,3%
Artroplastia de joelho	4	4,3%
Fraturas em membros superiores	10	10,7%
Laminectomia lombar	15	16,1%
Artroplastia de quadril	21	22,6%
Fraturas de membros inferiores	36	38,7%

Os dados demográficos e fatores de risco foram analisados comparativamente nas populações de casos e controles.

A Tabela 3 detalha os achados acerca de idade, sexo, raça e presença de um ou mais fatores de risco nos dois grupos. Pacientes com DOSAC apresentaram idade significativamente mais avançada em relação ao grupo-controle. Não houve predileção de sexo nos dois grupos de pacientes. A raça negra predominou no grupo controle. A presença de um ou mais fatores de risco esteve fortemente associado aos casos de DOSAC.

Tabela 3 - Características demográficas e clínicas dos pacientes com DOSAC e controles

Característica	Casos n=57	Controles n=93	OR	IC 95%	P
Idade, anos	66,0 \pm 8,7	47,5 \pm 18,8	---	---	<0,001
Sexo masculino, n°(%)	35 (61,4)	46 (49,5)	1,6	0,8 a 3,4	0,21
Raça negra, n°(%)	0 (0,0)	10 (10,8)	0,1*	---	0,01
1 ou + FR, n°(%)	56 (98,2)	53 (57,0)	42,3	5,9 a 855,7	<0,001

Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão; frequência (percentuais);

OR: *odds ratio* bruto; IC 95%: intervalo de confiança de 95%;

P: significância estatística; n: número de indivíduos.

FR: fatores de risco.

*Por correção de Agresti

Os fatores de risco para DOSAC: HAS, tabagismo, histórico de DM e hipercolesterolemia, variáveis de interesse desse estudo, foram isoladamente avaliados em casos e controles.

A Tabela 4 mostra o perfil destes fatores de risco nos dois grupos. Verificou-se que hipercolesterolemia (OR=25,5), HAS (OR=21,0) e DM (OR=14,8) estiveram fortemente associados à presença de DOSAC, enquanto tabagismo (OR=0,6) não se associou ao desfecho. As variáveis AIT/AVCi (OR=18,2) e cardiopatia (OR=9,7), que foram analisadas de forma independente, demonstraram uma forte associação à DOSAC.

Tabela 4 - Perfil de fatores de risco em casos e controles

Característica	Casos n=57	Controles n=93	OR	IC 95%	P
Hipercolesterolemia	49 (86,0)	18 (19,4)	25,5	9,5 a 70,9	<0,001
HAS	49 (86,0)	21 (22,6)	21,0	8,0 a 57,1	<0,001
DM	26 (45,6)	5 (5,4)	14,8	4,8 a 48,4	<0,001
Tabagismo	13 (22,8)	30 (32,3)	0,6	0,3 a 1,4	0,29
História AIT/AVCi	29 (50,9)	5 (5,4)	18,2	6,0 a 59,8	<0,001
Cardiopatia	29 (50,9)	9 (9,7)	9,7	3,8 a 25,2	<0,001

OR: *odds ratio* bruto; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; freqüência (percentuais); P: significância estatística; n: número de indivíduos; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabete mellitus; AIT: acidente isquêmico transitório; AVCi: acidente vascular cerebral isquêmico.

A Tabela 5 lista as freqüências de testes positivos para aCL, antibeta2-gpl e anti-Hsp e os OR (estimativa bruta) para cada um dos anticorpos avaliados em casos e controles.

Anticorpos do isotipo IgA antibeta2-gpl foram detectados de forma mais significativa nos casos do que nos controles.

Os outros anticorpos não diferiram significativamente em frequência em casos e controles.

Tabela 5 - Frequência de teste positivo para anticorpos aCL, antibeta2-gpl e anti-Hsp em casos e controles

Características	Casos n=57	Controles n=93	OR	IC 95%	P
IgG aCL	4 (7,0)	1 (1,1)	6,9	0,7-167,5	0,07
IgM aCL	1 (1,8)	3 (3,2)	0,5	0,1-6,0	0,51
IgA aCL	0 (0,0)	0 (0,0)	----	----	----
IgG antibeta2-gpl	0 (0,0)	5 (5,4)	0,1	----	0,16
IgM antibeta2-gpl	4 (7,0)	10 (10,8)	0,6	0,2-2,1	0,57
IgA antibeta2-gpl	19 (33,3)	9 (9,7)	4,6	1,9-11,3	<0,001
IgG anti-Hsp 60	0 (0,0)	0 (0,0)	----	----	----
IgG anti-Hsp 65	3 (5,3)	9 (9,7)	0,5	0,1-2,2	0,54

OR: *odds ratio* bruto; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; P: significância estatística; frequência (percentuais); n: número de indivíduos.

Através de regressão logística, foram obtidos OR ajustados para cada um dos anticorpos em casos e controles. A estimativa ajustada para os anticorpos pode ser vista na Tabela 6.

A presença de anticorpo IgA antibeta2-gpl se associou de forma independente com DOSAC, com significância limítrofe.

Tabela 6 - OR ajustados para associação entre DOSACs e anticorpos aCL, antibeta2- gpl e anti-Hsp 60 e Hsp 65

Característica	Casos n=57	Controles n=93	OR *	IC 95%	P
IgG aCL	4 (7, 0)	1 (1, 1)	0,9	0,1-11,8	0,92
IgM aCL	1 (1, 8)	3 (3, 2)	1,1	0,1-15,5	0,92
IgA aCL	0 (0,0)	0 (0,0)	----	----	----
IgG antibeta2-gpl	0 (0,0)	5 (5, 4)	----	----	0,99
IgM antibeta2-gpl	4 (7, 0)	10 (10, 8)	1,8	0,2-14,2	0,58
IgA antibeta2-gpl	19 (33,3)	9 (9,7)	4,7	1,0-23,7	0,06
IgG anti-Hsp 60	0 (0,0)	0 (0,0)	----	----	---
IgG anti-Hsp 65	3 (5,3)	9 (9,7)	0,7	0,1-7,1	0,74

OR* ajustados em modelo de regressão logística múltipla incluindo os fatores, idade, sexo, raça, HAS, tabagismo, cardiopatia, DM, hipercolesterolemia, acidente isquêmico transitório e acidente vascular cerebral isquêmico.

6 DISCUSSÃO

Com base em evidências de estudos de biologia celular e molecular, associadas aos resultados de pesquisas clínicas e experimentais, a idéia de que o processo aterosclerótico seria mera acumulação crônica, passiva e focal de lipídios na parede arterial deu lugar à noção de uma resposta inflamatória, imunomediada e sistêmica (202, 203). Mecanismos inflamatórios são reconhecidos desde etapas iniciais da aterogênese e determinam a progressão e o curso clínico da doença. Representam reações biológicas altamente complexas ao dano arterial, essenciais na manutenção da homeostase. Resultam da inter-relação funcional entre os componentes vasculares, em especial o endotélio, leucócitos e plaquetas, modulados por fatores de risco definidos e expressos por respostas neuro-humorais sistêmicas, autócrinas e parácrinas. A aterosclerose, sob essa ótica, deixa de ser considerada simplesmente como um processo degenerativo de obstrução focal da parede arterial e passa a ser vista como causadora de uma “panarterite” difusa, comprometendo vários territórios arteriais. Este novo conceito pode explicar a razão da elevação, da manutenção e da diminuição dos títulos de vários marcadores inflamatórios antes, durante e depois do desenvolvimento do curso clínico das complicações vasculares da doença.

Este estudo explorou a possibilidade de AAF (incluindo-se aqui aCL e antibeta2-gpl) e anticorpos anti-Hsp se associarem a DOSAC. A decisão pelo delineamento de caso-controle, estudo de caráter observacional e analítico,

passou pela necessidade de se estimar objetivamente o risco, se houve algum, que a presença destes anticorpos pudesse determinar no desfecho da DOSAC.

A insuficiência vascular cerebral é a terceira causa de óbito na população adulta, a segunda causa de óbito entre as moléstias cardiovasculares e a principal causa de óbito de origem neurológica.

Inicialmente, não se pode desconsiderar que um dos fatos demográficos mais significativos nos últimos anos é o crescimento do número de pessoas idosas. Isso aconteceu devido ao progresso, nos últimos anos, dos métodos de diagnósticos precoce das doenças cardiovasculares e pulmonares, surgindo como conseqüências imediatas à evolução moderna da terapêutica e principalmente a profilaxia dessas afecções. A abolição e o tratamento dos principais fatores de risco – hipertensão, fumo, diabetes, hipercolesterolemia – aliados a uma vida mais sadia, foram, gradativamente, encorajando a longevidade.

Paralelo ao avanço da expectativa de vida, estudos epidemiológicos mostram que a aterosclerose incide com maior freqüência em indivíduos na faixa de idade de 50 a 70 anos, etapa considerada de transição tanto no aspecto biológico quanto profissional.

Nos casos estudados, encontrou-se uma idade média de 66 anos em oposição a 47,5 anos nos controle ($P < 0,001$). Deve-se salientar que esta diferença, estatisticamente significativa para efeitos de interpretação, foi ajustada pela análise multivariada (regressão logística), interceptando vieses na aferição dos OR e possibilitando o ajuste da idade como fator de confusão.

Desde há muito se aceita que a lesão avançada da aterosclerose, a placa fibrosa, inicia seu desenvolvimento vinte anos mais cedo no homem do que na

mulher, mas, tanto sua estrutura microscópica quanto suas complicações finais, são idênticas nos dois sexos (204).

Neste estudo, observou-se um predomínio do sexo masculino (61%), diferença temporal para esse fator intrínseco que pode ser explicado pelos efeitos hormonais favoráveis ao sexo feminino.

A raça branca ocupou todos os espaços no grupo de casos (100%), percentual talvez relacionado ao predomínio étnico na região da pesquisa. No grupo-controle, 10,8% dos participantes pertenciam à raça negra.

O conceito de fator de risco nasceu em campos epidemiológicos, onde pesquisas prospectivas demonstraram a consistente associação de características observadas em indivíduos aparentemente normais com a subsequente incidência de vasculopatias nesses mesmos indivíduos.

Do ponto de vista populacional, é muito importante precisar quais são, de fato, os fatores de risco para doença aterosclerótica com a finalidade de uma correta abordagem profilática primária ou secundária. Inúmeros fatores, ao longo dos anos, foram citados como importantes para a ocorrência da aterosclerose. O verdadeiro fator de risco é aquele que tem uma relação etiológica, ainda que não se conheça claramente a essência dos mecanismos fisiopatológicos. Deve existir, portanto, uma real evidência, derivada do experimento, com um forte grau de associação e que se confirme com outros estudos, quer seja epidemiológica, quer seja biológica. Nas últimas décadas do século XX, determinadas características foram correlacionadas com a doença aterosclerótica, interferindo na evolução natural, aumentando sua incidência e acelerando sua progressão.

Em relação aos fatores de risco da casuística deste estudo, 98,2% dos pacientes com DOSAC cursaram com um ou mais fatores de risco. Como um

todo, eles foram significativamente mais freqüentes nos casos do que nos controles (valores $P < 0,001$).

Entre os quatro fatores de risco clínicos estudados, as presenças de HAS em 86% dos casos e hipercolesterolemia também em 86% dos casos, geraram a associação de magnitude com o desfecho DOSAC.

