

DANIELA SOUZA FARIAS

**Associação entre inflamação do tecido adiposo epicárdico e doença
arterial coronariana: um estudo clinicopatológico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Kimie Suemoto

São Paulo
2016

DANIELA SOUZA FARIAS

Associação entre inflamação do tecido adiposo epicárdico e doença arterial coronariana: um estudo clinicopatológico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Prof. Dra. Claudia Kimie Suemoto

(Versão corrigida. Resolução nº 6018/2011, de 13 de outubro de 2011. A versão original se encontra disponível na Biblioteca FMUSP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP)

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Farias, Daniela Souza

Associação entre inflamação do tecido adiposo epicárdico e doença arterial coronariana : um estudo clinicopatológico / Daniela Souza Farias. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Claudia Kimie Suemoto.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Inflamação 3.Tecido adiposo 4.Autópsia
5.Macrófagos 6.Linfócitos T 7.Linfócitos B

USP/FM/DBD-320/16

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus amados pais, Fátima e José Carlos, pelo amor e incentivo incondicionais. Minha eterna gratidão e amor pelo quanto que se esforçam e fazem para a realização dos meus sonhos, e por serem meus maiores exemplos em tudo.

Ao meu noivo, Leonardo, minha eterna gratidão por todo o amor, paciência e dedicação, por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando incansavelmente em todos os momentos, e por ter vivenciado junto comigo todas as etapas desta dissertação.

Às minhas irmãs Juliana e Gabriela, por representarem a amizade, pelo companheirismo, carinho, paciência e força durante toda à minha vida.

À minha avó, Elzira, pela dedicação, amor e carinho em toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

. Agradeço a Deus pela constante presença em minha vida, e por sempre me iluminar e guiar.

. À Prof. Dra. Claudia Kimie Suemoto, pela orientação impecável e tão presente. Minha admiração pelo amor à ciência e por transmitir todo o seu conhecimento com tanta dedicação. Minha eterna gratidão, pelo acolhimento, por todo apoio, incentivo, trabalho duro em conjunto e conquistas durante todos estes anos. Eu me espelho e me inspiro em você.

. Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, pela participação tão essencial nesta pesquisa, desde o delineamento. Minha gratidão pelo apoio incondicional durante os momentos de alegria e sempre quando eu precisei. Pelo acolhimento no Lab. de Patologia Cardiovascular e participação de suas pesquisas. Tenho profunda admiração pela pessoa que o senhor é.

. Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva (Burns), pela contribuição nesta pesquisa, em especial pelo auxílio na padronização e pelo treinamento da quantificação das células inflamatórias, e pelas reuniões que sempre me deram motivação.

. Ao Prof. Marcio Sommer Bittencourt pelos conselhos na análise deste estudo e oportunidade de crescimento.

. Ao Prof. Dr. Wilson Jacob-Filho, Prof. Dr. Ricardo Nitrini, Prof. Dra. Lea Tenenholz Grinberg, Prof. Dra. Renata Elaine Parázo Leite, Prof. Dr. José Marcelo Farfel pelo acolhimento ao Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento, pela coordenação do Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento, e por contribuírem enormemente no meu crescimento e meu aprendizado.

. À Prof. Dra. Renata Eloah de Lucena Ferretti-Rebustini, por abrir às portas e me acolher no Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento, por todo o aprendizado desde a minha graduação até à equipe de entrevistas. Minha gratidão pela oportunidade.

. À Aline Nishizawa, que realizou a pós-graduação comigo, pela profunda amizade. Minha eterna gratidão pelo apoio e incentivo inabaláveis, pela oportunidade em participar da sua pesquisa, pelo aprendizado, companheirismo, e conselhos o durante estes seis anos de convívio diário.

. À Fernanda Marinho Campos, técnica do Lab. De Patologia Cardiovascular, pela profunda amizade, pelo incansável auxílio no processamento dos casos, coleta dos casos no período vespertino, e organização de todos os blocos e lâminas, incontáveis vezes além do seu período de trabalho.

. À Karen Cristina Souza da Silva, aluna de iniciação científica, pela amizade e alegre companhia, pela dedicação especial para coleta dos casos no período matutino.

. Ao Anderson Cuelho, aluno de iniciação científica, pela amizade e contribuição na coleta dos casos no período em que esteve no laboratório.

. À Pérola Lucas e Marta Crocci, pela amizade, que além do apoio, torcem e cuidam de todos os alunos do Laboratório de Patologia Cardiovascular e Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento, respectivamente.

. À equipe de entrevistas do Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento, que contribuiu enormemente em todo o meu aprendizado, crescimento profissional e pessoal. Minha gratidão a todos que convivi, desde a minha entrada com a Camila Batella, Maurício Dantas, Nélio Borrozino e Aline Nishizawa, aos que passaram contribuindo na execução das entrevistas, Peterson Caballero e Natalia Pugliessa, até a nova geração Daniele Vieira, Magnólia Moreira, Márcia Nagumo, Selma Machado, Caroline Jordão, Tatiane e Juliana Chaves, pelo convívio, amizade e auxílio na execução das entrevistas.

. Ao Ricardo Caires de Neves, pela grande amizade, pelos anos de trabalho em equipe, e por sempre me auxiliar quando eu precisei, me dando apoio durante meu período de pós-graduação.

. À equipe de coleta do Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento, Anderson Cuelho, Karen Cristina Souza da Silva, Rafaela Godoy Sabadin, Mônica Diaz, Caroline Bazan, Juliana Oliveira Martins e Cintia Crizol, pela amizade e convivência.

. À Luzia Lima Carreira, que foi supervisora da equipe de coleta durante parte da minha coleta dos casos, pela profunda amizade e por tudo o que vivenciamos juntas na vida. Minha gratidão por todo o apoio, incentivo em todos os momentos.

. A todos os alunos de iniciação científica, pós-graduação e funcionários do Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento e parceiros, pelo aprendizado.

. Ao Laboratório de Histotécnica da Faculdade de Medicina da USP, em especial à Kelly, Cássia, Rodrigo e Leonardo, por todo o processamento na confecção de todas as lâminas e proporcionar que a fixação fosse cumprida dentro do tempo estabelecido.

. Ao Laboratório de Imunoistoquímica da Faculdade de Medicina da USP, em especial Angela e Cristina, do período matutino, que realizaram a técnica em todas as lâminas deste trabalho com muita qualidade, pelo apoio e aos conselhos enriquecedores.

. Ao Museu da Faculdade de Medicina da USP, ao Reginaldo e Carlos, que digitalizaram todas as lâminas deste trabalho.

. Aos meus sogros, Izabel e Jorge Itao, por me acolherem como uma filha durante parte do período de pós-graduação, e pelo constante apoio e incentivo em todos os momentos.

. Em especial, aos familiares dos indivíduos que compuseram a casuística deste estudo que, por acreditarem na pesquisa e por um gesto solene de solidariedade em ajudar as pessoas que são acometidos pelas doenças cardiovasculares, participaram desta pesquisa. Contribuíram não só com as doações, mas com doação de si ao, pacientemente, responder as entrevistas, mesmo no momento mais difícil de suas vidas. Meu eterno respeito.

. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio regular à pesquisa concedido que financiou esta dissertação, e pela minha bolsa de estudos durante dois anos da minha pós-graduação.

Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Siglas

Resumo

Abstract

1 Introdução	1
1.1 Dados epidemiológicos	1
1.2 Aterosclerose	6
1.2.1 Padrão de artérias coronárias sem lesões.....	6
1.2.2 Aspectos morfológicos da aterosclerose	7
1.2.3 Aspectos inflamatórios da aterosclerose	14
1.2.3.1 Imunidade Inata	15
1.2.3.2 Imunidade Adaptativa	17
1.3 Obesidade e doença arterial coronariana	23
1.4 Tecido Adiposo	23
1.4.1 Tecido adiposo epicárdico.....	27
1.4.2 Tecido adiposo perivascular.....	28
1.5 Tecido adiposo cardíaco: epicárdico e perivascular associados com DAC	29
2 Objetivos	37
2.1 Objetivo Geral	37
2.2 Objetivos Específicos.....	37
3 MÉTODO.....	38
3.1 Local de coleta de dados	38
3.2 Desenho do estudo	39
3.3 Casuística	39
3.3.1 Critérios de Inclusão	39
3.3.2 Critérios de Exclusão	39
3.3.2.1 Identificação de sinais de sepse post mortem	40
3.3.3 Obtenção dos casos	42
3.4 Padronização da técnica	43
3.4.1 Artérias coronárias.....	43
3.4.1.1 Avaliação das artérias coronárias.....	47

3.4.1.2 Avaliação da porcentagem de obstrução.....	49
3.4.1.3 Classificação da placa aterosclerótica pelos critérios da American Heart Association	49
3.4.1.4 Classificação dos grupos	51
3.4.2 Tecido Adiposo	51
3.4.2.1 Padronização do método de imunohistoquímica (IHQ) e dos anticorpos no tecido adiposo	51
3.4.2.2 Tecido adiposo visceral perirrenal e subcutâneo.....	56
3.4.2.3 Procedimento de histologia e imunohistoquímica dos tecidos adiposos: perivascular, perirrenal e subcutâneo	56
3.4.2.4 Análise das lâminas.....	57
3.5 Análise estatística	59
3.5.1 Cálculo do tamanho de amostra	59
3.5.2 Análise descritiva.....	59
3.5.3 Análise univariada e multivariada	60
3.5.3.1 Tecido Adiposo Perivascular Periplaca	60
3.5.3.2 Tecido Adiposo Perivascular com Ausência de Aterosclerose, Tecido Adiposo Subcutâneo e Tecido Adiposo Perirrenal.....	61
4 Resultados	62
4.1 Casuística	62
4.2 Análise descritiva	62
4.2.1 Dados clínicos e sociodemográficos.....	62
4.2.2 Artérias coronárias.....	63
4.2.3 Células inflamatórias.....	66
4.3 Análise univariada.....	70
4.4 Análise multivariada	82
4.4.1 Tecido adiposo perivascular periplaca (TAPp)	82
4.4.2 Comparação da inflamação no tecido adiposo perivascular periplaca (TAPp) com tecido adiposo perivascular com ausência de aterosclerose (TAPaa).....	83
4.4.3 Comparação da inflamação no tecido adiposo perivascular periplaca (TAPp) com tecido adiposo subcutâneo (TAS)	85
4.4.4 Comparação da inflamação no tecido adiposo perivascular periplaca (TAPp) com tecido adiposo visceral perirrenal (TAPr)	87
4.5 Resumo dos resultados	90
O resumo dos resultados pode ser observado na tabela 23.....	90
5 Discussão.....	91

5.1 Casuística	91
5.2 Inflamação no TAPp.....	92
5.3 Inflamação no TAPp em relação TAPaa	96
5.4 Inflamação no TAPp em relação TAS e TAPr	97
5.5 Inflamação no TAP e aterosclerose: perspectivas	99
5.6 Limitações do estudo	101
5.7 Pontos fortes do estudo	102
5.8 Divulgação científica	103
6 Conclusão	104
Anexos	105
ANEXO I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	105
ANEXO II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Cardiovascular ..	106
ANEXO III. Termo de Outorga do Auxílio Regular à Pesquisa concedida pela agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP)	108
ANEXO IV. Termo de Outorga da bolsa de mestrado, fluxo contínuo, da aluna Daniela	109
ANEXO V. Entrevista Clínica Semiestruturada do Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento	110
ANEXO VI – Pôster apresentado no Congresso da American Heart Association, Scientific Sessions, em novembro 2015.	112
Referências	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de mortalidade por doença cardiovascular no Brasil a cada 100.000 habitantes, por unidade federativa no período de 2003 a 2012, segundo estudo ecológico da Sociedade Brasileira de Cardiologia..... 3

Figura 2. Distribuição dos coeficientes de mortalidade por doença cardiovascular em quartis no Brasil, por unidade federativa no período de 2003 a 2012, segundo estudo ecológico da Sociedade Brasileira de Cardiologia..... 4

Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia: dados e estatísticas de mortalidade por IAM, 2015⁷. Figura 3. Distribuição dos coeficientes de mortalidade por IAM em quartis no Brasil por unidade federativa no período de 2003 a 2012, segundo estudo ecológico da Sociedade Brasileira de Cardiologia..... 4

Figura 4. Taxas de mortalidade por IAM no Brasil a cada 100.000 habitantes, por unidade federativa no período de 2003 a 2012, segundo estudo ecológico da Sociedade Brasileira de Cardiologia. 5

Figura 5. Estrutura normal de artéria muscular. 7

Figura 6. Classificação da American Heart Association, elaborado por Stary.. 13

Figura 7. Macrófagos, células espumosas e formação do núcleo necrótico. ... 16

Figura 8. Linfócitos T na aterosclerose. 19

Figura 9. Processo inflamatório induzido pela obesidade. 27

Figura 10. Fragmentos de pulmão, rim, baço e fígado responsivos à sepse. A: pulmão, com aumento de 10x, com infiltração de neutrófilos associado à pleurite, devido à broncopneumonia. B: pulmão, com aumento de 40X, evidenciando infiltrado de neutrófilos. C: rim, com aumento de 10x, com necrose tubular aguda, responsivo à choque; D: baço, com aumento de 10x, com esplenite aguda; E: fígado, com aumento de 10x, responsivo à broncopneumonia, com congestão e esteatose hepática. 41

Figura 11. Artéria coronária circunflexa após fixação por imersão em álcool 70%. A: Imagem macroscópica (aumento de 3x) da artéria coronária circunflexa com grau de obstrução menor do que 30% com colabamento importante. B: Imagem do corte histológico (aumento de 3x) do mesmo fragmento corado para Verhoeff. 44

Figura 12. Óstio da artéria coronária direita e descendente anterior com a primeira injeção de ágar. 45

Figura 13. Procedimento de remoção do tecido adiposo epicárdico perivascular e abertura das artérias coronárias. A: Remoção sistemática do tecido adiposo perivascular sistematicamente a cada 1,5 cm a partir do óstio; B: artérias coronárias após a dissecação com a injeção de ágar somente do início o procedimento, enquanto estavam no coração; C: resultado das repetidas injeções de ágar com abertura eficaz. 45

Figura 14. Padronização da fixação das artérias coronárias. A: artéria coronária fixada sem ágar com formol diluído a 10%; B: artéria coronária fixada sem ágar com formol tamponado diluído a 4%; C: artéria coronária fixada com ágar com formol tamponado diluído a 4%. 47