Níveis elevados da pressão arterial são importante fator de risco para a aterosclerose, especialmente nas formas cardíacas e cerebrais. O risco de aterosclerose aumenta progressivamente com o aumento do nível da pressão, especialmente com os valores diastólicos altos. Quando a pressão arterial ultrapassa 160x90 mm Hg, o risco é cinco vezes maior do que nos homens ou mulheres com pressão normal. Após os 50 anos de idade, a hipertensão arterial passa a ser fator de risco mais significativo do que a hipercolesterolemia (205).

Entre os quatro fatores de risco clínicos estudados, a presença de HAS (OR= 21,0; IC 95% 8,0 a 57,1; $P < 0,001$) gerou associação de magnitude com o desfecho DOSAC.

Os principais lipídios no homem são os ácidos graxos, o colesterol, os triglicerídios e os fosfolipídios. Todos eles necessitam se ligar a uma proteína especial para se tornarem solúveis, miscíveis e transportáveis pelo sangue até os tecidos. Essas proteínas transportadoras fazem parte do grupo das chamadas “apoproteínas” que têm atividades na ligação com os receptores celulares e ativam determinadas enzimas. A hipercolesterolemia eleva a relação colesterol/fosfolipídio da membrana celular fazendo com que aumente a adesão de monócitos, de depósitos lipídicos e de proliferação de CML.

Neste trabalho, 86% dos pacientes com DOSAC apresentaram hipercolesterolemia o que demonstra uma forte força de associação com DOSAC.

Isso também representa que, entre os quatro fatores de risco clínicos estudados, o de hipercolesterolemia (OR=25,5; IC 95% 9,5 a 70,9; P<0,001) gerou a associação de maior magnitude com o desfecho DOSAC.

Geralmente, é aceito que a diabetes mellitus determina fator de risco na gênese da aterosclerose e de suas complicações. No estudo de Framingham, o risco de mortalidade por doença cardiovascular foi 1,7 maior nos homens e 3,3 vezes maior nas mulheres portadoras de diabetes em relação aos não-diabéticos (206). Nesta casuística, 45,6% dos casos tinham história de diabetes mellitus (OR=14,8; IC95% 4,8 a 48,4; P<0,001), estabelecendo uma forte associação com a DOSAC.

O tabagismo está associado aos níveis baixos de HDL, oxidação do LDL, poliglobulia secundária, aumento da viscosidade sangüínea e da agregação plaquetária, aumento do fibrinogênio plasmático, disfunção endotelial, facilitação da estimulação adrenérgica e redução da atividade estrogênica. Nos homens e mulheres, o efeito do fumo é mais nítido na aterosclerose obliterante dos membros (205, 207). O efeito do tabaco sobre os colesterolis plasmáticos parece depender dos radicais livres presentes no fumo. Alguns pesquisadores acreditam que as propriedades mutagênicas do tabaco são as responsáveis tanto pela sua capacidade carcinogênica quanto aterogênica. De acordo com esta hipótese, a proliferação monoclonal da célula muscular lisa no ateroma é resultado da transformação mórbida produzida pelos componentes tóxicos do cigarro sobre essas células. Nesta casuística, 22,8% dos casos ainda utilizavam o tabaco na atualidade, 52,6% conseguiram interromper o hábito há um ano ou mais e 24,6% confidenciaram que nunca fumaram. Neste estudo, dos participantes do grupo

controle 32,3% utilizavam o tabaco. O tabagismo (OR= 0,6; IC 95% 0,3 a 1,4; P=0,29) não se associou à DOSAC.

Embora a angiografia carotídea seja aceita como método de referência nos estudos por imagem das artérias carótidas, observações recentes sugerem que as técnicas de imagem não-invasivas podem apresentar maior sensibilidade, melhor relação custo-benefício e maior segurança em relação à angiografia convencional (128). A *American Stroke Association* realizou revisão sistemática atual, analisando a sensibilidade e a especificidade da ARM e da ultrassonografia com doppler e mapeamento de fluxo colorido na quantificação de diferentes percentuais de estenose de carótidas e na capacidade de distinguir estenose de oclusão completa. Estudando 151 artigos que utilizaram como comparação a arteriografia digital, os autores concluíram que a ARM obteve melhor acurácia que a ultrassonografia com doppler e mapeamento de fluxo colorido em reconhecer estenoses entre 70 e 99%. Além disso, em relação à diferenciação de estenose/oclusão, ambos os métodos obtiveram correspondência semelhante ao padrão ouro angiográfico, passando-se a validar a ARM como suficiente para o planejamento cirúrgico (195).

No presente estudo, por intermédio dos exames de ARM, foram observadas, estenoses de 50% a 69% em 26,3% dos casos (15 pacientes), estenoses de 70% a 90% em 15,8% dos casos (9 pacientes) e estenoses acima de 90% em 57,9% dos casos (33 pacientes).

Os conhecimentos adquiridos nas últimas duas décadas questionaram, de forma substancial, alguns paradigmas a respeito da fisiopatologia e da história natural da aterosclerose. Recentemente, alguns estudos apontaram para a possibilidade de fenômenos auto-imunes estarem relacionados à ATC (160, 208,

209). Já foi constatada a formação de anticorpos contra componentes da placa aterosclerótica e que eles se encontram aumentados no soro de pacientes com a doença (210). Dentre os auto-anticorpos estudados estão aqueles dirigidos contra LDL-oxidado, complexo LDLox/beta2-gpl, cardiolipina, beta2-gpl e Hsp (209, 211, 212).

Independente dos resultados deste estudo, é digno de nota as correlações de trabalhos pertinentes e afins aos objetivos desta pesquisa, pois foi desta forma que chegou-se a interessantes conclusões.

Em relação aos anticorpos aCL, a presença do isotipo IgA não determinou risco de associação com o desfecho DOSAC.

Franck *et al.* em recente estudo, demonstraram, em relação aos anticorpos aCL, que a presença da IgA determinou forte risco de associação com o desfecho DAP (OR não-ajustado de 11,5). A avaliação deste isotipo em pacientes com DAP é original em sua casuística. Também observaram que a presença deste anticorpo não se associou aos fatores de risco conhecidos para DAP (idade, sexo, raça, HAS, tabagismo, DM e hipercolesterolemia) ou com alterações arteriográficas (186).

Staub *et al.*, avaliaram a frequência de IgG/IgM/IgA aCL em pacientes com AVCi em fase aguda. O isotipo IgA, assim como IgG/IgM, não foi significativamente detectado nos casos em relação aos controles. O isotipo não se associou a risco de desfecho isquêmico nessa casuística (184). Quatro outros estudos também avaliaram o isotipo IgA aCL em pacientes com AVC isquêmico e em nenhum deles houve associação de forma relevante a infarto cerebral (213-216).

Como se observa, os dados acerca da importância etiopatogênica da IgA aCL em pacientes com LES, SAF e ATC são controversos. O papel etiopatogênico do isotipo IgA aCL ainda não está totalmente esclarecido e deve ser mais detalhadamente estudado em pacientes com ATC, incluindo-se a DOSAC.

Quanto aos anticorpos IgG aCL e IgM aCL, também não se associaram de forma definida ao desfecho DOSAC neste estudo.

De acordo com dados de Godoy *et al.*, em 40 pacientes com claudicação intermitente, a positividade global de IgG/IgM aCL foi de 57%. O risco relativo de 3,83 ($P < 0,0001$) sugere forte associação entre aCL e CI (217).

Evans *et al.* verificaram que em 116 pacientes com claudicação intermitente, 9,5% tiveram teste positivo para IgM aCL. Os anticorpos não se mostraram relacionados a fatores demográficos, fatores de risco e outras condições cardiovasculares (218).

Friehs *et al.* reportaram frequência significativamente elevada de IgG aCL em pacientes com doença vascular cerebral e periférica concomitante. Não houve relação dos anticorpos com outros fatores de risco (219).

Lam *et al.* verificaram que níveis elevados de aCL constituíram fatores de risco independentes para progressão da ATC em pacientes submetidos à revascularização de membros inferiores (220).

No que se refere aos anticorpos contra beta2-gpl, os isotipos IgG e IgM não se associaram com o desfecho para DOSAC.

Anticorpos IgA antibeta2-gpl foram detectados em 33,3% dos casos e em 9,7% dos controles (OR ajustado 4,7; IC95% 1,0 a 23,7; $P = 0,06$).

Com significância limítrofe (221) ($P=0,06$), a presença de anticorpos IgA antibeta2-gpl se configurou como fator de risco independente para DOSAC (OR ajustado 4,7), demonstrando uma associação moderada na presença da doença carotídea (OR ajustado de 4,7; $P=0,06$). A análise por regressão logística ratificou que essa associação foi independente de outros fatores de risco (sexo, idade, raça, HAS, DM, tabagismo e hipercolesterolemia). Esse resultado pode representar um dos elos entre auto-imunidade e aterosclerose carotídea e a utilização deste auto-anticorpo como marcador sorológico de ATC deve ser discutida em estudos futuros.

O achado corrobora a dados recentes de Staub *et al.*, nos quais o isotipo IgA antibeta2-gpl constituiu fator de risco independente para AVCi em fase aguda (OR ajustado 5,6; IC 90% 1,5-14,3; $P=0,025$). De forma semelhante a este estudo em DOSAC, anticorpos IgG e IgM antibeta2-gpl também não se associaram ao desfecho para AVCi. (184).

Na conclusão dos estudos de Franck *et al.*, a presença de anticorpos IgA antibeta2-gpl se configurou como fator de risco independente para DAP (186).

Ranzolin *et al.*, por sua vez, avaliaram o impacto da presença de IgG/IgM/IgA aCL e antibeta2-gpl em pacientes com IAM e controles. O OR ajustado de 3,4 para IgA antibeta2-gpl ($P=0,015$, IC 95% 1,3-9,1) foi compatível com associação definida e independente deste anticorpo com IAM. Uma vez mais, os isotipos IgG e IgM antibeta2-gpl não se associaram a risco aumentado do desfecho (185).

Veres *et al.* verificaram a frequência de anticorpos antibeta2-gpl em pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA) e controles. Os referidos anticorpos foram mais frequentes em pacientes com SCA (14%) do que em

controles (2%). Houve associação de ocorrência de anticorpos antibeta2-gpl com sexo masculino e idade precoce. O isotipo IgA antibeta2-gpl foi particularmente prevalente nos casos de angina instável e IAM com elevação de ST (222).

De acordo com esses achados uniformes em DAP (186), AVCi (184) e IAM (185), a IgA-antibeta2-gpl parece se comportar como marcador de risco reprodutível para ATC em vários sítios anatômicos.

A beta2-gpl é foco atual de muitos estudos envolvendo trombofilias e ATC. Loannidis *et al.* verificaram que a resposta anticórpica contra beta2-gpl é determinada por poucos alelos específicos de classe II (223). O grupo de Matsuura *et al.* tem enfatizado o papel patogênico desta glicoproteína na ATC, particularmente em pacientes com LES ou SAF (211). A interação da beta2-gpl com a partícula LDLox é de grande interesse nos dias atuais. Sabe-se que a LDLox é a principal lipoproteína encontrada nas lesões ateroscleróticas e que se co-localiza com beta2-gpl e linfócitos imunoreativos (149, 161).