Figura 15. Secções de artérias coronárias fixadas e fotografadas através do estereomicroscópio sob aumento de 1,5x. A: seguimento proximal da artéria coronária direita; B: seguimento distal da artéria coronária direita; C: tronco da artéria coronária esquerda; D: seguimento proximal da artéria coronária descendente anterior; E: seguimento distal da artéria coronária descende anterior; F: seguimento proximal da artéria coronária circunflexa; G: seguimento distal da artéria coronária circunflexa. 48

Figura 16. Artéria coronária corada com Verhoeff para a mensuração da porcentagem de obstrução através da medida morfométrica da área delimitada pela LLEI e da área do lúmen. A: linha amarela contorna e delimita a área interna da LLEI; B: linha amarela contorna e delimita a área do lúmen. Legenda: LLEI – Lâmina Limitante Elástica Interna. 49

Figura 17. Placas ateroscleróticas instáveis: macroscópica e microscópica. A: presença de trombose coronariana oclusiva que desencadeou óbito; B: presença de hemorragia na placa aterosclerótica; C: presença de hemorragia na placa aterosclerótica; D: trombose coronariana oclusiva com presença de ulcerações, que desencadeou óbito; E: Ruptura da placa aterosclerótica, a seta indica o local de ruptura da placa, com trombo superposto. 50

Figura 18. Placa estável com a classificação VIII da AHA 51

Figura 19. Linfócitos T identificados com o anticorpo primário CD3, através da técnica de imunoistoquímica no TAP, fotografados em microscópio com aumento de 20x. A: TAP fixado em formol a 4% tamponado por 24 horas. B: TAP fixado por 48 horas. C: TAP fixado por 72 horas. Nota-se que não houve diferença entre as marcações nos diversos tempos de fixação. Setas vermelhas indicam os linfócitos T corados. Legenda: TAP: tecido adiposo epicárdico perivascular. ... 53

Figura 20. Linfócitos B corados com o anticorpo primário CD20, através da técnica de imunoistoquímica no TAP, fotografados em microscópio com aumento de 20x. A: TAP fixado em formol a 4% tamponado por 24 horas. B: TAP fixado por 48 horas. C: TAP fixado por 72 horas. Nota-se que não houve diferença entre as marcações nos diversos tempos de fixação. Setas vermelhas indicam os linfócitos B corados. Legenda: TAP: tecido adiposo epicárdico perivascular. ... 54

Figura 21. Macrófagos identificados com o anticorpo primário CD68, através da técnica de imunoistoquímica, no TAP, fotografados em microscópio com aumento de 20x. A: TAE fixado em formol a 4% tamponado por 24 horas. B: TAP fixado por 48 horas. C: TAP fixado por 72 horas. Setas vermelhas indicam macrófagos corados. Legenda: TAP: tecido adiposo epicárdico perivascular. 55

Figura 22. Captura de tela do software Pannoramic Viewer utilizado para quantificar as células inflamatórias. Seta vermelha indica o comando que oculta a identificação do caso. Setas verdes indicam que o programa deixa a etiqueta visível somente na sessão “slide information” 58

Figura 23. Captura de tela ilustra a distribuição dos 20 campos aleatórios e a contagem das células inflamatórias. A: 20 campos com menor aumento (fit: que é menor do que 1x), com cegamento para aglomerados celulares; B: Macrófagos identificados em aumento de 10x..... 59

Figura 24. Fluxograma de entrada dos participantes no estudo..... 62

Figura 25. Distribuição dos macrófagos, linfócitos T e B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) no TAPp em toda a amostra (n=246 fragmentos). 66

Figura 26. Histogramas das diferenças. A: Diferença do número de macrófagos entre TAPp e TAPaa; B: Diferença do número de linfócitos T entre TAPp e TAPaa; C: Diferença do número de linfócitos B entre TAPp e TAPaa; D:

Diferença do número de macrófagos entre TAPp e TAS; E: Diferença do número de linfócitos T entre TAPp e TAS; E: Diferença do número de linfócitos B entre TAPp e TAS; F: Diferença do número de macrófagos entre TAPp e TAPr; G: Diferença do número de linfócitos T entre TAPp e TAPr; I: Diferença do número de linfócitos B entre TAPp e TAPr..... 68

Figura 27. Gráficos de caixa entre as diferenças entre TAPp e tecidos controles. A: Diferença de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e TAPaa, TAS e TAPr. B: Diferença de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e TAPaa, TAS e TAPr. C: Diferença de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e TAPaa, TAS e TAPr..... 69

Figura 28. Gráficos de dispersão da associação entre o número de células inflamatórias no TAPp e porcentagem de obstrução arterial da placa adjacente ao tecido adiposo. A: Associação entre o número de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$). B: Associação entre o número de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$). C: Associação entre o número de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)..... 71

Figura 29. Gráficos de dispersão da diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPaa. A: gráfico de dispersão da diferença do número de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); B: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); C: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)..... 73

Figura 30. Gráficos de dispersão da diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAS. A: gráfico de dispersão da diferença do número de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); B: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); C: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)..... 74

Figura 31. Gráficos de dispersão da diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPr. A: gráfico de dispersão da diferença do número de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); B: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); C: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)..... 75

Figura 32. Número de células inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) no TAPp de acordo com os grupos. A: macrófagos; B: linfócitos T; C: linfócitos B. 77

Figura 33. Gráfico de caixa da diferença do número de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e tecidos adiposos controles: TAPaa, TAS e TAPr, de acordo com a classificação da placa aterosclerótica. 79

Figura 34. Gráfico de caixa da diferença do número de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e tecidos adiposos controles: TAPaa, TAS e TAPr, de acordo com o tipo de placa aterosclerótica..... 80

Figura 35. Gráfico de caixa da diferença do número de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e tecidos adiposos controles: TAPaa, TAS e TAPr, de acordo com o tipo de placa aterosclerótica..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais linfócitos T presentes na placa de aterosclerose.	20
Tabela 2. Análise descritiva das variáveis clínicas e sociodemográficas da amostra (n=82 participantes), São Paulo, 2013-2015.	63
Tabela 3. Análise descritiva da porcentagem de obstrução (análise microscópica) da lesão proximal mais significativa de cada artéria (CD, TCE ou DA e CX), de acordo com os grupos (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.	64
Tabela 4. Comparação da porcentagem de obstrução (análise microscópica) da média das lesões mais significativas proximais, e distais de cada artéria (CD, TCE/DA e CX), de acordo com os grupos (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.	64
Tabela 5. Análise descritiva do número de placas (análise macroscópica) de todas as artérias coronárias em toda a amostra (n=323 fragmentos de artérias coronárias, considerando DA e TCE separadamente), São Paulo, 2013-2015.	65
Tabela 6. Análise descritiva da distribuição dos macrófagos, linfócitos T e B no TAPp em toda a amostra (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013 a 2015.	66
Tabela 7. Análise descritiva da diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre o TAPp e TAPaa, TAS, TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.	67
Tabela 8. A análise de regressão das variáveis sociodemográficas e clínicas com a porcentagem de obstrução (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.	70
Tabela 9. Correlação entre o número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp com a porcentagem de obstrução arterial (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013 a 2015.	71
Tabela 10. Correlação da diferença de macrófagos, linfócitos T e B entre o TAPp e os tecidos adiposos controles com a porcentagem de obstrução arterial (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013 a 2015.	72
Tabela 11. Análise de regressão das variáveis sociodemográficas e clínicas com os grupos de acordo com a presença de placas estáveis ou instáveis (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.	76

Tabela 12. Número de células inflamatórias no TAPp de acordo com a presença de estabilidade e instabilidade da placa aterosclerótica (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015..... 77

Tabela 13. Diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPaa, TAS e TAPr, de acordo com a presença de placas estáveis ou instáveis (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015..... 78

Tabela 14. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias com o número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015..... 82

Tabela 15. Associação entre grupos de estabilidade e instabilidade das placas ateroscleróticas artérias coronárias com (1+log) do número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015. 83

Tabela 16. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAPaa (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015..... 84

Tabela 17. Associação entre os grupos de estabilidade e instabilidade de placas ateroscleróticas das artérias coronárias com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAPaa (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015. 84

Tabela 18. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAS (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015..... 86

Tabela 19. Associação entre grupo com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp e TAS (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015. 86

Tabela 20. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015. 87

Tabela 21. Associação entre grupo com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis em artérias coronárias, com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp e TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015. 88

Tabela 22. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias, e grupos de acordo com a composição de placa, com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015..... 89

Tabela 23. Resumo dos resultados do estudo entre as associações das células inflamatórias com a porcentagem de obstrução, grupos com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis e interação entre ambas no TAPp com TAPaa, TAS e TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015. 90

LISTA DE SIGLAS

(r)	Coeficiente de Correlação
ADMA	Dimetilarginina Assimétrica
AHA	<i>American Heart Association</i>
ApoE	Alipoproteína E
ARIC	<i>Atherosclerosis Risk in Communities</i>
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BCR	Receptor de Células B
CANTOS	<i>Cardiovascular Risk Reduction Study (Reduction in Recurrent Major CV Disease Events)</i>
CD	Artéria Coronária Direita
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CIRT	<i>Inflammation Reduction Trial – Inflammation Imaging Study</i>
CLS	<i>Crown-like structures</i>
CX	Artéria Coronária Circunflexa
DA	Artéria Coronária Descendente Anterior
DAB	diaminobenzidina
DAC	Doença Arterial Coronariana
DALY	<i>Disability-Adjusted Life Year</i>
DCV	Doenças Cardiovasculares
DLP	Dislipidemia
DNT	Doenças não transmissíveis
DP	Desvio Padrão
ECG	Eletrocardiograma
et al.	e outros
FALCs	<i>Fat-associated lymphoid cluster</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GLM	Modelos Lineares Generalizados
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HLA	Antígeno de Leucócitos Humanos
HSP	Proteína de Resposta ao Choque Térmico
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IHQ	Imunoistoquímica
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corpórea
ITQ	Intervalo Interquartilico
JUPITER	<i>Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin trial</i>
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LFE-FMUSP	Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LLEI	Lâmina Limitante Elástica Interna
MCP-1	Proteína Quimiotática de monócitos 1
M-CSF	Estimulador de colônia de macrófagos
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
OR	<i>odds ratio</i>
OxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
RANTES	Regulada por Ativação Expressa e Secretada por Linfócitos T Normais
SCA	Síndrome Coronariana Aguda
SIM	Sistema de Informação de Mortalidade
SVOC-FMUSP	Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
TAE	Tecido adiposo epicárdico
TAP	Tecido adiposo perivascular
TAPaa	Tecido adiposo epicárdico perivascular com ausência de aterosclerose
TAPp	Tecido adiposo epicárdico perivascular periaplaça

TAPr	Tecido Adiposo Perirrenal
TAS	Tecido Adiposo Subcutâneo
TC	Tomografia Computadorizada
TCE	Tronco da Artéria Coronária Esquerda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptores de Células T
Th	<i>T helper</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tregs	Linfócitos T reguladores
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular

RESUMO

Farias, DS. *Associação entre inflamação do tecido adiposo epicárdico e doença arterial coronariana: um estudo clinicopatológico* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Dentre as doenças cardiovasculares, as doenças isquêmicas do coração (DIC) são a principal causa de morte e incapacidade em todo o mundo. A aterosclerose é a principal causa das DIC, e a inflamação do tecido adiposo epicárdico (TAE) parece estar associada à doença arterial coronariana (DAC). A inflamação no TAE periplaca próxima à placa de ateroma, pode ter um papel ativo na inflamação, contribuindo para a patogênese da aterosclerose. Entretanto, não há evidências conclusivas se esta inflamação está presente apenas no TAE próximo à placa de ateroma ou se é um processo que envolve todo o TAE. Além disso, a associação entre a inflamação do TAE e placas instáveis, assim como o papel dos linfócitos B no processo inflamatório, ainda não foram investigados em estudos de autópsia. **Objetivo:** Investigar a associação entre inflamação no TAE perivascular e DAC num estudo clinicopatológico. **Métodos:** Trata-se de um estudo transversal, com material de autópsia coletado no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP), após a aceitação do familiar através do termo de consentimento livre e esclarecido. A entrevista clínica semiestruturada foi feita com o familiar. Artérias coronárias foram dissecadas junto com o TAE e fixadas em formol a 4%. Fragmentos das artérias coronárias (tronco esquerdo, descendente anterior, circunflexa e direita) foram amostrados no local de maior obstrução ou com sinal de lesões instáveis, além de um fragmento distal sem aterosclerose significativa. O tecido adiposo epicárdico perivascular adjacente periplaca (TAPp), distal à placa (TAPaa), subcutâneo (TAS) e perirrenal (TAPr) foram amostrados. As lesões ateroscleróticas foram classificadas de acordo com a estabilidade da placa para estabelecer a divisão dos grupos, e a porcentagem de obstrução arterial foi mensurada por métodos morfométricos. A quantificação de células inflamatórias nos tecidos adiposos foi feita através da digitalização de lâminas coradas através de imunistoquímica: CD68 (macrófagos), CD3 (linfócitos T) e CD20 (linfócitos B). O número de células inflamatórias foi comparado entre os dois grupos em todos os fragmentos, utilizando modelos lineares generalizados ajustados para fatores de confusão. **Resultados:** Foram incluídos 82 indivíduos (162 fragmentos de artérias coronárias com placas estáveis e 84 fragmentos com placas instáveis). Houve um aumento do número de macrófagos (β : 0,008; IC95% 0,002; 0,014; $p=0,007$) e linfócitos B (β : 0,009; IC95% 0,002; 0,015; $p=0,01$) com o aumento da porcentagem de obstrução arterial. Observamos também maior número de linfócitos B na presença de placas instáveis (β : 0,554; IC95% 0,194; 0,914; $p=0,002$). Estas associações foram restritas à placa aterosclerótica, quando comparado com TAPaa. Houve aumento do número de macrófagos (β : 5,717; IC95% 1,802; 9,632; $p=0,004$) e linfócitos T (β : 0,991; IC95% 0,030; 1,951; $p=0,04$) com o aumento da obstrução arterial nas artérias coronárias no TAPp, em relação ao TAS. O número de macrófagos também aumentou no TAPp em relação ao TAPr (β : 5,523; IC95% 0,910; 10,136; $p=0,01$) com o aumento da porcentagem de obstrução arterial, e na presença de placas instáveis (β : 12,781; IC95% 4,363; 21,200; $p=0,002$). **Conclusão:** Macrófagos e linfócitos B no TAPp foram associados à DAC, e esta inflamação foi restrita ao TAPp em relação a todos os tecidos adiposos controles. Desta forma, a inflamação no TAPp parece estar associada à maior porcentagem de obstrução e instabilidade da placa de aterosclerose.