Definidamente, a LDLox se acopla a beta2-gpl através dos ligantes oxLig-1 e oxLig-2, gerando o complexo LDLox/beta2-gpl. Este complexo é encontrado no ateroma e no sangue periférico de pacientes com doenças auto-imunes e outras situações clínicas (sífilis, endocardite infecciosa, DM, nefrite crônica) (224).

Postula-se que a beta2-gpl, ao se ligar a LDLox no plasma, promova a formação de complexo estável que pode se comportar como um auto-antígeno aterogênico. Ainda não há consenso se a presença deste complexo no sangue periférico ou no ateroma pode representar um fator de risco para oclusão vascular em pacientes com doenças auto-imunes (224).

É importante salientar que, *in vitro*, o complexo LDLox/beta2-gpl pode ser internalizado por macrófagos quando ligado a uma IgG (153). A beta2-gpl,

quando se liga a LDLox, bloquearia a fagocitose da lipoproteína através do receptor lixeiro. A presença de IgG ligada ao complexo (o sítio de ligação é na beta2-gpl) permite que o macrófago o fagocite através de seu receptor Fc para IgG. Este mecanismo de ativação macrofágica parece mais efetivo do que aquele que envolve fagocitose através do receptor lixeiro (225). Assim, surge a possibilidade de um efeito pró-aterogênico para IgG antibeta2-gpl (224, 225). Subseqüentemente, a evolução do macrófago para célula espumosa culminaria na formação do ateroma.

No LES e na SAF verificou-se que anticorpos IgG contra os complexos LDLox/beta2-gpl e beta2-gpl/oxLig1 estão fortemente associados à trombose arterial. O achado implica que o complexo LDLox/beta2-gpl possa ser representativo de outro complexo antigênico, diferente de FL de carga negativa em pacientes com LES/SAF. Assim, anticorpos antiLDLox/beta2-gpl podem se constituir em subclasse distinta de AAF. A presença de anticorpos contra este complexo parece induzir risco de aterotrombose imune-mediada em doenças como LES/SAF (224).

O aumento dos níveis de IgG antiLDLox/beta2-gpl foram detectados em pacientes com LES, esclerodermia e SAF. Neste último grupo, a predileção por trombozes foi claramente a árvore arterial, o que sugere o efeito pró-aterogênico deste auto-anticorpo (225).

Nesse mesmo estudo, o isotipo IgM antiLDLox/beta2-gpl foi particularmente elevado em pacientes com artrite reumatóide sem relação com títulos de fator reumatóide IgM (225). Como um todo, estes achados podem estar relacionados ao desenvolvimento prematuro e acelerado de aterosclerose em doenças auto-imunes (226, 227).

Os ensaios imunoenzimáticos para anticorpos antibeta2-gpl ainda não são internacionalmente padronizados (228). O fato tem dificultado a comparação entre vários estudos clínicos em trombofilias e ATC. Embora a especificidade, nesta circunstância, os anticorpos antibeta2-gpl ainda não foram anexados aos critérios clássicos para SAF (229).

Há evidências de que os AAF desempenham um papel na patogenia da ATC:

- 1) induzem a adesão de monócitos à célula endotelial (230);
- 2) anticorpos IgG antibeta2-gpl aceleram o influxo de LDLox para os macrófagos (153);
- 3) a imunização de ratos deficientes em receptor para LDL com aCL gera aterosclerose acelerada no arco aórtico (231).

A mesma raça murina, quando imunizada com beta2-gpl, desenvolve anticorpos antibeta2-gpl e lesões ateroscleróticas definidas. Os linfócitos obtidos desses ratos, quando transferidos para ratos singênicos, deflagram o aparecimento de extensas estrias gordurosas comparativamente aos controles (162, 232).

Por outro lado, a administração de beta2-gpl humana e bovina por via oral gera tolerância imunológica em murinos, o que previne a formação de ateromas. A diminuição da resposta celular contra beta2-gpl e o aumento na produção de interleucina 4 e 10 (citocinas potencialmente antiaterogênicas) foram também observados neste modelo. Em resumo, a utilização oral da beta2-gpl parece gerar deleção e/ou anergia imunológica em subpopulações de linfócitos pró-aterogênicos. Os autores concluíram que beta2-gpl pode se configurar como uma molécula imunomoduladora da progressão da placa aterosclerótica (146).

O efeito imunomodulador da beta2-gpl sobre a placa aterosclerótica é aceito de acordo com os dados atuais. Enquanto isolada, parece inibir a formação da placa como atestam os estudos sobre a tolerância oral acima citados (146). Quando ligada a anticorpos IgG, favorece a aterogênese através da ativação macrófagica (153, 160, 224, 225).

Em relação aos isotipos antibeta2-gpl, a literatura não enfatiza nenhum deles em particular, o que torna de interesse os achados acerca da IgA antibeta2-gpl neste relato e nos estudos realizados no Hospital São Lucas da PUC (184, 185).

A estimativa de risco para associação de IgA antibeta2-gpl com ATC foi maior nos pacientes com DAP (186) do que nos pacientes com AVC isquêmico e IAM (184, 185). Supõe-se que o maior volume de doença e, portanto, de carga antigênica no território que caracteriza a DAP (aorta distal, artéria ilíaca e de membros inferiores) poderia se constituir em uma das razões para a frequência aumentada da IgA antibeta2-gpl em relação a este estudo que compreende somente o setor carotídeo.

Quanto a anticorpos IgA, e não outros isotipos, se associarem a risco de desfecho, não há ainda uma explicação plausível. As ações biológicas da IgA na vasculatura são ainda pobremente entendidas.

Embora sendo fator de risco independente para DOSAC neste estudo, não se pode excluir a possibilidade de que anticorpos IgA antibeta2-gpl estejam fundamentalmente se comportando como epifenômenos.

Também as proteínas de choque térmico (Hsp) que estão presentes na maioria das células e atuam como “chaperones” moleculares, exercendo um

papel de proteção a danos induzidos por estímulos de estresse, foram motivos para esta pesquisa.

Estudou-se o impacto que a presença de anticorpos de classe IgG anti-Hsp 60 e IgG anti-Hsp 65 causou na presença de DOSAC.

Uma interessante relação entre resposta imunológica contra Hsp e vasculopatia aterosclerótica foi recentemente aventada (233). Fatores de risco para ATC como infecções, LDLox, estresse oxidativo, HAS e estresse biomecânico induzem o aumento da expressão das Hsp nas células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas (234).

Reações auto-imunes contra Hsp 65 ou Hsp 60 podem estar envolvidas no deflagramento e progressão de lesões ateroscleróticas (235).

Uma das hipóteses imunológicas para a aterogênese se fundamenta na existência de reações humorais e celulares contra Hsp 65 bacterianas. Dada a homologia molecular de 60% entre Hsp 65 bacterianas e Hsp 60 humana (172), reações cruzadas podem ocorrer no endotélio (235).

Células endoteliais ativadas expressam Hsp 60 na sua superfície. O endotélio, então, se torna alvo de anticorpos contra Hsp 60 por reação cruzada (235). Anticorpos contra Hsp 60/65 microbiana reconhecem epítomos específicos na Hsp humana endotelial. Estes epítomos servem como alvos auto-imunes na lesão aterosclerótica incipiente e podem explicar certos mecanismos da aterogênese precoce (236).

A patogenicidade dos anticorpos anti-Hsp na aterosclerose não é hipótese fora do contexto. *In vitro* causam lise de células endoteliais ativadas (análogas às expostas a fatores de risco como HAS), mas não de células em repouso (237).

Cada vez aumenta mais a impressão de que a infecção da parede das artérias tem papel potencializador e instabilizador das placas ateromatosas ao se instalar sobre lesões endoteliais provocadas por outros fatores de risco.

Agentes infecciosos como *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, citomegalovírus e herpes vírus têm papel incerto na etiopatogênese da ATC (173). Estas infecções podem promover um ambiente pró-inflamatório, pró-coagulante e pró-aterogênico. As Hsp podem funcionar como elo entre infecção e processo aterosclerótico (238).

A *Chlamydia pneumoniae*, de localização intramacrofágica na placa de ateroma, secreta grande quantidade de Hsp 60 durante a infecção crônica (239). Satochi *et al.* descreveram imunorreatividade contra antígeno de *Chlamydia pneumoniae* dentro de CE, MCF e CLM em 90% dos ateromas de carótidas. Os autores concluíram que os macrófagos infectados por *Chlamydia pneumoniae* penetram na íntima arterial e medeiam um processo inflamatório e auto-imune através da produção de Hsp 60 favorecendo a ateromatose (240).

Kol *et al.* estudaram, através da imunohistoquímica, o papel das Hsp 60 humana e de *Chlamydia pneumoniae* em ateromas de carótidas e em artérias normais. Os autores confirmaram que as Hsp se co-localizam nos macrófagos da placa em 77% dos ateromas. A presença de ambas as Hsp pode intermediar a síntese de TNF alfa e a metaloproteinases por macrófagos. Os eventos resultantes da ativação macrofágica podem promover aterogênese e precipitar eventos isquêmicos agudos (239).

Alguns estudos experimentais, principalmente avaliando Hsp 65, foram importantes para a compreensão do comportamento dessas proteínas na ATC.

Shoenfeld *et al.* verificaram que a imunização de animais com Hsp 65 e beta2-gpl acelerou a progressão das lesões e a infiltração de linfócitos CD3 nas regiões subendoteliais de placas iniciais de ATC. A transferência de linfócitos reativos para ratos singênicos levou a um aumento da formação das estrias gordurosas (241).

Afek *et al.* imunizaram ratos deficientes em receptor LDL com Hsp 65 e os alimentaram com dieta normal. Os animais desenvolveram estrias gordurosas significativamente maiores que os controles não-imunizados. Expressão aumentada de linfócitos CD3 foi observada na lesão (242).

Metzler *et al.* verificaram que os estágios inflamatórios iniciais da ATC, induzidos pela imunização com Hsp 65, podem ser inibidos pela terapia imunossupressora com anticorpos monoclonais antiCD3 (243).

No presente estudo, a ocorrência de anticorpos de classe IgG Hsp 60 não determinou risco de associação com DOSAC, devido à frequência nula do teste em casos e grupo-controle.

O anticorpo IgG anti-Hsp 65 não se associou à presença do desfecho DOSAC.

Uma relação entre presença de infecção por *Chlamydia pneumoniae* e anticorpos anti-Hsp 65 foi recentemente reportada em pacientes com ATC de artéria femoral e de carótidas (244).

Uma associação potencial entre anticorpos anti-Hsp 60 e anti-Hsp 65 com AVCi é ainda incipiente na literatura médica. O estudo de Staub *et al.* (184), confirmatório desta associação, foi provavelmente o primeiro a avaliar o papel de ambos os anti-Hsp 60 e anti-Hsp 65 em uma mesma casuística.

A associação de IgG/IgM anti-Hsp 65 e anti-Hsp 70 com infarto cerebral foi averiguada por Gromadzka *et al.* em um total de 180 pacientes estudados na fase aguda do evento trombótico. O desfecho esteve significativamente associado à presença dos anticorpos ($P < 0.0001$). A análise multivariada confirmou que os anticorpos se comportaram como fatores de risco independentes para aterosclerose de vasos cerebrais (245).