Descritores: aterosclerose; inflamação; tecido adiposo; autópsia; macrófagos; Linfócitos T; linfócitos B.

ABSTRACT

Farias, DS. *Association between inflammation in perivascular epicardial adipose tissue and coronary artery disease: a clinical pathological study* [Dissertation]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Introduction: Among the cardiovascular diseases, ischaemic heart disease (IHD) is the main cause of mortality and morbidity worldwide. Atherosclerosis is the main cause of IHD, and inflammation in the epicardial adipose tissue (EAT) seems to be associated with coronary artery disease (CAD). Inflammation in the EAT proximal to the atherosclerotic plaque could have an active role in the inflammation that contributes to atherosclerosis pathophysiology. However, controversy remains whether this inflammation is only adjacent to the atherosclerotic plaque or whether it is present in the whole EAT. Moreover, the association between inflammation in EAT and unstable plaques, as well as the role of B-lymphocytes in the inflammatory process, have not been investigated yet. Aim: To investigate the association between inflammation in perivascular epicardial adipose tissue (PAT) and CAD in a clinicopathological study. Methods: This cross sectional study used autopsy material collected at the Sao Paulo Autopsy Service (SPAS) from University of Sao Paulo, after informed consent term sign by the next-of-kin (NOK). A semi-structured clinical interview was applied to the NOK. Coronary arteries were dissected with PAT and fixed in 4% buffered formalin. Coronary artery fragments (left trunk, anterior descending, circumflex, and right coronary) were sampled at the region with the greatest obstruction or unstable plaque, and also at a distal region without atherosclerosis. PAT adjacent to the atherosclerotic plaque (PATp), distal to the plaque (PATd), subcutaneous adipose tissue (SAT), and perirenal adipose tissue (PrAT) were sampled. Atherosclerotic plaque fragments were classified regarding plaque stability, and percentage of arterial obstruction measured by morphometric methods. The number of inflammatory cells in adipose tissues was counted in slides stained using immunohistochemistry: CD68 (macrophages), CD3 (T-lymphocytes), CD20 (B-lymphocytes). The number of inflammatory cells in all fragments was compared using generalized linear models adjusted for confounders. Results: 82 participants were included (162 fragments of coronary arteries with stable plaques and 84 fragments with unstable plaques). The number of macrophages (β : 0.008; IC95% 0.002; 0,014; $p=0.007$) and B-lymphocytes (β : 0.009; IC95% 0.002; 0.015; $p=0.01$) increased with the percentage of arterial obstruction. We observed a large number of B-lymphocytes in the presence of unstable plaques (β : 0.554; IC95% 0.194; 0.914; $p=0.002$). These associations were restricted to PATp, when compared to PATd. The number of macrophages (β : 5.717; IC95% 1.802; 9.632; $p=0.004$) and T-lymphocytes were greater in the PATp than in the SAT (β : 0.991; IC95% 0.030; 1.951; $p=0.04$). The number of macrophages was also greater in the TAPp compared to PrAT with the increase of the percentage of arterial obstruction (β : 5.523; IC95% 0.910; 10.136; $p=0.01$), and in presence of unstable plaques (β : 12.781; IC95% 4.363; 21.200; $p=0.002$). Conclusion: Macrophages, and B-lymphocytes were associated with CAD, and this association was restricted to PATp when compared to all other adipose tissues. Therefore, inflammation in PATp seems to be associated with greater arterial obstruction and atherosclerotic plaque instability.

Descriptors: atherosclerosis; inflammation; adipose tissue; autopsy; macrophages; T-lymphocytes; B-lymphocytes.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dados epidemiológicos

Em 2012, as doenças não transmissíveis (DNT) foram responsáveis por 38 milhões de mortes por ano, que equivale a 68% do total de mortes no mundo. Entre as mortes prematuras (óbitos abaixo dos 70 anos de idade), as DNT foram quase a metade das causas de morte (52%). Dentre as DNT, as doenças cardiovasculares (DCV), câncer, diabetes mellitus e doenças respiratórias crônicas foram relacionadas com mais de três quartos das DNT. Indivíduos com idade entre 30 a 70 anos apresentam uma probabilidade de morrer por estas afecções de 19,4% no Brasil, 17,1% nos Estados Unidos da América, 12% Reino Unido e de 9,3% no Japão. Ressalta-se que o Brasil apresenta a média da probabilidade mundial, considerando 194 países em todo o mundo¹.

As DCV, isoladamente, são a primeira causa de morte no mundo com 17,3 milhões de óbitos/ano², correspondendo a 31% dentre todas as causas¹. Embora as taxas de mortalidade por DVC tenham apresentado um declínio com taxa de 28,8% no período de 2003 a 2013³, projeções futuras estimam um crescimento de mortalidade por DVC maior do que 23,6 milhões em 2030². A mortalidade é tão expressiva que nos Estados Unidos da América, uma a cada três mortes são atribuídas às DCV. Em números, as DCV isoladamente acometeram 17,5 milhões de pessoas em 2012 (46% dos óbitos relacionados às DNT), destes 6 milhões foram mortes prematuras. A doença arterial coronariana (DAC) foi responsável por 7,4 milhões de óbitos e acidente vascular cerebral (AVC) por 6,7 milhões. Em números absolutos, no ano de 2013, 370.213 norte-americanos morreram por DAC, portanto, pode-se traduzir que a DAC isoladamente foi responsável por 1 em cada 7 óbitos nos Estados Unidos³.

A prevalência de DAC é estimada atualmente em 15,5 milhões de norte-americanos com idade igual ou superior a 20 anos de idade (6,2% total, 7,6% em homens e 5,0% em mulheres), de acordo com *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES). A cada ano é estimado que aproximadamente 600.000 norte-americanos terão um novo evento coronariano (definido como

INTRODUÇÃO

primeira hospitalização por infarto agudo do miocárdio [IAM] ou morte por DAC), e 305.000 terão recidiva. A taxa de incidência de hospitalizações para IAM ou mortes por DAC tem decaído em torno de 5% por ano, de acordo com o estudo *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC). Este cálculo foi obtido através de dados tabulados de 1987 a 2011, ajustados para idade e tipo de biomarcador³. A partir destes dados, foi projetado um aumento de 18% na prevalência para 2030, isto é, embora as taxas tenham decaído, espera-se que a incidência ainda aumente nas próximas décadas³.

A síndrome coronariana aguda (SCA) inclui: diagnóstico de IAM com presença ou ausência de elevação do segmento ST no Eletrocardiograma (ECG), com aumento de biomarcadores miocárdicos, como a troponina; e a angina instável, definida como presença de dor precordial, que indica aceleração ou progressão da doença, podendo ser desencadeada em repouso, mas não resulta em necrose do músculo miocárdico. A SCA está relacionada à progressão da placa aterosclerótica, instabilidade, ruptura com ou sem trombose luminal, ou vasoespasmos. A SCA é responsável por altas taxas de internações (625.000 em 2010) e custo elevado nos Estados Unidos³.

Dentre as DCV, as doenças isquêmicas do coração lideram a causa de morte, correspondendo a 13,2% dentre todas as causas de morte no mundo, correspondeu à 105 mortes a cada 100.000 em 2015. Além disso, projeções para 2030 evidenciam que a proporção de óbitos por estas doenças tende a permanecer em 13,2%, mas com uma prevalência de mortes 112 a cada 100.000 indivíduos⁴.

Assim como as DCV, a mortalidade por IAM tem decaído desde a década de 90. Em 1990, a taxa de óbito, ajustado para idade, foi de 177,3 a cada 100.000 indivíduos (com intervalo de confiança [IC] de 95%= 161,8 a 290,2) e no ano de 2013 foi de 137,8 (IC95%= 123,9 a 148,2), com uma média de variação de -22,3 (IC95%= -25,48 a -18,68), reportado pelo *Global Burden of Disease*⁵. No entanto, ainda assim continua sendo a maior causa de mortalidade¹.

INTRODUÇÃO

Além de ser a principal causa de morte no mundo, as doenças isquêmicas do coração também são a primeira causa de incapacidade. DALY (*Disability-Adjusted Life Year*) é uma medida que estima, por causas específicas, os anos de vida saudáveis perdidos pela incapacidade. As doenças isquêmicas do coração em 2000 eram a terceira causa mundial de DALY e em 2012 passou a ser a primeira causa mundial (165.717.210 DALYs), de acordo com a última atualização da Organização Mundial da Saúde em 2014⁶.

No Brasil, a prevalência de DCV também tem decaído. A Sociedade Brasileira de Cardiologia em parceria com o Ministério da Saúde e as Secretarias de Saúde dos Estados e Municípios reuniu dados do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) e do Censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁷. A figura 1 mostra os coeficientes de mortalidade para DCV para cada 100.000 habitantes, por unidade federativa, entre as idades de 30 a 69 anos, em ambos os sexos:

Unidade Federativa	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	variação relativa	Tendência
AC	129,5	118,17	130,45	152,94	139,98	131,23	162,31	139,53	133,28	105,19	-18,76%	
AL	170,8	179,39	186,64	169,12	178,76	160,35	168,07	156,93	176,49	164,22	-3,84%	
AM	103,1	104,31	114,05	98,61	93,43	107,60	93,87	95,82	101,93	102,86	-0,21%	
AP	127,2	119,20	95,08	88,61	88,99	111,94	74,56	80,87	99,77	104,06	-18,20%	
BA	139,3	138,87	134,96	145,49	137,90	139,47	135,72	129,22	129,89	127,77	-8,28%	
CE	111,9	114,56	103,39	111,43	110,68	109,97	107,91	95,62	104,18	101,83	-8,99%	
DF	141,9	143,99	138,39	122,58	118,96	116,52	109,02	96,30	107,56	97,55	-31,27%	
ES	165,6	162,89	149,48	151,23	150,89	144,83	126,52	121,31	125,98	121,07	-26,90%	
GO	166,3	166,96	156,47	149,36	145,30	149,33	136,16	134,21	138,35	144,41	-13,14%	
MA	129,3	123,42	145,92	134,13	140,08	143,88	134,87	133,44	142,96	141,40	9,37%	
MG	145,4	142,83	133,06	133,35	130,26	125,01	117,76	119,99	120,61	115,98	-20,26%	
MS	171,6	174,47	154,70	165,07	157,79	152,90	135,39	146,56	132,64	125,83	-26,67%	
MT	178,0	169,38	153,04	169,52	140,62	146,51	141,17	134,31	134,83	136,79	-23,14%	
PA	137,7	121,03	121,80	121,68	132,88	127,52	126,12	120,26	125,95	125,17	-9,07%	
PB	120,4	127,97	131,91	132,31	133,75	133,05	127,24	122,35	125,84	124,50	3,37%	
PE	170,9	178,41	166,99	157,79	161,02	158,42	152,35	144,55	145,07	143,72	-15,93%	
PI	134,6	129,15	142,11	131,43	126,54	130,45	119,85	117,17	123,49	125,36	-6,84%	
PR	150,7	156,08	139,46	136,84	130,50	133,70	124,90	121,63	120,73	112,63	-25,27%	
RJ	161,3	161,34	149,98	148,91	144,65	152,52	145,72	143,95	145,73	140,10	-13,15%	
RN	103,8	114,94	105,08	105,84	105,53	106,86	104,66	88,63	101,65	110,26	6,27%	
RO	161,4	150,30	155,13	152,76	126,69	127,29	136,73	127,37	131,10	136,44	-15,49%	
RR	156,2	140,70	132,45	110,03	95,31	115,31	101,68	117,63	137,62	78,34	-49,84%	
RS	121,7	121,09	112,76	108,15	110,60	109,55	106,29	103,15	103,82	98,85	-18,76%	
SC	125,5	124,88	116,21	113,27	108,85	97,73	101,80	102,79	101,71	101,93	-18,75%	
SE	144,8	146,25	148,48	147,86	138,94	154,36	130,55	125,57	129,33	134,09	-7,37%	
SP	146,7	146,93	134,99	133,86	128,86	130,14	124,54	124,54	124,37	120,61	-17,78%	
TO	191,2	188,85	171,44	162,82	155,50	159,85	147,96	137,95	143,79	142,80	-25,32%	

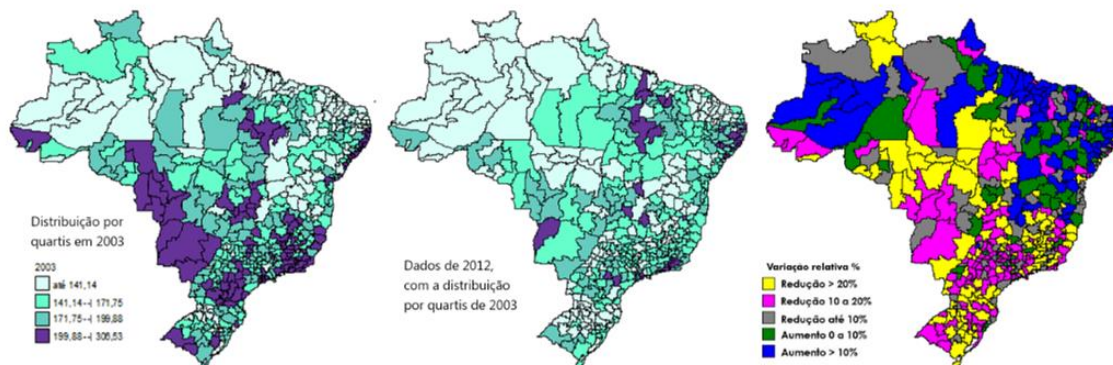
Fonte: adaptado da Sociedade Brasileira de Cardiologia: dados e estatísticas de mortalidade cardiovascular, 2015⁷.

Figura 1. Taxa de mortalidade por doença cardiovascular no Brasil a cada 100.000 habitantes, por unidade federativa no período de 2003 a 2012, segundo estudo ecológico da Sociedade Brasileira de Cardiologia.

INTRODUÇÃO

Observa-se que as DCV têm apresentado uma redução importante na maior parte dos estados, em sua maior parte com reduções entre 10 a 20% ou maiores que 20% (Figura 2). No entanto, muitos estados ainda apresentam altas taxas de óbitos por DCV⁷.

COEFICIENTES DE MORTALIDADE 2003 E 2012 E VARIAÇÃO RELATIVA 2012/2003 - CAP. IX (DCV) - AMBOS OS SEXOS

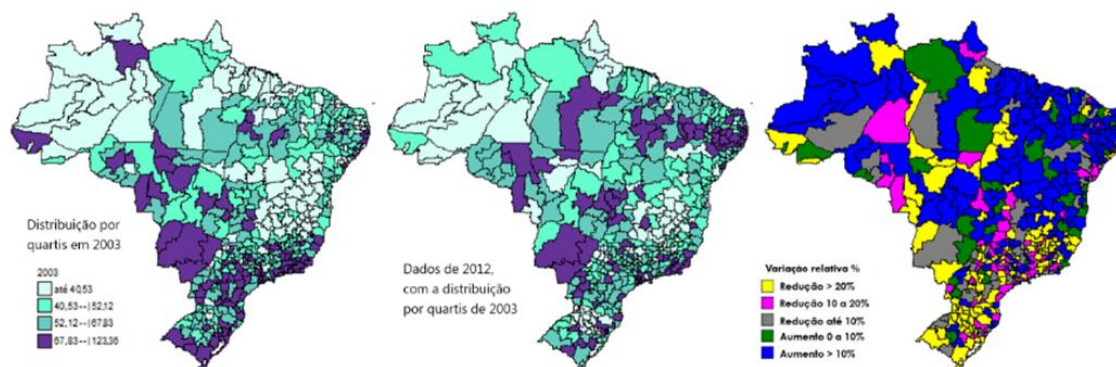


Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia: dados e estatísticas de mortalidade cardiovascular, 2015⁷.

Figura 2. Distribuição dos coeficientes de mortalidade por doença cardiovascular em quartis no Brasil, por unidade federativa no período de 2003 a 2012, segundo estudo ecológico da Sociedade Brasileira de Cardiologia.

No Brasil, na maior parte dos estados, houve aumento da prevalência de mortalidade por IAM, sendo que em muitos estados houve aumento superior à 10% (Figura 3)⁷, o que é um comportamento oposto à queda de prevalência de IAM no mundo.

COEFICIENTES DE MORTALIDADE 2003 E 2012 E VARIAÇÃO RELATIVA 2012/2003 - I20-I25 (IAM) - AMBOS OS SEXOS



Fonte: Sociedade Brasileira de Cardiologia: dados e estatísticas de mortalidade por IAM, 2015⁷.

Figura 3. Distribuição dos coeficientes de mortalidade por IAM em quartis no Brasil por unidade federativa no período de 2003 a 2012, segundo estudo ecológico da Sociedade Brasileira de Cardiologia.

INTRODUÇÃO

A alta prevalência tem destaque nos estados de Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Goiás, Paraíba, Rio Grande do Norte, Roraima e São Paulo, que apresentaram os maiores coeficientes de mortalidade por IAM (figura 4)⁷.

Unidade Federativa	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	variação relativa	Tendência
AC	52,4	30,25	42,05	46,43	47,28	52,45	46,29	45,37	48,63	38,43	-26,64%	
AL	51,8	55,53	50,97	58,93	65,24	60,27	60,67	59,44	66,18	64,60	24,77%	
AM	33,1	33,78	38,21	36,38	39,96	43,82	41,51	42,72	42,69	42,53	28,44%	
AP	43,6	48,93	20,57	26,84	30,21	38,56	33,16	28,38	35,16	42,09	-3,56%	
BA	42,5	42,50	43,34	48,26	46,22	47,62	45,40	47,44	47,17	46,74	10,02%	
CE	45,6	44,07	41,67	49,27	46,89	47,12	42,92	40,56	46,15	49,36	8,18%	
DF	51,9	54,45	47,68	44,39	39,64	35,46	36,20	35,49	38,47	40,20	-22,50%	
ES	68,8	71,72	65,13	71,44	67,54	65,15	68,59	66,45	61,56	58,89	-14,47%	
GO	61,5	67,50	60,87	67,53	60,30	64,35	61,84	61,65	64,64	68,06	10,66%	
MA	40,2	42,12	45,97	45,52	50,69	57,89	56,11	57,69	64,35	61,71	53,62%	
MG	53,0	52,74	49,61	50,95	48,94	46,17	44,29	44,79	45,06	43,38	-18,19%	
MS	83,9	85,70	81,63	85,69	77,35	75,57	70,05	76,64	79,19	73,17	-12,76%	
MT	57,1	55,97	51,96	46,58	50,30	53,45	52,98	57,06	57,08	57,09	0,03%	
PA	40,4	45,15	38,77	42,78	45,38	49,41	48,80	50,72	51,09	54,59	35,29%	
PB	43,4	52,33	56,52	51,68	63,92	66,00	63,23	65,55	69,34	66,22	52,56%	
PE	84,4	84,50	79,82	82,76	85,34	87,40	88,85	86,81	89,62	88,37	4,71%	
PI	52,5	48,09	54,29	53,65	58,71	55,74	51,82	56,09	60,66	65,16	24,21%	
PR	74,7	74,25	69,50	66,11	66,48	66,38	62,15	59,44	60,85	58,56	-21,58%	
RJ	76,5	76,48	73,15	72,65	72,49	76,26	71,92	72,99	73,02	73,14	-4,44%	
RN	54,0	66,84	58,24	60,60	57,46	59,20	59,46	53,76	67,60	67,51	24,99%	
RO	54,1	48,84	48,48	49,84	46,47	50,46	55,48	55,27	51,45	63,73	17,70%	
RR	42,6	33,99	37,02	30,20	44,09	44,29	37,23	41,34	48,87	40,47	-4,96%	
RS	67,1	66,78	60,09	61,41	59,92	58,94	56,91	56,62	56,03	51,88	-22,71%	
SC	63,9	62,13	60,04	58,02	57,88	54,54	56,52	56,16	58,68	54,44	-14,82%	
SE	47,0	48,89	50,31	51,67	48,67	54,45	46,14	53,94	51,26	48,79	3,86%	
SP	81,3	79,25	72,17	72,03	70,42	70,99	67,83	69,09	69,60	69,78	-14,19%	
TO	56,0	67,79	54,91	45,44	59,76	55,55	59,49	57,51	57,08	52,59	-6,13%	

Fonte: adaptado Sociedade Brasileira de Cardiologia: dados e estatísticas de mortalidade cardiovascular, 2015⁷

Figura 4. Taxas de mortalidade por IAM no Brasil a cada 100.000 habitantes, por unidade federativa no período de 2003 a 2012, segundo estudo ecológico da Sociedade Brasileira de Cardiologia.

Fatores de risco como diabetes, dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e obesidade são responsáveis pela alta prevalência e incidência de DCV e DAC. Além disso, há projeções de aumento para ambas³.

Os fatores de risco mais prevalentes mundialmente em 2013 foram: 1º: pressão arterial elevada; 2º: tabagismo; 3º: índice de massa corpórea (IMC); 5º: altos níveis de glicemia em jejum; 6º: uso de álcool; 11º: alto consumo de sódio; 13º: altos níveis de colesterol total; 17º: inatividade física e em 20º baixo consumo de vegetais. E no Brasil, em ordem crescente foram respectivamente: pressão arterial elevada, IMC, consumo de álcool, tabagismo, níveis altos de glicemia em jejum, colesterol total e sódio elevados. Além disso, o risco atribuível

INTRODUÇÃO

a esses fatores para morte cardiovascular foi de 88,5% mundialmente, (IC95%= 86,3 a 90,5). Os fatores de risco representam 87,9% (IC95%= 86,5 a 89,3) de DALY para DCV, contabilizados para ambos os sexos e independentes da idade⁸. Dessa forma, o maior controle dos fatores de risco modificáveis para DVC e doenças isquêmicas do coração pode estar associado à queda global da prevalência dessas doenças⁹.

No Brasil, o cenário não é muito diferente: Hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi encontrada em metade dos homens e mais da metade das mulheres. Além disso, o controle foi baixo (20 a 39%). O consumo de álcool foi alto, principalmente entre mulheres, e o nível de atividade física foi extremamente abaixo do recomendado (pelo menos 30 minutos e 5 vezes por semana). Além disso, a população brasileira está envelhecendo rapidamente¹⁰, isto é considerado um dos principais fatores para o aumento da prevalência e incidência das DCV¹¹.

1.2 Aterosclerose

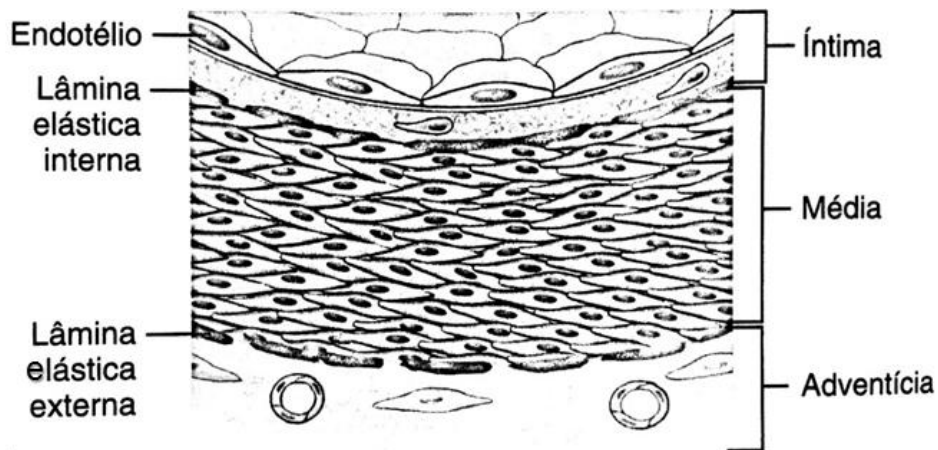
A aterosclerose é a principal causa das DCV¹². A aterosclerose é uma doença progressiva^{12,13}, caracterizada pelo espessamento assimétrico da camada íntima da artéria¹⁴. Recentemente foi descrito que a camada média e adventícia também são afetadas¹⁵. A Aterosclerose constitui-se em acúmulo de lipídios, células inflamatórias e elementos fibrosos dentro da parede da artéria¹⁵. É uma doença multifatorial com envolvimento de muitos fatores de risco¹³, sendo os principais modificáveis o tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, hiperlipidemia, diabetes mellitus, doença renal, e adiposidade¹⁶. Apresenta também componente genético¹³. A inflamação crônica e de baixo grau tem sido considerada como um fator de risco emergente para início precoce da DAC e para a sua progressão¹⁷.

1.2.1 Padrão de artérias coronárias sem lesões

A artéria é constituída de três regiões: íntima, média e adventícia (Figura 5). A camada íntima é definida como a região da parede arterial que inclui a

INTRODUÇÃO

superfície endotelial até a margem da camada média. A lâmina limitante elástica interna (LLEI), geralmente considerada parte da camada média, denota a fronteira entre a camada íntima e média, que pode estar ausente em algumas regiões de transição arterial como bifurcações, ramos e curvaturas¹⁸.



Fonte: Adaptado Schoen FJ¹⁹

Figura 5. Estrutura normal de artéria muscular.

A camada íntima apresenta uma monocamada de células endoteliais¹⁵. A espessura normal da camada íntima em artérias coronárias foi investigada em um estudo de autópsia composta por uma amostra de 63 crianças com idade de até 5 anos. A partir da primeira semana de vida é encontrado um espessamento da camada íntima com dois padrões: excêntrico e difuso, que são contínuos e complementares entre si. O padrão excêntrico foi encontrado principalmente próximo às bifurcações, ocupando metade da parede arterial, de forma crescente até atingir várias vezes a espessura da camada média. O espessamento máximo ocorreu com frequência na origem da artéria coronária descendente anterior, que gradualmente diminui, apresentando afinamento ao longo da artéria. O espessamento difuso ocorreu mais em locais onde não havia espessamento excêntrico. Esse achado foi semelhante entre os sexos. Essas alterações são consideradas respostas às alterações hemodinâmicas e não são patológicas²⁰.

1.2.2 Aspectos morfológicos da aterosclerose

Os achados iniciais estão relacionados a pequenos acúmulos de lipídios, frequentes no início da vida e podem ser divididos em estágios, de acordo com

INTRODUÇÃO

suas características morfológicas. As lesões podem permanecer estáveis por um período, permanentemente, ou ainda progredir. Nas lesões iniciais, as mudanças na composição da matriz ou desarranjo da arquitetura da camada íntima são mínimas ou ausentes. A camada média não está doente e a adventícia não é afetada²¹.

As lesões iniciais (I) foram caracterizadas através de microscopia e reações químicas em estudos de autópsia. Em crianças e adolescentes foram descritos depósitos lipídicos e reações celulares associadas a estes depósitos²⁰, mas também podem ser encontrados em indivíduos adultos. Algumas células espumosas (pequenos grupos isolados de macrófagos contendo gotículas lipídicas) podem ser encontradas nas artérias coronárias, principalmente onde a camada íntima já apresenta remodelamento excêntrico²¹. As células espumosas são assim denominadas devido à sua semelhança com espuma quando observada no microscópio, resultado da acumulação de lipídios dentro do citoplasma¹². Este pequeno aglomerado pode ser denominado como “*intimal xanthomata*”, podendo usualmente regredir. Portanto, este achado não pode ser denominado como uma lesão aterosclerótica. Entretanto, são descritos como fase inicial devido aos estudos que encontraram uma correlação entre a região de espessamento da camada íntima e o aglomerado de macrófagos na infância com o mesmo local onde são desenvolvidas as lesões ateroscleróticas nos adultos²².

O número de macrófagos na camada íntima arterial, em crianças com idade acima de oito meses, que já apresentavam células espumosas foi duas vezes maior comparado com crianças sem células espumosas. Há evidências de que os lipídios séricos podem ser transferidos por via placentária, iniciando a formação de lesões desde a vida intrauterina. Este achado é sustentado pela não correlação entre soro obtido *post mortem* e células espumosas²⁰. A relação de aterosclerose com hiperlipidemia é conhecida desde a década de 70 através de estudos experimentais²³. A hipercolesterolemia causa um aumento na aderência de monócitos no endotélio, particularmente em regiões da camada íntima mais susceptíveis, onde há espessamento adaptativo²¹.