Mantle *et al.*, em estudo de 1995, avaliaram a frequência de anti-Hsp 65 em 89 pacientes com infarto cerebral e em 90 controles pareados por sexo e idade. Diferente do presente estudo e daquele de Staub (184), cuja ELISA utilizou conjugado de peroxidase e ponto de corte a partir de densidade óptica 0.5, o ensaio enzimático utilizou conjugado de fosfatase alcalina e ponto de corte a partir de densidade óptica 0.4. Embora a maioria dos pacientes tenha exibido titulações maiores que os controles, as diferenças não foram estatisticamente significativas. As titulações do anticorpo aumentaram progressivamente com a idade em ambos os pacientes e controles. Os autores sugerem, desta forma, que anti-Hsp 65 seja marcador de envelhecimento e não de infarto cerebral. Não há detalhes sobre análise multivariada neste estudo (246).

Em relação à anti-Hsp 60, a prevalência foi averiguada em 292 pacientes com AVCi por Kramer *et al.* (247). Pacientes e controles não exibiram diferenças quanto ao grau de positividade no ensaio enzimático.

Lottermann *et al.* avaliaram recentemente o impacto da presença de anticorpos anti-Hsp 60/65 em pacientes com IAM. Em contraste com os achados de Staub (184) em AVCi, onde anticorpos anti-Hsp 60/65 se comportaram como fatores de risco para o desfecho, não houve associação entre estes anticorpos e a presença de IAM (248).

Prohaszka *et al.* avaliaram as anti-Hsp 60 humana e anti-Hsp 65 em uma coorte envolvendo três grupos de pacientes: 1) coronariopatas severos submetidos à cirurgia de revascularização; 2) pacientes com coronariografia normal; 3) controles sadios. Os níveis de anti-Hsp 60 foram consideravelmente mais altos no grupo 1 do que nos outros grupos. No grupo 1 anticorpos contra *Helicobacter pylori* se associaram à anti-Hsp 65, mas não com anti-Hsp 60. Em resumo, os achados sugerem associação de anticorpos anti-Hsp 60 humana com cardiopatia isquêmica (249).

A associação de anticorpos anti-Hsp 65 com ATC de carótidas foi originalmente avaliada em 1993, em 867 habitantes assintomáticos do Tirol. Níveis aumentados de anti-Hsp 65 foram detectados em idosos com obstrução carotídea. A associação se confirmou independentemente da presença de outros fatores de risco para ATC. Não houve relação entre título dos anticorpos e magnitude ecográfica das lesões ateroscleróticas (250).

Os mesmos autores avaliaram o valor preditivo dos anticorpos anti-Hsp 65 para surgimento e progressão da ATC carotídea, e acompanharam 750 indivíduos por cinco anos. Os títulos de anticorpos anti-Hsp 65 foram significativamente mais elevados nos pacientes que apresentaram lesões de ATC nas carótidas, independente de outros fatores de risco. Além disso, a ocorrência de anticorpos anti-Hsp 65 nesta população foi preditiva para mortalidade (251, 252).

O papel patogênico dos anticorpos anti-Hsp 60/65 em pacientes com infarto cerebral, doença coronariana, doença arterial periférica e doença carotídea é ainda incerto. O perfil destes anticorpos parece diferir nestes diversos grupos de pacientes. Embora fenômenos de auto-imunidade mediados por Hsp possam ser

de importância no processo aterosclerótico, os marcadores anti-Hsp, nos diversos sítios da doença aterosclerótica, ainda estão sob estudo.

O estudo dos mecanismos do processo aterosclerótico tem como objetivo encontrar formas de intervenção na instalação e desenvolvimento da doença aterosclerótica, atuando sobre a modificação de lipoproteínas, bloqueando macrófagos e dificultando a formação de células espumosas, impedindo a proliferação celular e a resposta imune-inflamatória da parede vascular, estabilizando a função endotelial, bloqueando os processos de coagulação e trombose ou, até mesmo, controlando um agente infeccioso. Portanto, a interferência a cada passo do mecanismo de aterogênese poderá beneficiar o paciente, protegendo-o da ocorrência de eventos clínicos.

7 CONCLUSÕES

1. Não houve associação entre teste positivo para aCL, IgG/IgM antibeta2-gpl, anti-Hsp e desfecho DOSAC.
2. A presença do isotipo IgA antibeta2-gpl se configurou como fator de risco independente para DOSAC com significância limítrofe. A associação de IgA antibeta2-gpl com DOSAC pode representar um dos elos entre auto-imunidade e aterosclerose carotídea. A utilização deste auto-anticorpo como marcador sorológico de ATC deve ser discutida em estudos futuros.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-6.
2. Nascimento CA, Patriarca G, Heimann JC. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP, organizadores. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2003. p.1-51.
3. Luz PL, Favarato D. A disfunção endotelial como índice prognóstico e alvo terapêutico. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP, organizadores. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2003. p.203-20.
4. Goldberg AC, Glotz D, Kalil J. O endotélio e o sistema imune. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP, organizadores. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2003. p.69-81.
5. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340:115-126.
6. Eldika N, Yerra L, Chi DS, Krishnaswamy G. Atherosclerosis as an inflammatory disease: implications for therapy. *Front Biosci*. 2004;9:2764-77.
7. Luz PL, Uint L. Endotélio na aterosclerose: interações celulares e vasomotricidade. In: Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP, organizadores. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2003. p.133-160.

8. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2002;8:1249-56.
9. Berenson GS, Wattigney WA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Srinivasan SR, Webber LS, et al. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries and cardiovascular risk factors in persons aged 6 to 30 years and studied at necropsy (The Bogalusa Heart Study). *Am J Cardiol.* 1992;70:851-8.
10. Strong JP. Atherosclerotic lesions. Natural history, risk factors, and topography. *Arch Pathol Lab Med.* 1992;116:1268-75.
11. Ross R The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med.* 1986; 314:488-500.
12. Schoen F Vasos sangüíneos. In: Cotran R, Kumar V, Robbins S, Schoen F, editores. *Patologia estrutural e funcional.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.414-56.
13. Montenegro M. Estrutura da parede vascular. In: Maffei F, Lastoria S, Yoshida W, Rollo H, editores. *Doenças vasculares periféricas.* Rio de Janeiro: Medsi; 2002. p. 179-91.
14. Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest.* 1988;58:249-61.
15. Sternby NH, Fernandez-Britto JE, Nordet P. Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PBDAY Study), 1986-96. *Bull World Health Organ.* 1999;77:250-7.
16. American Heart Association. [homepage na Internet]. Dallas: The Association; 2004. Heart disease: an stroke statistics – 2004 update. [capturado 2004 abr. 10] Disponível em: <http://www.americanheart.org>.
17. Banning M. The pathogenesis of atherosclerosis. Geneve: World Health Organization; 2000. p.1-18.

18. World Health Organization. Division of Epidemiological Surveillance and Health Situation and Trend Assessment Global Health. Situation analysis and projections: a preliminary result of a health futures study in support of health for all. Geneva: The Organization; 1996. p.1950-2025.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Estatísticas de mortalidade: Brasil 2000. Brasília: Centro de Documentação; 2000 [capturado 2003 mar. 15] Disponível em <http://www.datasus.gov.br>.
20. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1819-24.
21. MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1: Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet.* 1990;335:765-74.
22. Collins R, Peto R, MacMahon S, Herbert P, Fiebich NH, Eberlein KA, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2: Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990;335:827-38.
23. Hayden JM, Reaven PD. Cardiovascular disease in diabetes mellitus type 2: a potential role for novel cardiovascular risk factors. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:519-28.
24. Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1986;6:357-77.
25. Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10:417-28.

26. U.S. Department of Health and Human Services. Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progress. A Report of the Surgeon General. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. DHHS Publication No. (CDC) 89-8411, 1989.
27. Hu H, Pierce GN, Zhong G. The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest*. 1999;103:747-53.
28. LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*. 1999;282:2340-6.
29. Keaney JF Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*. 2000;21:99-166.
30. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295:369-77.
31. Pentikainen MO, Oomi K, Ala-Korpela M, Kovanen PT. Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *J Intern Med*. 2000;247:359-70.
32. Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis: current concepts. *JAMA*. 1990;264:3047-52.
33. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.
34. Krieger M. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8:275-80.
35. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76:333-7.

36. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88:1785-92.
37. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 2000;247:349-58.
38. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest.* 2001;107:255-61.
39. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques: coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol.* 1994;144:952-61.
40. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:5252-6.
41. Gimbrone MA Jr, Nagel T, Topper JN. Biochemical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest.* 1997;100:S61-5.
42. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol.* 2001;158:879-91.
43. Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation.* 1997;95:1062-71.
44. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 1998;93:229-40.
45. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-9.
46. Heistad DD. Unstable coronary-artery plaques. *N Engl J Med.* 2003;349:2285-87.

47. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture na thrombosis. *Circulation*. 1990;82: II47-59.
48. Guyton JR, Klemp KF. Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:4-11.
49. Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol*. 2002;15:439-46.
50. Shah PK. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:15s-22s.
51. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6:131-8.
52. Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1989;9:567-78.
53. Libby P, Hansson GK. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest*. 1991;64:5-15.
54. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptative immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2002;91:281-91.
55. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36-44.
56. Caligiuri G, Liuzzo G, Biasucci LM, Maseri A. Immune system activation follows inflammation in unstable angina: pathogenetic implications. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:1295-304.
57. Caligiuri G, Paulsson G, Nicoletti A, Maseri A, Hansson GK. Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. *Circulation* 2000;102:1114-9.

58. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, et al. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000;101:2883-8.
59. Weyand CM, Goronzy JJ, Liuzzo G, Kopecky SL, Holmes DR Jr, Frye RL. T-cell immunity in acute coronary syndromes. *Mayo Clin Proc*. 2001;76:1011-20.
60. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis: quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res*. 1983;53:502-14.
61. Imparato AM. The carotid bifurcation plaque: a model for the study of atherosclerosis. *J Vasc Surg*. 1986;3:249-55.
62. Imparato AM, Riles TS, Gorstein F. The carotid bifurcation plaque: pathologic findings associated with cerebral ischemia. *Stroke*. 1979;10:238-45.
63. Yuan C, Zhang SX, Polissar NL, Echelard D, Ortiz G, Davis JW, et al. Identification of fibrous cap rupture with magnetic resonance imaging is highly associated with recent transient ischemic attack or stroke. *Circulation*. 2000;105:181-5.
64. Fisher CM, Ojemann RG. A clinico-pathologic study of carotid endarterectomy plaques. *Rev Neurol (Paris)*. 1986;142:573-89.
65. O'Donnell TF Jr, Erdoes L, Mackey WC, McCullough J, Shepard A, Heggerick P, et al. Correlation of B-mode ultrasound imaging and arteriography with pathologic findings at carotid endarterectomy. *Arch Surg*. 1985;120:443-9.
66. Sterpetti AV, Schultz RD, Feldhaus RJ, Davenport KL, Richardson M, Farina C, et al. Ultrasonographic features of carotid plaque and the risk of subsequent neurologic deficits. *Surgery*. 1988;104:652-60.
67. Gomez CR. Carotid plaque morphology and risk for stroke. *Stroke*. 1990;21:148-51.