INTRODUÇÃO

As células espumosas podem evoluir para estrias gordurosas (lesões II), que são lesões mais distintas e definidas do que as lesões I. As células do músculo liso, além dos macrófagos, também contêm gotículas de lipídios. Macrófagos, linfócitos T e mastócitos podem estar presentes. Macrófagos se apresentam em maior número, principalmente próximos à superfície endotelial. A maior parte dos lipídios se encontram dentro de células. Poucos lipídeos e algumas partículas de lipoproteínas e proteoglicanos se encontram no espaço extracelular. Nas artérias coronárias, as lesões com grau II podem surgir no período da puberdade e localizam-se na mesma região de lesões I em crianças. A progressão destas lesões está associada a forças mecânicas que atuam sobre áreas estratégicas da artéria. A presença desta força mecânica pode levar a um afluxo e acúmulo precoce de lipídios em pessoas que apresentam níveis altos de lipoproteínas plasmáticas. Estes achados podem não ser visualizados na superfície da camada íntima, denominados como “estrias gordurosas submersas”. Indivíduos com níveis elevados de lipoproteínas aterogênicas como colesterol, casos de hipercolesterolemia familiar ou indivíduos de meia idade podem ter um avanço acelerado para lesões avançadas, mesmo em locais não propensos. Em indivíduos mais jovens, como adolescentes e adultos jovens, a presença de muitas lesões II está associada a altos níveis de colesterol no plasma, que não está associado com o processo da puberdade²¹.

A lesão III é intermediária e considerada como a formação de um pré-ateroma visível microscopicamente. Apresenta um acúmulo extracelular de lipídios, que se acumulam entre as camadas de células do músculo liso, geralmente no mesmo local onde ocorre o espessamento adaptativo da camada íntima. Estes lipídios estão abaixo da camada de macrófagos e das células espumosas. Embora o acúmulo de lipídios seja bem delimitado, maciço e as alterações quanto às confluências ainda não se desenvolveram, a presença de acúmulo de lipídios desarranja a estrutura dos músculos lisos²¹. Um recente estudo de imagem demonstrou que em lesões precoces (estenose menor do que 30%) há presença de microvasculaturas denominadas *vasa vasorum*, além dos macrófagos²⁴.

INTRODUÇÃO

O *vasa vasorum* é uma rede de pequenas artérias e veias, que pode ser encontrado na parede de várias artérias, dentre estas as artérias coronárias^{25,26}. Em artérias normais, o *vasa vasorum* pode ser encontrado na camada adventícia, exceto em arteríolas, vênulas e artérias intracerebrais²⁶. Na presença de aterosclerose, o *vasa vasorum* pode se estender até a camada média-íntima com a função de promover nutrição. Geralmente se estendem a partir da camada adventícia, onde são mais abundantes. Entretanto, em alguns casos, podem surgir a partir do lúmen, especialmente quando há trombose ou artérias recanalizadas²⁶. Nas artérias coronárias, o *vasa vasorum* se origina a partir de segmentos bifurcados dos vasos epicárdicos, e sua presença está associada com hipóxia, inflamação e ativação do receptor tipo *toll-like*. São frequentes quando a camada íntima engrossa 500 μm ²⁵, embora recentemente foram encontrados em lesões de menor espessura²⁴. A atividade nervosa simpática atua no *vasa vasorum*, ajudando a regular o fluxo de sangue. No entanto, parecem ser insensíveis à substâncias que agem na vasoconstrição do vaso, como o tromboxano A₂, norepinefrina e angiotensina II, somente a endotelina-1 e adenosina agiram como vasoconstritores²⁷. Dessa forma, o *vasa vasorum* pode fornecer proteção neural contra a isquemia durante a atividade simpática sustentada. Além disso, está associado com a presença de infiltrados inflamatórios na placa aterosclerótica e núcleo lipídico²⁵.

Lesão IV é o ateroma e a primeira lesão a ser classificada como lesão avançada pelos critérios histológicos²⁸. As lesões avançadas podem ser observadas a partir da terceira década de vida, e apresentam risco potencial de desenvolvimento de trombo e/ou morte súbita²². É considerada como a primeira lesão avançada pelo desarranjo que o núcleo lipídico causa na camada íntima, com possível visualização macroscópica. Isto ocorre por meio da confluência das várias porções lipídicas e acredita-se que o aumento deste núcleo é devido ao afluxo de lipídios através do plasma. As lesões avançadas, geralmente, apresentam um núcleo lipídico grande, bem definido, com a inclusão de minérios^{21,28}, gerado pela calcificação de organelas e de algumas células musculares lisas^{22,28}. A LLEI muitas vezes sofre fragmentação¹⁵. A presença destas alterações desorganiza e deforma a camada íntima, além da camada

INTRODUÇÃO

média subjacente e adventícia, e conseqüentemente leva à deformidade arterial que predisõe eventos isquêmicos^{21,28}.

Estas lesões causam espessamento da parede arterial, mas não obstruem o lúmen, devido ao remodelamento positivo. O aumento do tecido fibroso não é uma característica. Embora os defeitos de superfície não estejam presentes, esta lesão apresenta uma grande importância clínica, pois é propensa à formação de fissuras e instabilização da placa aterosclerótica. São vulneráveis porque a capa fibrosa é fina com escassa presença de colágeno, e células musculares lisas espaçadas e isoladas²⁸. Macrófagos e linfócitos podem estar presentes entre o núcleo lipídico e a superfície endotelial. Na periferia do núcleo lipídico, observam-se células do músculo liso com ou sem inclusões de gotículas de lipídios, e pequenos capilares ao redor podem estar presentes. Entre estas duas regiões há uma camada rica em proteoglicanos, infiltração de células inflamatórias e musculares lisas, além da presença de *vasa vasorum*^{22,28}.

Nas lesões classificadas como V, denominadas como fibroateroma, há um aumento de tecido conjuntivo fibroso e aumento importante de colágeno e de células musculares lisas. Os capilares podem ser mais numerosos e calibrosos. Macrófagos e linfócitos podem estar associados aos capilares e algumas micro-hemorragias podem ocorrer em volta dos capilares e do conteúdo lipídico²⁸.

A diferença entre as lesões IV e V está basicamente no grau de formação da capa fibrosa, podendo variar entre capa fina ou espessa. A capa fibrosa é uma camada composta por tecido conjuntivo que reveste todo o núcleo lipídico. É formada por células musculares lisas em uma matriz com colágeno e proteoglicanos, com infiltração variável de macrófagos e linfócitos. A capa fibrosa é considerada fina quando apresenta uma espessura <65µm. A capa fina diferencia-se do início da sua formação pela quantidade escassa de células musculares lisas, matriz extracelular e infiltração de células inflamatórias. As lesões IV são constituídas de capa fibrosa fina e por este motivo são lesões vulneráveis, devido à sua fragilidade²².

INTRODUÇÃO

Quando as lesões IV ou V apresentam defeitos de superfície do endotélio e/ou hematoma, e/ou hemorragia, e/ou depósitos trombóticos são classificadas como lesões VI²⁸. Essas lesões podem se expressar clinicamente como SCA²⁹. Morfologicamente, a parte interna da lesão pode apresentar características de lesões tipo IV ou V²⁸.

As lesões com trombos podem ser decorrentes de três processos: ruptura; erosão²², do qual o *vasa vasorum* pode ter contribuição²⁶; e nódulo calcificado. Muitas vezes mais de um processo na mesma placa aterosclerótica pode ser identificado. As rupturas podem ser encontradas em 60% das mortes súbitas. Nesta área há interrupção da capa fibrosa, onde as células do músculo liso podem estar escassas. Além disso, esta capa é infiltrada por macrófagos e linfócitos. O trombo subjacente fica frequentemente em contato com o núcleo necrótico interno²².

As erosões representam aproximadamente 40% dos casos de trombose seguida de morte súbita em artérias coronárias. Essas lesões podem ser visualizadas quando são realizados cortes transversais no local do trombo. Neste local, não é possível visualizar a capa fibrosa. Geralmente, o endotélio está ausente no local desta lesão e a camada íntima interrompida revela um baixo grau de inflamação²².

Os nódulos calcificados, erosivos e densos estão associados com a interrupção da capa fibrosa. Não devem ser confundidos com lesões das quais há predominância de lesão fibrocalcificadas²² (lesões VII da classificação AHA)^{28,30}.

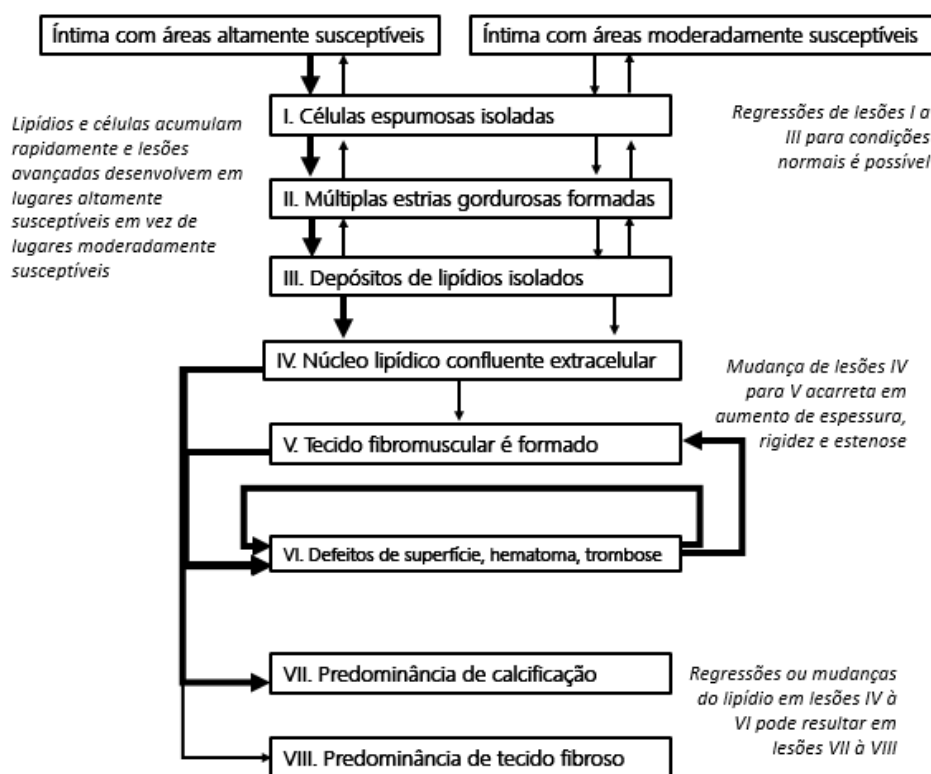
Lesões VII, anteriormente denominada Vb³⁰, apresentam uma grande quantidade de cálcio com aumento do tecido conjuntivo fibroso. Esta calcificação é decorrente de depósitos minerais que substituem as células mortas e lipídio extracelular, incluindo núcleos inteiros²⁸.

Lesões VIII são lesões predominantemente constituídas por conteúdo fibroso que substitui a camada íntima normal e até mesmo o conteúdo lipídico,

INTRODUÇÃO

que pode ser escasso neste nível de lesão. As células do músculo liso estão desarranjadas e diminuídas. Nas camadas média e adventícia podem conter macrófagos, linfócitos e células espumosas²⁸. Esta lesão pode ser a resolução de um ou mais processos, incluindo a organização de trombos, a extensão do componente fibroso de um fibroateroma adjacente, ou a reabsorção dos núcleos lipídicos²⁸.

Esta classificação sofreu alterações, pois na versão antiga, o ciclo trazia a ideia de uma progressão linear com desfecho em placas instáveis, que são alterações capazes de desencadear uma SCA^{21,28}. Devido à desagregação da antiga classificação V (Va, Vb e Vc), o fluxograma foi atualizado com vários ciclos de interações entre os estágios³⁰ (Figura 6). Setas mais grossas indicam maior tendência de progressão e setas mais finas indicam progressão possível, no entanto, com menor ocorrência³⁰.



Fonte: adaptado e traduzido da classificação *American Heart Association*³⁰

Figura 6. Classificação da American Heart Association, elaborado por Stary.

INTRODUÇÃO

1.2.3 Aspectos inflamatórios da aterosclerose

Desde a década de 90, sabe-se que a aterosclerose não é um mero acúmulo de lipídios¹². Há vários grupos de células e intensa atividade bioquímica, modulada pelos fatores de risco. Toda esta rede envolve a atividade imune¹⁵, tanto inata quanto adaptativa³¹, que, atualmente, parece ter um papel central que reúne e modula todos estes fatores¹⁵. Dessa forma, a aterosclerose pode ser considerada uma doença inflamatória³², na qual a camada íntima tem sido o principal foco habitual de investigação¹⁵.

Após a exposição à dieta rica em lipídios, ocorre um acúmulo subendotelial de lipoproteínas na parede do endotélio^{31,32}. Posteriormente, estas lipoproteínas sofrem oxidação e ocorre a ativação das células endoteliais³², que passam a expressar moléculas de adesão de leucócitos VCAM-1 (molécula de adesão vascular), como também a expressão de quimiocinas³¹. Citocinas inflamatórias, como interleucina (IL) 1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), também podem induzir a expressão de VCAM-1 nas células endoteliais em áreas com propensão à formação de placas ateroscleróticas^{12,17,32}. Esta molécula é responsável pela adesão precoce de leucócitos no endotélio vascular, principalmente monócitos e linfócitos T^{12,17}, envolvidos na imunidade inata e adaptativa¹⁵. Essas células inflamatórias se ligam às células endoteliais, que revestem a camada íntima^{12,32}. Os linfócitos T e os monócitos (que posteriormente se diferenciam em macrófagos) são encontrados desde o início da formação da placa aterosclerótica²¹, e se mantêm presentes em todos os estágios da doença³³. Em condições normais, o endotélio resiste à esta aderência dos leucócitos^{12,32}. Um experimento em ratos com hipercolesterolemia induzido por ApoE^(-/-), susceptíveis à formação de placas ateroscleróticas, e modificados geneticamente para menor produção/atividade de VCAM-1, mostraram redução da formação de lesões ateroscleróticas¹². A inativação apolipoproteína (ApoE) leva a um aumento das lipoproteínas plasmáticas devido à ausência da lipoproteína de compensação da ApoE³².

A expressão de VCAM-1 depende da inflamação desencadeada por partículas de lipoproteínas modificadas (fosfolipídios oxidados e aldeídos

INTRODUÇÃO

acrescentados devido à oxidação da lipoproteína), que se acumulam na camada íntima arterial em resposta à hiperlipidemia¹².

Há alguns genes associados à ateroproteção, que possuem capacidade de modular a inflamação em regiões onde há fluxo laminar. Estes genes inibem a expressão de VCAM-1 e contêm elementos de resposta ao estresse de cisalhamento nas regiões, como por exemplo, o óxido nítrico, que combate o estresse oxidativo. Estes achados podem explicar o motivo da formação de ateromas em locais onde há perturbação de fluxos, fenômeno semelhante ao que ocorre na hipercolesterolemia¹².

1.2.3.1 Imunidade Inata

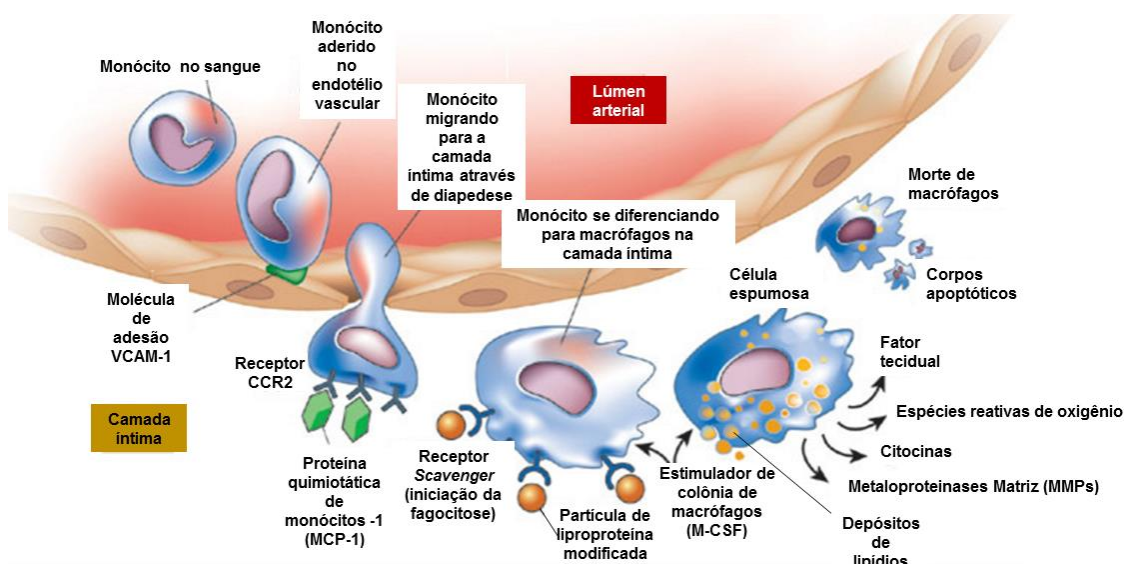
A imunidade inata tem deixado de ser considerada apenas como uma resposta não específica. Atualmente, é vista como um regulador crítico de doença inflamatória, que trabalha em parceria com a imunidade adaptativa. É um sistema rápido, capaz de gerar uma resposta inflamatória protetora em minutos após a exposição ao agente patógeno, e desempenha também um papel central na ativação da resposta imunitária adaptativa subsequente. As principais células são os monócitos, macrófagos e células dendríticas³⁴.

Os leucócitos são atraídos para o endotélio e penetram por diapedese na camada íntima. Há famílias de quimiocinas capazes de recrutar leucócitos para a camada íntima arterial, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). O MCP-1 é expresso na placa aterosclerótica humana e se liga ao receptor dos monócitos, recrutando-os para a placa. Os monócitos atraídos para a camada íntima, uma vez em seu interior, diferenciam-se em macrófagos^{12,32}, por estimulação de mediadores como o estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF)³¹. Os macrófagos expressam receptores *scavenger* que se ligam às partículas de lipoproteínas modificadas internalizadas (por oxidação ou glicação na parede arterial)^{12,32}, fagocitando estas partículas, que eventualmente podem sobrecarregar a capacidade da célula para eliminar estas moléculas. Desse modo, o macrófago começa a acumular colesterol em seu interior, e ao longo do tempo, os macrófagos ficam sobrecarregados com partículas de colesterol,

INTRODUÇÃO

tomando a aparência característica de "células de espuma"³², lesões I classificadas pela AHA²¹.

Os macrófagos podem contribuir para a evolução na morfologia da placa, especialmente na formação do núcleo necrótico e na redução da espessura da capa fibrosa, independente do tamanho das placas³². Além disso, as células de espuma secretam citocinas pró-inflamatórias que amplificam a resposta inflamatória local na lesão, como as espécies reativas de oxigênio¹². Os macrófagos podem morrer por apoptose, dando origem ao núcleo necrótico^{12,31}. As áreas de ruptura estão com frequência associadas com o núcleo necrótico³². Este processo pode ser visualizado na figura 7¹²:



Fonte: adaptado de Libby¹², 2012.

Figura 7. Macrófagos, células espumosas e formação do núcleo necrótico.

Em lesões iniciais ocorre a morte de macrófagos, mas o processo de apoptose de células inflamatórias, reconhecimento e posterior remoção de macrófagos é eficiente. Este é um processo protetor, desencadeado pela IL10, que elimina as células antes que os danos da membrana levem a um extravasamento de conteúdo celular tóxico. Portanto, é uma resposta anti-inflamatória. Em lesões avançadas, este processo é defeituoso, levando a um aumento de células apoptóticas que não são eficientemente eliminadas. Isto leva a um acúmulo de corpos apoptóticos e restos necróticos na lesão, dando origem ao núcleo necrótico na placa aterosclerótica, e a presença deste núcleo contribui

INTRODUÇÃO

para o aumento da inflamação. Este processo promove a progressão da lesão, devido à característica pró-trombótica, e com isso, pode contribuir para o crescimento da placa aterosclerótica e de complicações trombóticas nas lesões³².

A região da capa fibrosa, próxima ao núcleo necrótico, é afetada pelos macrófagos através da produção de metaloproteinases da matriz (MMPs). As MMPs podem degradar a matriz extracelular, que dá resistência à cobertura fibrosa da placa, desencadeando complicações^{12,31,32}. Além disso, as placas vulneráveis estão associadas com diminuição de colágeno, diminuição de células musculares lisas por apoptose^{22,32}, ações das quais os macrófagos parecem ter um papel desencadeador^{32,35}. Quando a placa se rompe, o sangue entra em contato com outro produto secretado pelos macrófagos: o fator de tecido de proteína pró-coagulante^{12,31}. Além disso, os macrófagos se replicam dentro da camada íntima e secretam fatores de crescimento e citocinas. O *vasa vasorum* pode contribuir para o processo de ruptura, como mencionado anteriormente, através do extravasamento de hemácias dos neovasos²⁵, formando a hemorragia de placa²⁸. Este extravasamento de hemácias atrai macrófagos, tanto na junção íntima-média, quanto nas áreas de alta tensão²⁵, como os ombros da placa³⁶. A eritrofagocitose por macrófagos, ativa as células neste local da placa e por seguinte, à secreção de metaloproteinases da matriz, que causa a ruptura da lâmina elástica interna e também da capa fibrosa. A ruptura da capa fibrosa leva à ruptura da placa e trombose²⁵.

1.2.3.2 Imunidade Adaptativa

As células T e B são os principais componentes do sistema imunitário adaptativo. Ao contrário da imunidade inata, suas reações são normalmente altamente específicas e de longa duração, principalmente por meio da geração de memória. Os estudos da imunidade inata foram de grande interesse da comunidade científica neste século³³. Embora não seja um pré-requisito para o desenvolvimento das lesões, a imunidade adaptativa tem um importante papel modulador, tanto pró-aterogênico quanto ateroprotetor³⁷.

INTRODUÇÃO

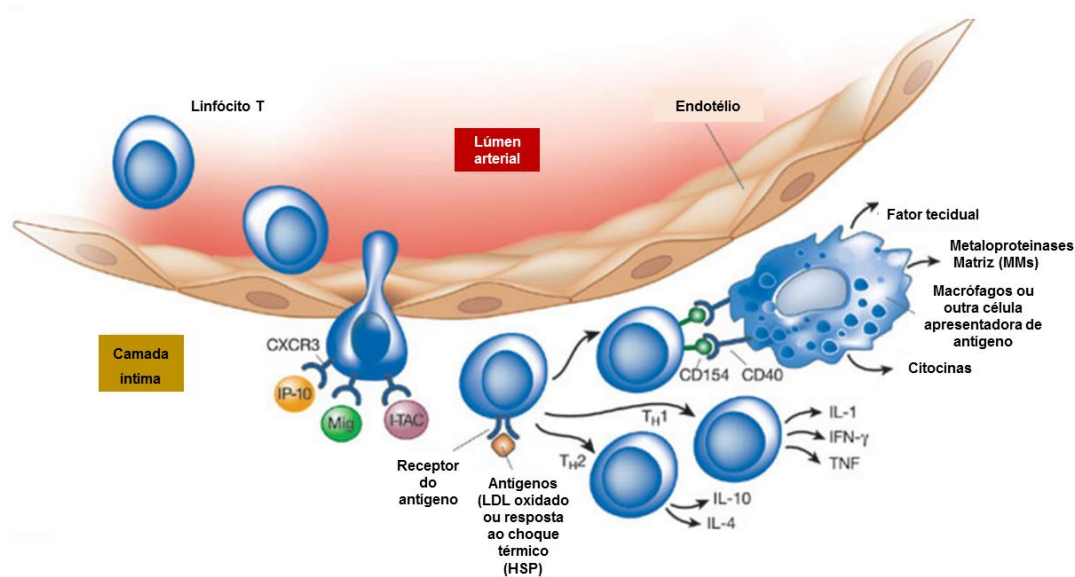
Linfócitos T

Os linfócitos T são classificados de acordo com a expressão de superfície, proteínas e função intracelulares, como secreção de citocinas e a capacidade de auxiliar a outras células, tais como células B e macrófagos. Todos os linfócitos T expressam CD3³⁸, e um dos co-receptores mutuamente exclusivos (CD4 ou CD8)^{33,39}. Os complexos associam-se com os receptores de células T (TCR) para formar um complexo proteico, que permite a transdução de sinal intracelular após o reconhecimento de epítomos, ligados a moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) ou antígeno de leucócitos humanos (HLA), de uma célula apresentadora de antígeno³³. Os linfócitos T só reconhecem antígenos processados e apresentados desta forma por uma célula apresentadora de antígeno³⁹. Os receptores CD4+ e CD8+, auxiliares (*T helper* - Th) e citotóxicos, reconhecem um epítomo em associação com MHC, após a apresentação do antígeno e interação, ativando os linfócitos T. Uma vez ativados, é produzido uma ampla gama de respostas, incluindo a proliferação de células, secreção de citocinas e outros mediadores solúveis, e a expressão de moléculas de superfície³³.

Os linfócitos T, assim como os macrófagos, também são atraídos para o endotélio e penetram na camada íntima sob ação da VCAM-1 e das quimiocinas recrutadoras de linfócitos T da família CXC, conhecidas como o trio que induz interferon- γ (IFN- γ): quimiocina de proteína-10 (CXCL10/IP-10), monocina induzida por interferon-gama (CXCL9/MIG), e a quimiocina atrativa de célula T alfa induzível por interferon (CXCL11/I-TAC)¹², sendo que a última apresenta um papel na migração de linfócitos T ativados⁴⁰. Estas quimioquinas se ligam ao receptor de quimiocina CXCR3 expresso pelas células T na lesão aterosclerótica ou no próprio ateroma. Uma vez na camada íntima arterial, a célula T pode encontrar antígenos, como lipoproteína de baixa densidade oxidada (Ox-LDL) e proteína de resposta ao choque térmico (HSPs)¹², que são expressas em resposta ao estresse celular, térmico ou químico de origem endógena ou microbiana⁴¹. Após a ativação através da ligação entre receptor e antígeno, a célula T produz citocinas que podem influenciar o comportamento de outras células presentes no ateroma. Particularmente em macrófagos, a ligação do

INTRODUÇÃO

CD154 (expressa por células T) com CD40 pode induzir a expressão do fator tecidual, como citocinas pró-inflamatórias e metaloproteínas da matriz (Figura 8)¹². Estas são derivadas de macrófagos, e fazem parte de uma família de enzimas de proteases ativadas que podem degradar vários tipos de proteínas da matriz celular³². A produção destes mediadores fornece um circuito de amplificação, da imunidade adquirida e da imunidade inata (fagócitos mononucleares)¹².



Fonte: adaptado de Libby P¹²

Figura 8. Linfócitos T na aterosclerose.

Dentro do ateroma, os linfócitos T representam cerca de 10% de todas as células da placa aterosclerótica em seres humanos, sendo que 70% são CD4⁺ e o restante CD8⁺³³. Como em outros tecidos, os linfócitos T CD4⁺ auxiliares podem se polarizar³³. Entre estes linfócitos, predominam na placa aterosclerótica os linfócitos Th1, que secretam citocinas predominantemente pró-inflamatórias, sendo a maior fonte de IFN-γ, e portanto, apresentam uma atividade pró-aterogênica^{12,33}. As células Th2 também estão presentes na placa aterosclerótica, com secreção de IL5 e IL13. Em modelos experimentais, a depleção destas células acelerou a progressão do ateroma, portanto, acreditava-se que estas células apresentavam atividade anti-inflamatória e ateroprotetora. Entretanto, recentemente este papel tem sido debatido, pois quando a secreção de IL4, principal característica destas células, foi inibida, placas menos severas

INTRODUÇÃO

foram desenvolvidas, levando à hipótese de que as células Th2 possam ter uma atividade pró-aterogênica. Além disso, a IL4 também tem um papel de induzir a produção de imunoglobulina (Ig) IgE. As células Th2 são capazes de modular as respostas de eosinófilos e mastócitos³³. As células Th17 têm sido estudadas recentemente, mas seu papel ainda é menos claro do que a Th1^{15,37,42}. As Th17 produzem IL17, principal característica destas células, e sua depleção têm mostrado efeito ateroprotetor. A IL17 parece diminuir o desenvolvimento da aterosclerose, a subclasse IL17A tem sido reportada como pró-fibrótica, por aumentar a produção de colágeno e formação da capa fibrosa. Desse modo, é sugerido que as Th17 participam na estabilização da placa³³.

Tabela 1. Principais linfócitos T presentes na placa de aterosclerose.

Célula	Atuação	Pró-aterogênica	Ateroprotetora
CD8⁺	Sua atuação não é clara Aumenta com o número de macrófagos	Possível	Possível
CD4⁺			
. <i>Th1</i>	Predominante em placas ateroscleróticas Secreta IFN- γ (principal) e TNF Depleção IL12/IL18 induz \rightarrow diminui placa	Sim	Não
. <i>Th2</i>	Secreta IL4 (principal) . depleção IL4 induz \rightarrow placas menos severas Secreta IL5 IL13 . depleção IL5 IL13 \rightarrow desacelera progressão Atuação tem sido debatida	Possível	Possível
. <i>Th17</i>	Secreta IL17 (principal) Relacionada com estabilidade da placa	Não	Sim
T regs	Há vários subtipos Comunica a imunidade inata com adaptativa Acreditava-se ateroprotetor Tem sido relacionada com aumento da placa Comunica a imunidade inata com adaptativa	Possível*	Sim

* É possível que as Tregs, além de atuar no sistema imune, participe no metabolismo de lipoproteínas, pois sua depleção em estudos experimentais aumentou DAC e aumentou substancialmente os níveis de LDL³³.