68. Pessin MS, Hinton RC, Davis KR, Duncan GW, Roberson GH, Ackerman RH, et al. Mechanisms of acute carotid stroke. *Ann Neurol.* 1979;6:245-52.
69. Avril G, Batt M, Guidoin R, Marois M, Hassen-Khodja R, Daune B, et al. Carotid endarterectomy plaques: correlations of clinical and anatomic findings. *Ann Vasc Surg.* 1991;5:50-4.
70. Torvik A, Svindland A, Lindboe CF. Pathogenesis of carotid thrombosis. *Stroke.* 1998;20:1477-83.
71. Ogata J, Masuda J, Yutani C, Yamaguchi T. Rupture of atheromatous plaque as a cause of thrombotic occlusion of stenotic internal carotid artery. *Stroke.* 1990;21:1740-5.
72. Tolosa A, Canelas H. *Propedêutica neurológica.* São Paulo: Prociex; 1972. p.210-24.
73. Gardner E, Gray DJ, O'Rahilly R. *Anatomia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1971. p.697-33.
74. Lane JC, Bellen BV. *O exame do paciente vascular.* São Paulo: Byk; 1995. p.88-104.
75. Ricci MA. The changing role of duplex scan in the management of carotid bifurcation disease and endarterectomy. *Semin Vasc Surg.* 1998;11:3-11.
76. Kuller LH, Cook LP, Friedman GD. Survey of stroke epidemiology studies: Committee on Criteria and Methods, Council of Epidemiology, American Heart Association. *Stroke.* 1972;3:579-85.
77. DATASUS [homepage na Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php> [dados de 1998 a 2001].
78. Kurvers HA, van der Graaf Y, Blankensteijn JD, Visseren FL, Eikelboom BC; SMART Study Group. Screening for asymptomatic internal carotid artery stenosis and aneurysm of the abdominal aorta: comparing the yield between patients with manifest atherosclerosis and patients with risk factors for atherosclerosis only. *J Vasc Surg.* 2003;37:1226-33.

79. Hertzner NR, Young JR, Beven EG, Graor RA, O'Hara PJ, Ruschhaupt WF 3rd, et al. Coronary angiography in 506 patients with extracranial cerebrovascular disease. *Arch Intern Med.* 1985;145:849-52.
80. Wiebers DO, Whisnant JP, Sandok BA, O'Fallon WM. Prospective comparison of a cohort with asymptomatic carotid bruit and a population-based cohort without carotid bruit. *Stroke.* 1990;21:984-8.
81. Sacco RL, Wolf PA, Kannel WB, McNamara PM. Survival and recurrence following stroke. The Framingham Study. *Stroke.* 1982;13:290-5.
82. Johnson BF, Verlatto F, Bergelin RO, Primozych JF, Strandness E Jr. Clinical outcome in patients with mild and moderate carotid artery stenosis. *J Vasc Surg.* 1995;21:120-6.
83. Muluk SC, Muluk VS, Sugimoto H, Rhee RY, Trachtenberg J, Steed DL, et al. Progression of asymptomatic carotid stenosis: a natural history study in 1004 patients. *J Vasc Surg.* 1999;29:208-14.
84. Rockman CB, Riles TS, Lamparello PJ, Giangola G, Adelman MA, Stone D, et al. Natural history and management of the asymptomatic, moderately stenotic internal carotid artery. *J Vasc Surg.* 1997;25:423-31.
85. Dixon S, Pais SO, Raviola C, Gomes A, Machleder HI, Baker JD, et al. Natural history of nonstenotic asymptomatic ulcerative lesions of the carotid artery: a further analysis. *Arch Surg.* 1982;117:1493-8.
86. Whisnant JP, Matsumoto N, Elveback LR. The effect of anticoagulant therapy on the prognosis of patients with transient cerebral ischemic attacks in a community: Rochester, Minnesota, 1955 through 1969. *Mayo Clin Proc.* 1973;48:844-8.
87. Baker RN, Schwartz WS, Ramseyer JC. Prognosis among survivors of ischemic stroke. *Neurology.* 1968;18:933-41.

88. Moore WS, Mohr JP, Najafi H, Robertson JT, Stoney RJ, Toole JF. Carotid endarterectomy: practice guideline. Report of the Ad Hoc Committee to the Joint Council of the Society for Vascular Surgery and the North American Chapter of the International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg.* 1992;15:469-79.
89. Wolf PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. Probability of stroke: a risk profile from the Framingham Study. *Stroke.* 1991;22:312-8.
90. A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet.* 1996;348:1329-39.
91. Wilson PW, Hoeg JM, D'Agostino RB, Silbershatz H, Belanger AM, Poehlmann H, et al. Cumulative effects of high cholesterol levels, high blood pressure, and cigarette smoking on carotid stenosis. *N Engl J Med.* 1997;337:516-22.
92. Crawford ES, De Bakey ME, Fields WS, Cooley DA, Morris GC Jr. Surgical treatment of atherosclerotic occlusive lesions in patients with cerebral arterial insufficiency. *Circulation.* 1959;20:168-80.
93. Mentzer RM Jr, Finkelmeier BA, Crosby IK, Wellons HA Jr. Emergency carotid endarterectomy for fluctuating neurologic deficits. *Surgery.* 1981;89:60-6.
94. Easton JD, Sherman DG. Stroke and mortality rate in carotid endarterectomy: 228 consecutive operations. *Stroke.* 1977;8:565-8.
95. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med.* 1991;325:445-53.
96. Ferguson GG, Eliasziw M, Barr HW, Clagett GP, Barnes RW, Wallace MC, et al. The North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial: surgical results in 1415 patients. *Stroke.* 1999;30:1751-8.
97. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. *Lancet.* 1991;337:1235-43.

98. Executive Committee for the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. Endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis. *JAMA*. 1995;273:1421-8.
99. Hobson RW 2nd, Weiss DG, Fields WS, Goldstone J, Moore WS, Towne JB, et al. Efficacy of carotid endarterectomy for asymptomatic carotid stenosis. The Veterans Affairs Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1993;328:221-7.
100. Mayberg MR, Wilson SE, Yatsu F, Weiss DG, Messina L, Hershey LA, et al. Carotid endarterectomy and prevention of cerebral ischemia in symptomatic carotid stenosis. Veterans Affairs Cooperative Studies Program 309 Trialist Group. *JAMA*. 1991;266:3289-94.
101. Yates GN, Bergamini TM, George SM Jr, Hamman JL, Hyde GL, Richardson JD. Carotid endarterectomy results from a state vascular society. Kentucky Vascular Surgery Society Study Group. *Am J Surg*. 1997;173:342-4.
102. Gagne PJ, Matchett J, MacFarland D, Hauer-Jensen M, Barone GW, Eidt JF, et al. Can the NASCET technique for measuring carotid stenosis be reliably applied outside the trial? *J Vasc Surg*. 1986; 24:449-56.
103. Baker WH, Littooy FN, Hayes AC, Dorner DB, Stubbs D. Carotid endarterectomy without a shunt: the control series. *J Vasc Surg*. 1984;1:50-6.
104. Imparato AM, Ramirez A, Riles T, Mintzer R. Cerebral protection in carotid surgery. *Arch Surg*. 1982;117:1073-8.
105. Riles TS, Imparato AM, Posner MP, Eikelboom BC. Common carotid occlusion: assessment of the distal vessels. *Ann Surg*. 1984;199:363-6.
106. Ramacciotti O, Ramacciotti E. Endarterectomia: convencional e por eversão. In: Maffei FHA, Lastoria S, Yoshida WB, Rollo HA, editores. *Doenças vasculares periféricas*. 3^a.ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2002. p.775-88.
107. Blaisdell WF, Clauss RH, Galbraith JG, Imparato AM, Wylie EJ. Joint study of extracranial arterial occlusion. IV. A review of surgical considerations. *JAMA*. 1969;209:1889-95.

108. Thompson JE, Patman RD, Talkington CM. Asymptomatic carotid bruit: long-term outcome of patients having endarterectomy compared with nonoperative controls. *Ann Surg.* 1978;188:308-16.
109. Hertzner NR, Flanagan RA Jr, Beven EG, O'Hara PJ. Surgical versus nonoperative treatment of symptomatic carotid stenosis, 211 patients documented by intravenous angiography. *Ann Surg.* 1986;204:154-62.
110. Moore WS, Boren C, Malone JM, Roon AJ, Eisenberg R, Goldstone J, et al. Natural history of nonstenotic, asymptomatic ulcerative lesions of carotid artery. *Arch Surg.* 1978;113:1352-9.
111. Svindland A, Torvik A. Atherosclerotic carotid disease in asymptomatic individuals: a histologic study of 53 cases. *Acta Neurol Scand.* 1988;78:506-17.
112. Imparato AM. Carotid endarterectomy to prevent stroke III based on pathologic findings at the carotid bifurcation. In: Veith FJ, editor. *Current critical problems in vascular surgery.* St Louis: Quality Medical Publishing. 1989. p.548-52.
113. Reid HL, Dormandy JA, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy TL. Impaired red cell deformability in peripheral vascular disease. *Lancet.* 1976;1:666-8
114. Pulsinelli WA. Ischemic cerebrovascular disease. In: Goldman L, Bennett JC, editors. *Cecil textbook of medicine.* 21st. ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p.2099-109.
115. Caplan LR. Cerebrovascular disease (Stroke). In: Stein JH, editor. *Internal medicine.* 5th.ed. Saint Louis: Mosby; 1998. p.997-1007.
116. Wolf PA, Kannel WB, McGee DL. Prevention of ischemic stroke: risk factors. In: Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM, editors. *Stroke: pathophysiology, diagnosis and management.* 2nd.ed. Churchill Livingstone 1992. p.967-88.

117. Parthasarathy S, Steinberg D, Witztum JL. The role of oxidized low-density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med.* 1992;43:219-55.
118. Falk E, Fuster V. Atherogenesis and its determinants. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, Roberts R, King III SB, Welens HJJ, editors. *Hurst's the Heart.* 10th ed. New York: McGraw Hill; 2001. p.1078-9.
119. Glagov S, Ozoa AK. Significance of the relatively low incidence of atherosclerosis in the pulmonary, renal and mesenteric arteries, *Ann N Y Acad Sci.* 1968;149:940-55.
120. Xu C, Lee S, Singh TM, Sho E, Li X, Sho M, et al. Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. *J Vasc Surg.* 2001;33:570-8.
121. American Diabetes Association. *Managing diabetes in the 1990s.* Alexandria: The Association; 1989.
122. Wilson PWF, Kannel WB. Epidemiology of hyperglycemia and atherosclerosis. In: Ruderman NB, Williamson J, Brownlee M, editors. *Hyperglycemia, diabetes and vascular disease.* New York: Oxford Press 1992. p.21-9.
123. Lopes-Virella M, Virella G. Immune mechanism of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes.* 1992;41:86-91.
124. Olsson AG, Molgaard J. Relations between smoking, food intake and plasma lipoproteins. *Adv Exp Med Biol.* 1990;273:237-43.
125. Hawkins RI. Smoking, platelets, and thrombosis. *Nature.* 1972;236:450-2.
126. Woll P, Cobb JL, D'Agostino RB. Epidemiology of stroke. In: Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM, editors. *Stroke: pathophysiology, diagnosis and management.* 2nd ed. Churchill Livingstone 1992. p. 3-27.
127. Carpenter JP, Owen RS, Holland GA, Baum RA, Barker CF, Perloff LJ, et al. Magnetic resonance angiography of the aorta, iliac, and femoral arteries. *Surgery.* 1994;116:17-23.