CD: *cluster of differentiation*; IFN: interferon; IL: interleucina, Tregs: Linfócitos T reguladores.

Fonte: Libby¹², Libby e Hansson¹⁵; Ketelhuth e Hansson³³; Tsiantoulas et al.³⁷, Campbell et al.⁴².

Linfócitos B

INTRODUÇÃO

Os linfócitos B apresentam como função principal montar respostas com anticorpos e atuar como células apresentadoras de antígeno para os linfócitos T. Recentemente, foi reportado que também podem modular a imunidade através da liberação de citocinas. Semelhante à sua forma segregada, anticorpos também são expressos na superfície de células B, chamados de receptores de células B (BCRs)³³.

Diferentemente dos linfócitos T, que são muito presentes nas lesões ateroscleróticas, os linfócitos B apresentam apenas algumas células na camada adventícia circundante nas placas ateroscleróticas. Os linfócitos B se organizam em órgãos linfoides terciários e têm sido considerados como reguladores das respostas inflamatórias das lesões^{33,37}. Os linfócitos B já foram defendidos como ateroprotetores, entretanto alguns estudos têm debatido esta atuação. Diferentemente dos macrófagos e linfócitos T, presente em todos os estágios, os linfócitos B só são encontrados nas placas ateroscleróticas³³, em lesões avançadas⁴². Os mecanismos pelos quais os linfócitos B atuam na aterosclerose incluem a produção de imunoglobulinas e formação de complexos imunológicos^{37,42}, que incluem células dendríticas e linfócitos T. Sugere-se que este órgão linfóide terciário atue como um centro de resposta humoral local, onde há a maturação e a produção de anticorpos e apresentação de antígeno pelas células dendríticas⁴².

Os principais antígenos endógenos são as OxLDL, que tem sido apontada como evento chave no desencadeamento da inflamação característica da aterosclerose, e além desta, as HSPs 60, expresso pelas células endoteliais em resposta a vários estímulos pró-aterogênicos, como uma dieta rica em colesterol³⁷. Os mecanismos de atuação são através das imunoglobulinas. Anticorpos específicos para os componentes da placa como OxLDL e HSP 60 neutralizam os antígenos, medeiam a apresentação de antígenos e a liberação de citocinas, incluindo a IL10. Embora alguns estudos apontem que as células B tem função ateroprotetora, estudos em ratos *knockout* para ApoE e LDLR (receptor de lipoproteína de baixa densidade), e depleção do anticorpo anti-CD20, mostrou redução significativa da lesão aterosclerótica. Desse modo, a atuação das células B na aterosclerose ainda é controversa. Há dois grandes

INTRODUÇÃO

subtipos de células B: B1 e B2^{37,42}. Linfócitos B1 produzem IgM e IgA naturais, e podem ser subdivididas em B1a (aparentemente ateroprotetora) pela secreção de IgM e estão em menor número; e B1b, mas sua atuação ainda não é conhecida³⁷. As células B2^{37,42} apresentam provável atuação pró-aterogênica, mas ainda é discutível^{37,42}.

As células B1 têm como principal função secretar IgM natural com hipótese de agir de forma preventiva contra DCV^{37,42}. As IgGs, secretadas pelos linfócitos B2, são o principal subtipo de imunoglobulina circulantes nos seres humanos e estão presentes nas placas ateroscleróticas. Acredita-se que devam ter atividade pró-aterogênica, mas ainda há poucas evidências³⁷.

Participação da camada adventícia e média na inflamação da aterosclerose

Além dos mecanismos de quimiotaxia, há o *vasa vasorum* em placas ateroscleróticas, que forma uma comunicação desde a camada adventícia até a íntima²⁶, e pode contribuir para o recrutamento de linfócitos para a camada adventícia, e dessa forma, pode modular a resposta imune nas placas ateroscleróticas, tanto em humanos, quando em ratos⁴². A camada adventícia é a origem da neovascularização da placa aterosclerótica e foco da atividade inflamatória¹⁵, pois é o local de maior número e organização dos linfócitos T e B, que, conseqüentemente, contribui para a resposta imune tanto inata, quanto adaptativa, que regulam a aterosclerose^{15,42}. Além disso, há estruturas linfoides terciárias organizadas na camada adventícia, o que modula a resposta imunitária adaptativa. As células dendríticas são presentes^{15,42} e apresentam um papel de patrulhar a camada adventícia e as outras regiões da placa, com o objetivo de encontrar antígenos e os apresentar aos linfócitos T, sendo, portanto, uma outra via de ativação da imunidade adaptativa.

A camada média, até o momento, aparenta não ter uma atividade imunitária e inflamatória exuberante, isso se deve às células musculares lisas, que quando estimuladas pelo interferon- γ (através dos linfócitos Th1), produzem indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que é uma enzima que inibe a proliferação

INTRODUÇÃO

dos linfócitos T. Isto pode limitar as respostas inflamatórias e imunes da camada íntima e proteger a integridade arterial¹⁵.

1.3 Obesidade e doença arterial coronariana

A obesidade está associada com disfunção do tecido adiposo⁴³ e com a inflamação sistêmica^{44,45}. A população de macrófagos, que normalmente representa entre 5-10% de todas as células presentes no tecido adiposo, em condições de obesidade aumenta para até 60%⁴⁴.

A obesidade é considerada um problema de saúde pública no mundo todo e pode ser definida como um acúmulo de excessivo de tecido adiposo no corpo⁴⁵. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a prevalência de indivíduos, de ambos sexos, com idade maior ou igual a 18 anos, em condição de sobrepeso (IMC \geq 25 kg/m²) no Brasil foi de 54,1% (48,7 e 59,3)⁴⁶ e de obesidade (IMC \geq 30 kg/m²) foi de 20% (15,8 e 24)⁴⁷, ambas estimativas ajustadas para idade.

O IMC é um marcador de obesidade total e foi demonstrado como um indicador associado com inflamação sistêmica em indivíduos saudáveis⁴⁸. Além disso, a obesidade já é conhecida como um fator de risco independente para doenças cardiovasculares, principalmente em mulheres, desde a década de 80. Na coorte do tradicional estudo *Framingham Heart Study* foi investigado a incidência de DAC ao longo de 26 anos. O peso foi associado com óbito por DAC e insuficiência cardíaca congestiva em homens, independentemente da idade, colesterol, pressão arterial sistólica, uso de cigarro, hipertrofia ventricular esquerda e a intolerância à glicose. Em mulheres também foi encontrada associação positiva e de modo independente para DAC, AVC, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e morte por DAC e DCV em geral⁴⁹.

1.4 Tecido Adiposo

O tecido adiposo apresenta funções metabólicas e imunes de amplo espectro, podendo ser classificada entre tecido adiposo branco ou marrom⁵⁰. O tecido adiposo branco apresenta a função de estoque de energia em forma de triglicérides, com formato de gotículas únicas de gordura (unilocular), e

INTRODUÇÃO

apresenta uma quantidade variável de mitocôndrias. Grandes quantidades de tecido adiposo branco estão associadas com distúrbios relacionados à obesidade, e esta quantidade aumenta de acordo com a idade, proporcionalmente ao peso total do corpo. O tecido adiposo marrom tem como função dissipar energia através de produção de calor. Seus adipócitos são multiloculares com vacúolos, e grande número de mitocôndrias, e em humanos diminui com o envelhecimento. Apresenta distribuição estratégica no corpo para fornecimento de energia para os órgãos vitais⁵¹.

A constituição do tecido adiposo branco vai além de adipócitos, como também células estromais vasculares, incluindo células fibroblásticas do tecido conjuntivo e pré-adipócitos (ainda não preenchidas com lipídios), que contribuem para a integridade estrutural e constituem cerca de 50% do seu conteúdo celular total. Além disso, há muitos leucócitos: macrófagos, linfócitos T CD4, CD8 e reguladores, *natural killer* T, linfócitos B, mastócitos, eosinófilos e macrófagos^{43,44,50,52}.

O tecido adiposo branco saudável é considerado como um órgão endócrino que secreta muitas adipocinas, que possuem múltiplas funções e influenciam várias funções fisiológicas como metabolismo de nutrientes, sinalização de saciedade, angiogênese e atua diretamente no sistema cardiovascular. Participa também da resposta inflamatória⁴³, sendo considerado atualmente como um órgão imune⁵⁰. As principais adipocinas são:

- (1) Adiponectina: sensibiliza a insulina em tecidos periféricos, sendo seus níveis inversamente proporcionais à resistência insulínica, obesidade^{43,45}, diabetes⁴³ e ao IMC⁴⁴; aumenta a oxidação de ácidos graxos; inibe a gliconeogênese e aumenta a absorção de glicose nos adipócitos⁴³. Sua diminuição atribui perda do sinal anti-inflamatório e com isso contribui para o desenvolvimento de inflamação na obesidade⁴⁵. Apresenta efeitos ateroprotetores por modulação da resposta inflamatória do endotélio através da inibição da expressão de moléculas de adesão de células endoteliais e adesão de monócitos ao endotélio vascular. Além disso, inibe a formação de células de espuma por suprimir a expressão de receptores *scavenger* e reduz a

INTRODUÇÃO

proliferação de células musculares lisas. No entanto, níveis elevados de adiponectina estão presentes em doenças inflamatórias e autoimunes crônicas⁴⁴.

- (2) Leptina: tem efeito central na diminuição de apetite e também aumenta a oxidação de gordura em muitos tecidos periféricos. A obesidade está associada com aumento de seus níveis, mas observa-se uma resistência à ação da leptina⁴³. Apresenta tanto efeito ateroprotetor, pela diminuição de acúmulo de lipídios e diminuição de lipotoxicidade por indução de apoptose de ácidos graxos, quanto pró-aterogênico por indução da disfunção endotelial, estimulação da inflamação, geração de estresse oxidativo, aumento da agregação plaquetária, hipertrofia e proliferação de células musculares lisas⁴⁴.
- (3) Apelina: seu aumento está associado com a obesidade, mas apresenta efeitos benéficos como: estimulador de contratilidade cardíaca, promove vasodilatação e mostrou-se redutora de pressão arterial em ratos⁴⁴.
- (4) Visfatina: reduz a apoptose em células do músculo liso vascular e células endoteliais humanas, mas a sua expressão aumentada está relacionada com placas instáveis na artéria carótida e aterosclerose em artérias coronárias⁴⁴.
- (5) Resistina: associada com a obesidade e resistência insulínica, além de ser relacionada com doenças cardiovasculares.
- (6) Chemerin: relacionada com citocinas pró-inflamatórias, proteína C reativa, IL-6 e TNF⁴⁴.

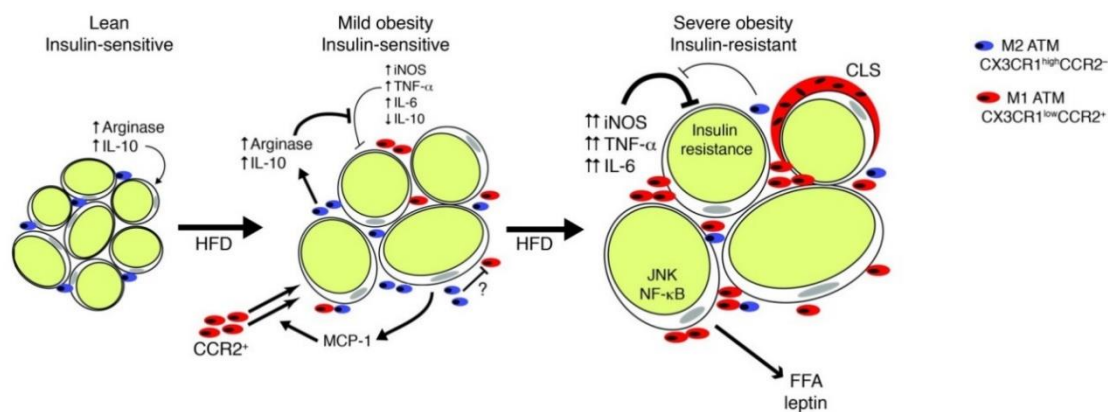
O tecido adiposo tem a função de proporcionar isolamento térmico⁴⁴ e proteger outros órgãos de danos mecânicos^{45,44}. Os dois principais depósitos de tecido adiposo branco são o visceral, que incluindo o omento corresponde à 10% do total de tecido adiposo corporal; subcutâneo, que corresponde à aproximadamente 85%; e os tecidos adiposos que revestem os órgãos como o coração, rins e gânglios linfáticos⁵⁰. Apresenta também a função de armazenamento de triglicérides, liberação de ácidos graxos livres para a circulação para oxidação ou armazenamento por outros tipos celulares, de acordo com o estímulo hormonal, sendo, portanto, um importante regulador da

INTRODUÇÃO

liberação ou armazenamento de gordura, além das adipocinas, já listadas, que regulam a homeostase metabólica, agindo em órgãos distantes, tais como o cérebro, rim, fígado, pâncreas e músculo esquelético⁴⁵.

As células imunes estão presentes no tecido adiposo branco^{45,50}. Através de uma complexa rede, essas células contribuem para as funções do tecido adiposo, como o armazenamento de triglicérides (reserva de energia) e homeostase da glicose. Na obesidade, os adipócitos se hipertrofiam e não armazenam energia de forma eficiente, as células imunes se desregulam, e em alguns casos adquirem um fenótipo pró-inflamatório com efeitos deletérios para o organismo. Os adipócitos se hipertrofiam e os vasos sanguíneos se tornam rarefeitos levando à hipóxia e estresse oxidativo. Este processo induz a morte celular dos adipócitos e eleva a produção de mediadores inflamatórios derivados do adipócito como a leptina, resistina e outros como MCP-1, que induz o recrutamento, proliferação e ativação de macrófagos. Os macrófagos assumem um fenótipo pró-inflamatório (M1), há o aumento de linfócitos T Th1, e linfócitos citotóxicos CD8⁺ ^{45,50,53}. Estes macrófagos fagocitam os adipócitos em processo de morte ou mortos, formando uma estrutura denominada “*crown-like structures*” (CLS), que apresenta a morfologia de um anel de macrófagos e outras células do sistema imunológico que cercam estes adipócitos. Esta formação parece ser um processo adaptativo para eliminar os detritos celulares ou para limitar a liberação de lipídios tóxicos quando adipócitos sofrem morte celular por meio de fagocitose⁴⁵. No entanto, os macrófagos ativados com fenótipo pró-inflamatório secretam TNF- α , IL 1 β , IL-6 e IL-8, cuja atividade levam à resistência à insulina. Em resposta, são ativados os macrófagos com fenótipo anti-inflamatório M2, que aumentam a liberação de citocinas anti-inflamatórias e IL-10 para proteger os adipócitos dos riscos de um processo inflamatório exacerbado⁵². Este processo pode ser visualizado na figura 9. Tanto o número de macrófagos, quanto a mudança de fenótipo de pró para anti-inflamatório/reparador (M2) são afetados pela perda de peso⁵².