128. Kent KC, Kuntz KM, Patel MR, Kim D, Klufas RA, Whittemore AD, et al. Perioperative imaging strategies for carotid endarterectomy: an analysis of morbidity and cost-effectiveness in symptomatic patients. *JAMA*. 1995;274:888-93.
129. Yucel EK, Anderson CM, Edelman RR, Grist TM, Baum RA, Manning WJ, et al. AHA scientific statement. Magnetic resonance angiography: update on applications for extracranial arteries. *Circulation*. 1999;100:2284-301.
130. Culebras A, Kase CS, Masdeu JC, Fox AJ, Bryan RN, Grossman CB, et al. Practice guidelines for the use of imaging in transient ischemic attacks and acute stroke: a report of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*. 1997;28:1480-97.
131. Harris EM. Antiphospholipid syndrome. In: Klippel JH, Dieppe P, editors. *Rheumatology*. 2nd.ed. St. Louis: Mosby, 1998. p.1-6.
132. Harris EM, Ghavari AE, Hughes GRV. Antiphospholipid antibodies. *Clin Rheum Dis*. 1986;11:591-609.
133. Love PE, Santoro AS. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus and erythematosus (SLE) in non-SLE disorders: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med*. 1990;112:682-98.
134. Meroni PL, Raschi E, Camera M, Testoni C, Nicoletti F, Tincani A, et al. Endothelial activation by aPL: a potential pathogenetic mechanism for the clinical manifestations of the syndrome. *J Autoimmun*. 2000;15:237-40.
135. Vaarala O, Alfthan G, Jauhiainen M, Leirisalo-Repo M, Aho K, Palosuo T. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 1993;341:923-5.
136. Kandiah DA, Krilis SA. Beta 2-glycoprotein I. *Lupus*. 1994;3:207-12.
137. Wilson WA, Ghavari AE, Koike T. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum*. 1999;42:1309-11.

138. Asherson RA, Cervera R. "Primary", "secondary" and other variants of the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 1994;3:293-8.
139. Vianna JL, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Font J, Cervera R, Lopez-Soto A, et al. Comparison of the primary and secondary antiphospholipid syndrome: a European multicenter study of 114 patients. *Am J Med*. 1994;96:3-9.
140. Greaves M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Lancet*. 1999;353:1348-53.
141. Harris EN, Chan JKH, Asherson RA. Thrombosis, recurrent fetal loss and thrombocytopenia: predictive value of the anticardiolipin antibody test. *Arch Intern Med*. 1986;146:2153-6.
142. Sammaritano LR, Sobel R. Anticardiolipin IgG subclasses: associations of IgG2 with arterial and/or venous thrombosis. *Arthritis Rheum*. 1997;40:1998-2006.
143. de Laat HB, Derksen RHW, Groot PG. Beta2-Glycoprotein I, the playmaker of the antiphospholipid syndrome. *Clin Immunol*. 2004;112:161-8.
144. Conti F, Sorice M, Circella A, Alessandri C, Pittoni V, Caronti B, et al. Beta-2-glycoprotein I expression on monocytes is increased in anti-phospholipid antibody syndrome and correlates with tissue factor expression. *Clin Exp Immunol*. 2003;132:509-16.
145. Steinkasserer A, Cickburn DJ, Black DM, Assignment of apolipoprotein H (beta2-gpl) to human chromosome 17q 23-qter determination of the major expression site. *Cytogenet Cell Genet*. 1992;60:31-3.
146. Harats D, George J. Beta-2-glycoprotein I and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12:543-6.
147. Hunt JE, McNeil HP, Morgan GJ. A phospholipid-beta2-gpl complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection. *Lupus*. 1992;1:75-81.

148. Gharavi AE, Sammaritano LR, Borasttro JL. Specificities and characteristics of beta2-gpl-induced antiphospholipid antibodies. *J Clin Lab Med.* 1995;125:775-8.
149. Matsuura E, Kobayashi K, Koike T, Shoenfeld Y, Khamashta MA, Hughes GR. Oxidized low-density lipoprotein as a risk factor of thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 2003;12:550-4.
150. Salemink I, Blezer R, Willems GM, Galli M, Bevers E, Lindhcut T. Antibodies to beta2-glycoprotein I associated with antiphospholipid syndrome suppress the inhibitory activity to tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemostasis.* 2000;84:653-6.
151. Galli M, Comfurius P, Maassen C. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma proteins cofactor. *Lancet.* 1990;335:1544-7.
152. Tsutsumi A, Matsuura E, Ichikawa K. Antibodies to beta2-glycoprotein I and clinical manifestations in patients with systemic lupus erithematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1466-74.
153. Hasunuma Y, Matsuura E, Makita Z, Katahira T, Nishi S, Koike T. Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin. *Clin Exp Immunol.* 1997;107:560-73.
154. Subang R, Levine JS, Janoff AS. Phospholipid bound beta2-gpl induces the production of antiphospholipid antibodies. *J Autoimmun.* 2000;15:21-32.
155. Krilis SA, Sheng YH, Kandiah DA. The role of beta 2-glycoprotein I in the antiphospholipid syndrome. *Lupus.* 1996;5:150-2.
156. Arnout J, Wittevrongel C, Vanrusselt M. Beta2-gpl dependent lupus anticoagulants form stable bivalent antibody-beta2-gpl complexes on phospholipid surfaces. *Thromb Haemost.* 1998;79:79-86.
157. Hanly JG, Smith SA. Anti-beta2-gpl (GPI) autoantibodies, annexin V binding and the antiphospholipid syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2000;120:537-43.

158. Bondanza A, Sabbadini MG, Pellegata F. Anti-beta2-gpl antibodies prevent the de-activation of platelets and sustain their phatocytic clearence. *J Autoimmun.* 2000;15:469-77.
159. Del Papa N, Guidali L, Spatola L, Bonara P, Borghi MO, Tincani A, et al. Relationship between antiphospholipid and anti-endothelial cell antibodies: beta2-gpl mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. *Clin Exp Rheumatol.* 1995;13:179-85.
160. Matsuura E, Kobayashi K, Koike T, Shoenfeld Y. Autoantibody-mediated atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2002;1:348-53.
161. George J, Harats D, Gilburd B. Immunolocalization of beta2-gpl (apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques: potential implications for lesion progression. *Circulation.* 1999;99:2227-30.
162. George J, Afek A, Gilburd B. Induction of early atherosclerosis in LDL-receptor-deficient mice immunized with beta2-gpl. *Circulation.* 1998;98:1108-15.
163. Afek A, George J, Shoenfeld Y. Enhancement of atherosclerosis in beta2-gpl-immunized apolipoprotein E-deficient mice. *Pathobiology.* 1999;67:19-25.
164. Lindquist S. The heat shock response. *Ann Rev Biochem.* 1986;55:1151-91.
165. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Ann Rev Biochem.* 1988;22:631-77.
166. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science.* 1993;259:1409-10.
167. Lamb D, El-Sankary W, Ferns GAA. Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis.* 2003;167:177-85.
168. Wick G, Xu Q. Atherosclerosis: an autoimmune disease. *Exp Gerontol.* 1999;34:559-66.

169. Wick G, Kleindienst R, Schett G, Amberger A, Xu Q. Role of heat shock protein 65/60 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995;107:130-1.
170. Mandal K, Jahangiri M, Xu Q. Autoimmunity to heat shock proteins in atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2004;3:31-7.
171. Young RA, Elliot TJ. Stress proteins infection, and immune surveillance. *Cell.* 1989;59:5-8.
172. van Eden W, Young DV. *Stress proteins in medicine.* New York: Marcel Dekker; 1995.
173. Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willeit J, Schett G, Xu Q, et al. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*: immune reaction to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation.* 1999;30:1560-6.
174. Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ, Gown AM, Schoel B, Mikuz G, et al. Induction of atherosclerosis in normocholesterolemic rabbits by immunization with heat shock protein 65. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:789-99.
175. Metzler B, Mayr M, Dietrich H, Singh M, Wiebe E, Xu Q, et al. Inhibition of atherosclerosis by T-cell depletion in normocholesterolemic rabbits immunized with heat shock protein 65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1905-11.
176. Schett G, Xu Q, Amberger A, Van der Zee R, Recheis H, Willeit J, et al. Autoantibodies against Hsp 60 mediate endothelial cytotoxicity. *J Clin Invest.* 1995;96:2569-77.
177. Frostegard J, Kjellman B, Gidlund M, Andersson B, Jundal S, Kiessling R. Induction of heat shock protein in monocytic cells by oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis.* 1996;121:93-103.

178. Zhu J, Quyyumi AA, Rott D. Antibodies to human heat shock protein 60 are associated with the presence and severity of coronary artery disease: evidence for an autoimmune component of atherogenesis. *Circulation*. 2001;103:1071-5.
179. Klouche M, May AE, Hemmes M, Messner M, Kanse SM, Preissner KT, et al. Enzymatically modified, monoxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human endothelial cell monolayers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:784-93.
180. Keaney JF Jr, Vita JA. Vascular oxidative stress and antioxidant protection in atherosclerosis: what do the clinical trials say? *J Cardiopulm Rehabil*. 2002;22:225-33.
181. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, Bertolaccini ML, Makino H, Sakairi N, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: Implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res*. 2003;44:716-26.
182. Shoenfeld Y, Sherer Y, George J, Harats D. Auto antibodies associated with atherosclerosis. *Ann Med*. 2000;32(suppl 1):37-40.
183. Yla-Herttuala S. Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:337-44.
184. Staub HL, Norman GL, Crowther T, da Cunha VR, Polanczyk A, Bohn JM, et al. Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein I and heat-shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003;61:757-63.
185. Ranzolin A, Bohn J, Norman GL, Manenti E, Bodanese LC, von Mühlen CA, et al. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies as risk factors for acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2004;83:141-4.
186. Franck M. Auto-anticorpos contra fosfolípidos e proteínas de choque térmico em pacientes com doença arterial periférica sintomática [tese]. Porto Alegre(RS): PUCRS; 2004.

187. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, et al. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1992;339:883-7.
188. Wu R, Nityanand S, Berglund L, Lithell H, Holm G, Lefvert AK. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in a 50-years-old men predict myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3159-63.
189. Ehara S, Ueda M, Nakuro T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;103:1955-60.
190. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003;289:2560-72.
191. Rosemberg J. *Tabagismo: sério problema de saúde pública*. São Paulo; Almed; 1987.
192. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20:1183-97.
193. Witzum JL, Steinberg D. The hyperlipoproteinemias. In: Goldman L, Bennett JC, editors. *Cecil textbook of medicine*. 21st ed. Philadelphia:WB Saunders; 2000. p.1090-100.
194. Cervera R, Piette JC, Font J, Kamasha MA, Shoenfeld Y, Camps MT, et al. Antiphospholipid syndrome clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1000 patients. *Arthritis Rheum*. 2002;46:1019-27.
195. Nederkoorn PJ, van der Graaf Y, Hunink M. Duplex ultrasound and magnetic resonance angiography compared with digital subtraction angiography in carotid artery stenosis. *Stroke*. 2003;34:1324-32.

196. Gharavi AE, Harris EN, Asherson RA, Hughes GR. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis.* 1987;46:1-6.
197. Harris EN, Gharavi AE, Patel S. Evaluation of the anticardiolipin antibody test: report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol.* 1987;68:215-22.
198. Harris EN. The second international anticardiolipin standardization workshop: the Kingston Antiphospholipid Antibody Study (KAPS). *Am J Clin Pathol.* 1990;94:474-84.
199. Lewis S, Keil LB, Binder WL. Standardized measurement of major immunoglobulin class (IgG, IgA, IgM) antibodies to beta2-gpl in patients with antiphospholipid syndrome. *J Clin Lab Anal.* 1998;12:293-7.
200. Agresti A. *Categorical data analysis.* New York: Wiley; 1990.
201. Hopkins WG. A new view of statistics. [capturado 2002 abr.11]. Disponível em: [http:// http://www.sportsci.org/resource/stats/index.html](http://www.sportsci.org/resource/stats/index.html)
202. Szitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 2003;108:1917-23.
203. Szitko PE, Wang CH, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. *Circulation.* 2003;108:2041-8.
204. Tejada C, Strong JP, Montenegro MR, Restrepo C, Solberg LA. Distribution of coronary and aortic atherosclerosis by geographic location, race, and sex. *Lab Invest.* 1968;18:509-26.
205. Hughson WG, Mann JI, Garrod A. Intermittent claudication: prevalence and risk factors. *Br Med J.* 1978;1:1379-81.
206. Stout RW. Diabetes, atherosclerosis and aging. *Diabetes Care.* 1990;13:20-3.

207. Reunanen A, Takkunen H, Aromaa A. Prevalence of intermittent claudication and its effect on mortality. *Acta Med Scand.* 1982;211:249-56.
208. Mandal K, Foteinos G, Jahangiri M, Xu Q. Role of antiheat shock protein 60 autoantibodies in atherosclerosis. *Lupus.* 2005;14:742-6.
209. Sherer Y, Shoenfeld Y. Antiphospholipid antibodies: are they pro-atherogenic or an apiphenomenon of atherosclerosis? *Immunobiol.* 2003;207:13-6.
210. Lamb DJ, Tickner ML, Dreux AC, El-Sankary W, Hourani SM, Eale-Reynolds LJ, et al. Impairment of vascular function following BCG immunisation is associated with immune response to HSP-60 in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis.* 2004;172:13-20.
211. Matsuura E, Kobayashi K, Koike T, Shoenfeld Y, Kamachta MA, Hughes GRV. Atherogenic autoantigen: oxidized LDL complexes with beta2-glycoprotein I. *Immunobiol.* 2003;207:17-22.
212. Bason C, Corrocher R, Lunardi C, Puccetti P, Olivieri O, Girelli D, et al. Interaction of antibodies against cytomegalovirus with heat-shock protein 60 in pathogenesis of atherosclerosis. *Lancet.* 2003;362:1971-7.
213. Antiphospholipid Antibodies in Stroke Study (APASS) Group. Anticardiolipin antibodies are an independent risk factor for first ischemic stroke. *Neurology.* 1993;43:2069-73.
214. Metz LM, Edworthy S, Mydlarski R. The frequency of phospholipid antibodies in an unselected stroke population. *Can J Neurol Sci.* 1998;25:64-9.
215. Kushner MJ. Prospective study of anticardiolipin antibodies in stroke. *Stroke.* 1990;21:295-8.
216. Muir KW, Squire JB, Alwan W. Anticardiolipin antibodies in an unselected stroke population. *Lancet.* 1994;334:452-6.
217. de Godoy JMP, Batigália F, de Godoy MRP, Brandão AC, Souza DRS. Anticardiolipin antibodies as a risk factor of atherosclerosis in intermittent claudication. *Angiology.* 2004;55:357-59.

218. Evans SM, Brittenden J, Adam DJ, Ludlan C, Bradbury AW. Vascular surgical society of Great Britain and Ireland: prevalence and significance of thrombophilia in patients with intermittent claudication. *Br J Surg.* 1999;86:702-3.
219. Friehs I, Eber B, Friehs G, Langsteger W, Koch G. IgG-anticardiolipin-antibodies are makers for cerebral and peripheral artery disease. *Vasa.* 1992;21:158-62.
220. Lam EY, Taylor LM Jr, Landry GJ, Porter JM, Moneta GL. Relationship between antiphospholipid antibodies and progression of lower extremity arterial occlusive disease after lower extremity bypass operations. *J Vasc Surg.* 2001;33:976-82.
221. Lang TA, Secic M. Comparing groups. In: *How to report statistics in medicine: annotated guidelines for authors, editors, and reviewers.* Philadelphia: American College of Physicians; 1997. p.65-80. [Series: Medical writing and communication]
222. Veres K, Lakos G, Kerenyi A, Szekanecz Z, Szegedi G, Shoenfeld Y, et al. Antiphospholipid antibodies in acute coronary syndrome. *Lupus.* 2004;13:423-7.
223. Loannidis JP, Tektonidou MG, Vlachoyiannopoulos PG. HLA associations of anti-beta2-gpI response em a Greek cohort with antiphospholipid syndrome and meta-analysis of four ethnic groups. *Hum Immunol.* 1999;60:1274-80.
224. Gomes LF, Alves AF, Sevanian A, Peres Cde A, Cendoroglo MS, de Mello-Almada C, et al. Role of beta2-glycoprotein I, LDL-, and antioxidant levels in hypercholesterolemic elderly subjects. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6:237-44.

225. Matsuura E, Kobayashi K, Shoenfeld Y, Lopez LR. Atherogenic role of protein-modified oxidized low-density lipoprotein and their autoantibodies. In: Conrad K, Bachmann MP, Chan EKL, Fritzler MJ, Humbel RL, Sack U, et al, editors. From animal models to human genetics: research on the induction pathogenicity of autoantibodies. Report on the 7th. Dresden Symposium on Autoantibodies; 2004 Sept 1-4; Dresden, Holland. Miami: Pabst Science Publishers; 2004. p.388-405. [Series: Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity ; v. 4]
226. Ward MM. Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:338-46.
227. Aranow C, Ginzler EM. Epidemiology of cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2000;9:166-9.
228. Reber G, Shousboe I, Tincani A, Sanmarco M, Kveder T, Moerlose P, et al. Inter-laboratory variability of Anti-beta2-glycoprotein I measurement. *Thromb Haemost.* 2002;88:66-73.
229. Reber G, Moerlose P. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies: when and how should they be measured? *Thromb Res.* 2004;114:527-31.
230. Shoenfeld Y, Harats D, George J. Atherosclerosis and the antiphospholipid syndrome a link unraveled? *Lupus.* 1998;7:1-4.
231. George J, Afek B, Gilburd Y, Levy Y, Blank M, Kopolovic J, et al. Atherosclerosis in LDL-receptor knockout mice is accelerated by immunization with anticardiolipin antibodies. *Lupus.* 1997;6:723-9.
232. George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Shaish A, Kopolovic J, et al. Adoptive transfer of beta2-glycoprotein I-reactive lymphocytes enhances early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation.* 2000;102:1822-7.
233. Perschinka H, Mayr M, Millonig G, Mayerl C, van der Zee R, Morrison SG, et al. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1060-5.

234. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:441-69.
235. Wick G, Perschinka H, Millonig G. Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. *Trends Immunol.* 2001;22:665-9.
236. Uray K, Hudecz F, Fust G, Prohaszka Z. Comparative analysis of linear antibody epitopes on human and mycobacterial 60-kDa heat shock proteins using samples of healthy blood donors. *Int Immunol.* 2003;15:1229-36.
237. Dieude M, Senecal JL, Raymond Y. Induction of endothelial cell apoptosis by heat-shock protein 60-reactive antibodies from anti-endothelial cell autoantibody-positive systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3221-31.
238. Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1547-59.
239. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydia heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. *Circulation.* 1998;98:300-7.
240. Satochi K, Kobayashi T, Ishii N, Ikeda J, Shinobe Y, Houkin K, et al. Role of Chlamydia pneumoniae-infected macrophages in atherosclerosis developments of the carotid artery. *Neuropathology.* 2003;23:1-8.
241. Shoenfeld Y, Harats D, George J. Heat shock protein 60/65, beta2-glycoprotein I and oxidized LDL as players in murine atherosclerosis. *J Autoimmun.* 2000;15:199-202.
242. Afek A, George J, Gilburd B, Rauova L, Goldberg I, Kopolovic J, et al. Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. *J Autoimmun.* 2000;14:115-21.

243. Xu Q, Kiechl S, Mayr M, Metzler B, Egger G, Oberhollenzer F, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis : clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation*. 1999;100:1169-74.
244. Mayr M, Kiechl S, Willeit J, Wick G, Xu Q. Infections, immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and cytomegalovirus with immune reactions to heat shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation*. 2000;102:833-9.
245. Gromadzka G, Zielinska J, Ryglewicz D. Elevated levels of anti-heat shock protein antibodies in patients with cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis*. 2001;12:235-9.
246. Mantle R, Singh B, Hacinski V. Do serum antibodies to heat shock protein 65 relate to age or stroke? [letter] *Lancet*. 1995;346:1715.
247. Kramer J, Harcos P, Prohaszka Z. Frequencies of certain complement protein alleles and serum levels of anti-heat shock protein antibodies in cerebrovascular diseases. *Stroke*. 2000;31:2648-52.
248. Lottermann A, Ranzolin A, von Mühlen CA, Staub HL. Anticorpos contra proteínas de choque térmico, autoimunidade e aterosclerose. *Rev Bras Reumatol*. 2003;43:302-8.
249. Prohaszka Z, Duba J, Horvath L. Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat shock proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects. *Eur J Clin Invest*. 2001;31:285-92.
250. Xu Q, Willeit J, Marosi M. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1993;341:255-9.

251. Zhu J, Katz RJ, Quyyumi AA, Canos DA, Rott D, Csako G, et al. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with coronary calcification levels: suggestion of pathogen-triggered autoimmunity in early atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109:36-41.
252. Xu Q, Schett G, Perschinka H, Mayr M, Egger G, Oberhollenzer F, et al. Serum soluble heat shock protein 60 is elevated in subjects with atherosclerosis in a general population. *Circulation*. 2000;102:14-20.

9 ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO POPULAÇÃO ALVO - CASOS

“AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES E ANTIPROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EM DOENÇA OBSTRUTIVA SEVERA DE ARTÉRIAS CARÓTIDAS”

I – Justificativa e objetivos da pesquisa:

A circulação e o suprimento sanguíneo do cérebro se dão, principalmente, através das artérias carótidas que estão situadas no pescoço e levam o sangue proveniente do coração até o crânio. Doença obstrutiva de artérias carótida (DOAC) significa a presença de placas de gordura (ateromas) que determinam o entupimento progressivo da passagem do sangue ao nível destas artérias que, se não tratadas, podem causar o derrame cerebral. No caso de obstruções graves, a melhor opção de tratamento para se evitar o derrame é a cirurgia denominada de “endarterectomia de carótida”, a qual é atualmente indicada com base, exclusivamente, no percentual de estreitamento. Por exemplo, estudos recentes demonstram que na doença obstrutiva de coronárias há um componente de inflamação que contribui para a instabilidade da doença, aumentando a chance de angina de peito e de infarto do miocárdio, e que esta atividade inflamatória pode ser medida através de determinadas substâncias no sangue. O objetivo deste trabalho é verificar se a presença destas substâncias inflamatórias no sangue de pacientes com doença obstrutiva de carótidas, está associada a sinais de instabilidade da placa de ateroma e risco de derrame cerebral.

II – Os procedimentos a serem utilizados:

Será realizado um exame nos pacientes com DOAC e possível indicação de endarterectomia de carótida: ressonância magnética da região cervical (pescoço), mais propriamente das artérias carótidas, para determinar as características da doença (estreitamento, placa de ateroma e oclusão). Para verificar-se a presença dos marcadores de inflamação no organismo dos pacientes com DOAC, necessitar-se-á coletar 10 ml de sangue de veia periférica no momento da cirurgia no bloco cirúrgico. Portanto, será utilizada a mesma punção (agulha) pela qual o anestesista administrará a anestesia.

III – Os desconfortos ou riscos esperados:

Poderá ocorrer desconforto ou fobia durante a ressonância magnética, conforme a intensidade o exame será interrompido. Existe um risco remoto (menor que 1%) de reações alérgicas ao contraste utilizado que estão previstos quanto ao seu tratamento dentro da rotina desta unidade.

O paciente poderá apresentar dor no local da punção da veia que servirá para a coleta de sangue e, posteriormente, para a indução da anestesia visando o procedimento cirúrgico.

Não há aumento no risco de complicações pós-operatórias ou mesmo de óbito relacionado ao estudo.

IV - Os benefícios que se pode obter:

Se for confirmada a presença dos marcadores inflamatórios no sangue dos pacientes com DOAC, isto contribuirá para detectar-se com mais precocidade os

casos de DOAC com risco de derrame cerebral, e um tratamento efetivo poderá, então, ser iniciado nestes pacientes.

V – Direitos do paciente:

- a) garantia de resposta a qualquer pergunta;
- b) liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si;
- c) garantia de privacidade.

VI – Atribuições do pesquisador:

- a) compromisso com informação atualizada do estudo;
- b) disponibilidade de tratamento médico e indenização em caso de danos;
- c) garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Eu..... (paciente ou responsável) fui informado dos objetivos desta pesquisa de maneira detalhada.

Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu desejar. O Dr. Mateus Recuero Lopes (pesquisador responsável) certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação, face a estas informações.

Fui informado de que caso existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização, conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Caso tiver novas perguntas sobre

o estudo, posso chamar o Dr. Mateus Recuero Lopes (pesquisador responsável) no telefone (0XX-51-3336 8190). Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

...../...../.....
Assinatura do paciente Nome Data

...../...../.....
Assinatura do pesquisador Nome Data

Este formulário foi lido para..... (nome do paciente), em...../...../...../ (data), pelo.....(nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

...../...../.....
Assinatura da testemunha Nome Data

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO

GRUPO CONTROLE – PACIENTES INTERNADOS NO SERVIÇO DE

ORTOPEDIA

“AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES E ANTIPROTEÍNAS DE

CHOQUE TÉRMICO EM DOENÇA OBSTRUTIVA SEVERA DE ARTÉRIAS

CARÓTIDAS”

I – Justificativa e objetivos da pesquisa:

A circulação e o suprimento sanguíneo do cérebro se dão principalmente através das artérias carótidas que estão situadas no pescoço e levam o sangue proveniente do coração até o crânio. Doença obstrutiva de artérias carótida (DOAC) significa a presença de placas de gordura (ateromas) que determinam entupimento progressivo da passagem do sangue ao nível destas artérias que, se não tratadas, podem causar o derrame cerebral. Por exemplo, estudos recentes demonstram que na doença obstrutiva de coronárias (coração) há um componente de inflamação que contribui para a instabilidade da doença, aumentando a chance de angina de peito e de infarto do miocárdio, e que esta atividade inflamatória pode ser medida através de determinadas substâncias no sangue. O objetivo deste trabalho é verificar se a presença destas substâncias inflamatórias no sangue de pacientes com doença obstrutiva de carótidas, também está associada a sinais de instabilidade da placa de ateroma e risco de derrame cerebral. Para que este estudo tenha validade, necessita-se pesquisar

estas substâncias inflamatórias no sangue de pacientes sem a doença obstrutiva de artérias carótidas para comparar-se os resultados.

II – Os procedimentos a serem utilizados:

Para verificar-se se as substâncias inflamatórias estarão presentes no organismo dos pacientes-controles, necessitar-se-á da coleta de 10 ml de sangue de veia periférica.

III – Os desconfortos ou riscos esperados:

O paciente poderá apresentar dor no local da punção da veia durante e após a coleta de sangue. Além disso, poderá ocorrer uma equimose (mancha roxa) no local da punção.

IV – Os benefícios que se pode obter:

Se for confirmado que apenas os pacientes com DOAC possuem alterações significativas nos testes sangüíneos, se poderá concluir que as substâncias inflamatórias em estudo são um fator de risco para DOAC e isto pode desenvolver novos caminhos para diagnóstico, terapêutica e seguimento.

V – Direitos do paciente:

- a) garantia de resposta a qualquer pergunta;
- b) liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si;
- c) garantia de privacidade.

VI – Atribuições do pesquisador:

- a) compromisso com a informação atualizada do estudo;
- b) disponibilidade de tratamento médico e indenização em caso de danos;
- c) garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Eu..... (paciente ou responsável) fui informado dos objetivos desta pesquisa de maneira detalhada.

Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu desejar. O Dr. Mateus Recuero Lopes (pesquisador responsável) certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referentes ao paciente serão confidenciais e terei liberdade de retirar meu consentimento de, face a estas informações.

Fui informado de que caso existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Caso tiver novas perguntas sobre o estudo, posso chamar o Dr. Mateus Recuero Lopes (pesquisador responsável) no telefone (0XX-51-3336 8190). Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

...../...../.....

Assinatura do paciente

Nome

Data

...../...../.....

Assinatura do pesquisador

Nome

Data

Este formulário foi lido para..... (nome do paciente) em...../...../...../ (data), pelo.....(nome do pesquisador), enquanto eu estava presente.

...../...../.....

Assinatura da testemunha

Nome

Data

ANEXO III

**PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL
POPULAÇÃO ALVO – CASOS**

Nº.....

Nome:.....Prontuário:.....

Sexo: [1] Masculino [2] Feminino Idade:.....

Endereço:.....

Telefone p/contato:.....

Data da internação:.....

Fatores de risco CV:

Tabagismo [] Ativo:.....cig/dia [] passado: fumou dos.....anos até.....anos []
nunca fumou

[] HAS

[] DM

[] História familiar positiva (IAM ou morte súbita em homem<55^a e mulher<60^a)

[] Obesidade

Atividade física regular: (horas/semana): [] não [] 1-3 [] 4-6 [] >6

História cardíaco-vascular:

[] Angina estável [] IAM prévio Data:...../...../.....

[] Cateterismo – Data:...../...../..... [] ACTP [] CRM - Data:...../...../.....

[] FA Paroxística [] FA crônica [] Flutter atrial

[] AIT prévios: Data:...../...../..... Data:...../...../..... Data:...../...../.....

[] AVC prévios: Data:...../...../..... Data:...../...../..... Data:...../...../.....

História médica pregressa:

[] Doença vascular periférica [] Doença hepática leve [] Doença cerebrovascular

[] Demência

[] Doença tecido conjuntivo [] Doença hep.mod/grave [] Úlcera [] Hemiplegia

[] DMc/lesão órgão-alvo [] Doença renal mod/grave [] Diabetes mellitus [] DPOC

[] Tu sólido metastático [] Neoplasia [] AIDS

[] Outras:.....

Fármacos na admissão (nome, doses em mg/dia):

- 1.....
- 2.....
- 3.....
- 4.....
- 5.....
- 6.....

Exame físico:

PA 1:...../.....mm Hg Pa 2:...../.....mm Hg FC:.....bpm

Peso:.....kg Altura:.....cm ICM:.....

Laboratório:

1. Hemograma: Ht.....Leucócitos.....
2. Creatinina.....
3. Perfil Lipídico
 Colesterol total.....LDL.....HDL.....TG.....REL:.....
4. Glicemia jejum.....
5. Hemoglobina glicosilada.....

PERFIL ANTIFOSFOLIPÍDICO

6. Anticorpo anticardiolipina ELISA
 IgG.....IgM.....IgA.....
7. Anticorpo antibeta2-gpI ELISA
 IgG.....IgM.....IgA.....

ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

8. Anticorpo Anti-Hsp 60
 IgG.....
9. Anticorpo Anti-Hsp 65
 IgG.....

ANEXO IV

**PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO DE AAF E ANTI-Hsp NO GRUPO-
CONTROLE**

(pacientes internados em enfermarias de ortopedia)

Nome:.....

Idade:..... Sexo:..... Raça:.....

Registro hospitalar:..... Telefone:.....

Data da coleta de dados:.....

FATORES DE RISCO

Histórico de hipertensão arterial sistêmica

Não Sim

Tabagismo

Não

Sim Há quanto tempo:..... Nº cigarros/dia:.....

Doença cardíaca prévia ou atual:

Não

Sim Tipo de cardiopatia:.....

Histórico de diabetes mellitus

Não

Sim Há quanto tempo:

Histórico de hipercolesterolemia

Não Sim

História prévia de isquemia cerebral ou AIT

Não

Sim Tipo de evento:.....

Nº de episódios:.....

PERFIL ANTIFOSFOLIPÍDICO

Anticardiolipina

IgG:.....IgM:.....IgA:.....

Antibeta2-gpl

IgG:.....IgM:.....IgA:.....

ANTICORPOS CONTRA PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Anti-Hsp 60 IgG:.....

Anti-Hsp 65 IgG:.....

ANEXO V
FICHA ANGIOGRÁFICA
Nº.....

EXAMINADOR 1:

Artéria carótida interna D E – Localização:.....

Percentual de estenose: Caracterização da placa:

- | | |
|----------------------|--|
| 1. 50% - 69%..... | 1. Capa fibrosa normal <input type="checkbox"/> ou <input type="checkbox"/> fina |
| 2. 70% - 90%..... | 2. Capa fibrosa rota: não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> |
| 3. acima de 90%..... | 3. Hemorragia intraplaca: não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> focal <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> extensa |

Descrever outras lesões carotídeas:.....

.....

.....

EXAMINADOR 2:

Artéria carótida interna D E –

Localização:.....

Percentual de estenose: Caracterização da placa:

- | | |
|----------------------|--|
| 1. 50% - 69%..... | 1. Capa fibrosa normal <input type="checkbox"/> ou <input type="checkbox"/> fina |
| 2. 70% - 90%..... | 2. Capa fibrosa rota: não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> |
| 3. acima de 90%..... | 3. Hemorragia intraplaca: não <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> focal <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> extensa |

Descrever outras lesões carotídeas:.....

.....

.....