INTRODUÇÃO



Fonte: Lumeng et al.⁵².

Figura 9. Processo inflamatório induzido pela obesidade.

Os linfócitos B, em condições de obesidade, estão relacionados com resistência à insulina, e também com a produção e infiltração de IgG no tecido adiposo⁵⁰. Em indivíduos com obesidade mórbida (IMC ≥ 40 kg/m², com IMC médio de 46kg/m²) foram encontrados linfócitos T e B no tecido adiposo subcutâneo, formando CLS. Além disso, os linfócitos B foram associados de modo independente com o uso de metformina, independente dos níveis de hemoglobina glicada e diabetes mellitus⁵⁴.

1.4.1 Tecido adiposo epicárdico

O tecido adiposo epicárdico (TAE) é o tecido adiposo visceral torácico adjacente ao coração^{55,56}. É classificado como um tecido adiposo branco⁵⁵, e, portanto, pode secretar adipocinas como um órgão endócrino, armazenar lipídios e atuar como um tecido inflamatório. Partilha a mesma origem embrionária do tecido adiposo omental e mesentérica. Em adultos está concentrado no espaço atrioventricular e interventricular e acompanha o trajeto das artérias coronárias. O tecido adiposo pericárdico é denominado como a gordura epicárdica (em todos os locais possíveis), somado à gordura paracardíaca, ou mediastinal (superfície externa do pericárdio parietal dentro do mediastino), sendo que este apresenta fornecimento de diferentes fontes, incluindo a artéria pericardiofrênica, um ramo da artéria mamária interna⁵⁵. Já a irrigação do TAE é feita pelas artérias coronárias^{55,56}. A função do TAE é de capturar e armazenar ácidos graxos livres interventriculares para proteger os cardiomiócitos da exposição de concentrações excessivas de ácidos graxos livres das artérias coronárias

INTRODUÇÃO

durante o aumento da ingestão de energia. Alternativamente libera ácidos graxos livres como fonte de ATP imediato para o miocárdio durante os períodos de necessidade. Estudos de autópsia sugerem que o TAE, em um coração sem alterações, representa 15% do peso do coração⁵⁵.

O TAE secreta adipocinas^{55,56}, contém nervos adrenérgicos e colinérgicos que interagem com o sistema nervoso simpático e parassimpático no coração⁵⁷. É possível medir a espessura através de métodos de imagem. Atualmente, a espessura do TAE é visto como um fator de risco metabólico e cardiovascular melhor do que a circunferência abdominal, com boas correlações com os níveis de insulina e pressão arterial sistólica⁵⁸. O TAE é espesso em pessoas com diabetes mellitus, síndrome metabólica, esteatose hepática e aterosclerose subclínica⁵⁶.

1.4.2 Tecido adiposo perivascular

O tecido adiposo perivascular (TAP) é diferente de outros tecidos adiposos, por causa de sua localização ao redor da maior parte dos vasos sanguíneos, com exceção da circulação cerebral⁵⁹. Ainda não é muito bem estabelecido se o TAP é um tecido adiposo branco, bege, marrom ou outro tipo de tecido adiposo⁶⁰, embora haja evidências para se acreditar que seja tecido adiposo branco. O TAP possui um contato direto com a camada adventícia⁶¹ e com o *vasa vasorum*⁵⁹. Muitas vezes o TAP infiltra na camada adventícia. O TAP apresenta adipócitos menores e irregulares em relação aos adipócitos em outros sítios, como por exemplo, o tecido adiposo subcutâneo e perirrenal⁶¹. Além da diferença morfológica, há propriedades funcionais intrínsecas ao TAP como a secreção de citocinas com um perfil pró-inflamatório (IL6, IL8 e MCP-1) e secreção reduzida de adiponectina. Dessa forma, acredita-se que o TAP pode participar do desenvolvimento da aterosclerose por contribuir para a inflamação na camada adventícia⁶¹. O TAP também secreta adipocinas, libera de espécies reativas de oxigênio, é infiltrado por macrófagos e linfócitos T e tem papel na diminuição da contratilidade vascular. Com a obesidade, como acontece nos demais tecidos adiposos, há aumento do TAP, hipertrofia e hipóxia, levando à inflamação do TAP e aumento da contratilidade vascular sugerida pelo

INTRODUÇÃO

desbalanço da secreção de adipocinas e da presença de inflamação. Estudos experimentais mostraram que a massa de TAP pode ser diminuída na presença de hipertensão e também perda do efeito de anti-contratilidade⁵⁹.

1.5 Tecido adiposo cardíaco: epicárdico e perivascular associados com DAC

Os estudos que relacionam tanto inflamação no TAE, quanto TAP com a aterosclerose coronariana têm sido alvo de intensa investigação na última década. Um dos primeiros estudos foi de Mazurek et al.⁶², em 2003, que compararam a expressão de mediadores inflamatórios no TAE e no tecido adiposo subcutâneo (TAS). Foi realizada coleta de sangue e amostras dos tecidos descritos em 55 pacientes com DAC severa submetidos à revascularização do miocárdio. Os mediadores inflamatórios IL6, IL-1 β , TNF- α e MCP-1 foram maiores no TAE do que no TAS. Não foram encontradas associações entre as variáveis clínicas e concentrações dos mediadores inflamatórios no plasma com a inflamação no TAE. A expressão dos genes relacionados às citocinas evidenciou a presença de inflamação no TAE. Posteriormente realizaram a técnica de imunoistoquímica em 11 destes pacientes para marcação de linfócitos T (CD3), macrófagos (CD68) e mastócitos (*tryptase*). Observou-se um denso infiltrado de células inflamatórias no TAE, variados dentro dos capilares sanguíneos e nenhum achado em TAS.

Um estudo japonês de Konishi et al.⁶³, em 2010, avaliaram a associação entre inflamação no TAP e DAC através de análise patológica em uma amostra e clínica em outra amostra utilizando tomografia computadorizada (TC). Primeiramente, foram analisados 39 indivíduos submetidos ao exame de autópsia (21 indivíduos no grupo DAC com estenose \geq 50% e 18 no grupo < 50% de estenose) para avaliar a associação com a inflamação no TAP e DAC. Desta amostra somente a coronária direita foi avaliada através de cortes transversais. O TAP foi avaliado através de método de imunoistoquímica (IHQ) com anticorpo primário CD45 para corar leucócitos. Em seguida, as células positivas foram quantificadas em dez pontos a 400x de ampliação e resultado expresso em células/mm². Adicionalmente, na segunda amostra, 39 pacientes vivos com SCA

INTRODUÇÃO

(angina instável, infarto com ou sem elevação do segmento ST) foram recrutados e submetidos à angiografia-TC, e estes indivíduos foram comparados com mais 30 indivíduos com suspeita de DAC sem cirurgia prévia, arritmia ou intervenção coronária percutânea. Nestes indivíduos, a inflamação foi estimada pela densidade celular perto da lesão culpada e em um segmento não culpado, e posteriormente, foi criado um índice da diferença entre as densidades. Foi encontrado maior número de leucócitos no grupo DAC em relação aos controles na amostra de autópsia; e nos estudos de imagem, a densidade foi maior ao redor de lesões instáveis culpadas no grupo com SCA. A diferença de densidade celular foi maior nos grupos com DAC do que sem DAC.

Hirata et al.⁶⁴, em 2011 avaliaram tanto a infiltração de macrófagos e linfócitos T, quanto a expressão de citocinas no TAE e no TAS, em material obtido durante cirurgia cardíaca eletiva de revascularização do miocárdio (DAC+) de 8 pacientes, e em cirurgia cardíaca eletiva de troca valvar de 9 pacientes (controles). As amostras foram analisadas através da técnica de imunistoquímica para células T CD4⁺ e CD8⁺, e CD68 para macrófagos. As células foram quantificadas em 3 campos aleatórios com diâmetro de 200µm. Foi realizada a isolamento e quantificação de RNA mensageiro. O número de macrófagos e linfócitos T CD8⁺ foi maior no grupo com DAC+. Os linfócitos T CD4⁺ não foram encontrados no TAE e TAS em ambos grupos. A expressão de adipocinas, IL6, TNF- α e MCP-1 no TAE e TAS não foram diferentes entre os grupos.

O mesmo grupo investigou a polarização e expressão de citocinas de macrófagos polarizados no TAE e TAS de 38 indivíduos submetidos à cirurgia cardíaca eletiva de revascularização do miocárdio (DAC+) e de 40 indivíduos submetidos à cirurgia cardíaca eletiva de troca valvar mitral ou aórtica (controles). Para identificação dos macrófagos foi utilizada a técnica de imunistoquímica, para fenótipo M1 foi utilizado o anticorpo CD11c, e para M2 foi utilizado o anticorpo CD206, e para macrófagos em geral foi utilizado o anticorpo CD68. A quantificação seguiu os mesmos parâmetros do estudo anterior. O número de macrófagos CD68, tanto M1 quanto M2 foi maior no grupo com DAC+ comparado aos controles. Além disso, foi confirmado por

INTRODUÇÃO

imunofluorescência com dupla marcação que não houve nenhum CD68 corado isoladamente, ou seja, todos macrófagos marcados com fenótipos M1 e M2 através dos anticorpos CD11c e CD206 foram corados por CD68, evidenciando que são bons marcadores para fenotipagem de macrófagos. A proporção de células CD11c/CD68-positivo (pró-inflamatório) foi significativamente aumentada, e a proporção de células CD206/CD68-positivas (anti-inflamatório) foi significativamente reduzida no TAE no grupo DAC+. No TAS não houve diferenças entre os grupos. Os números de macrófagos foram associados com a gravidade de aterosclerose pela pontuação Gensini. Os resultados mostraram que a proporção de CD11c/CD206 mostraram uma boa correlação com a pontuação Gensini, evidenciando que a polarização de macrófagos é uma melhor ferramenta para avaliar a inflamação no TAE. Em relação às citocinas IL-6, TNF- α , e MCP-1, citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos M1, foram positivas no TAE no grupo com DAC. E as citocinas IL-10 e AMAC1, citocinas anti-inflamatórias secretadas por macrófagos M2, também foram regulados positivamente no TAE no grupo DAC. No entanto, no TAS não foi observado diferenças entre os grupos⁶⁵.

Verhagen et al.⁶⁶, em 2012, em um estudo *post mortem*, investigaram a relação da quantidade e inflamação do TAP com o tamanho e composição de placa da artéria coronária descendente anterior (DA). Foram incluídos 16 indivíduos com idade > 40 anos ou causa de morte vascular. A artéria coronária DA foi dissecada em até 6 cm com o TAP delimitado por um raio de 1 a 2 cm, e após fixação foram realizados cortes transversais gerando 143 fragmentos analisados. As secções foram definidas entre proximais e distais (fragmentos controles), sendo proximais os três primeiros centímetros após a bifurcação e distal entre 3 a 6 cm ao longo do trajeto. A estenose do lúmen foi aferida e a avaliação da composição de placa foi feita, quanto à presença de núcleo lipídico, calcificação, colágeno e células musculares lisas. Além disso, as placas foram coradas para macrófagos (CD68), linfócitos T (CD3) e linfócitos B (CD20) através da técnica de imunistoquímica e divididos em categorias de acordo com o número de células inflamatórias em, pelo menos, um quadrante. No TAP, foi estimado a espessura, o tamanho do adipócito e número de macrófagos em 10 campos com amplificação de 400x em todos os quadrantes da artéria coronária.

INTRODUÇÃO

A maior parte da casuística tinha IAM (75%), sendo que somente em seis indivíduos foram encontradas lesões instáveis (presença de hemorragia de placa ou trombo). Além disso, algumas lesões instáveis estavam localizadas em outras artérias coronárias não avaliadas (artéria coronária direita), ou estavam na artéria coronária DA, mas neste estudo só foi analisado a estenose de lúmen, independente da estabilidade da placa. A inflamação (macrófago) no TAP foi associada com tamanho da placa. Maior área do TAP foi associado com maior número de macrófagos e linfócitos da placa. O aumento de macrófagos no TAP foi associado com placas de ateroma com conteúdo lipídico, calcificação e baixo teor de colágeno. Finalmente, o número de macrófagos no TAP foi associado com infiltração de macrófagos e linfócitos na placa de aterosclerose na camada adventícia.

Grosso et al.⁶⁷, em 2014, investigaram os efeitos anti-inflamatórios de sinvastatina e pioglitazona em 73 pacientes submetidos à revascularização do miocárdio (grupo DAC) e valvuloplastia (controles), subdivididos em quatro grupos: controles sem tratamento (n=17), uso de sinvastatina sozinha (20 mg/dia, n=20), pioglitazona sozinha (30 mg/dia, n=18), ou sinvastatina e pioglitazona (20 mg/dia + 30 mg/dia, n=18). Os critérios de exclusão foram: indivíduos com doença hepática, insuficiência renal, doenças neoplásicas, doenças metabólicas, HIV positivos, e tabagistas. Os tratamentos foram iniciados três meses antes da cirurgia e mantido até a data da cirurgia. Uma amostra de TAE foi retirada na região da artéria coronária direita e realizado imunistoquímica para macrófagos com anticorpo CD68, linfócitos T com anticorpo CD45 clone específico UCHL1⁶⁸, e linfócitos B com anticorpo CD20. A análise das células foi feita pelo percentual de área positiva para células e marcadores inflamatórios foi quantificado em três campos (bordas, centro e adjacente aos vasos no TAE). Foram obtidas amostras de sangue para mensurar: adiponectina, leptina, resistina, MCP-1, matriz de metaloproteinase-9 (MMP-9) e dimetilarginina assimétrica (ADMA), IL-6 e TNF- α . O uso de pioglitazona e sinvastatina, associados ou sozinhos, reduziu a proteína C reativa; a sinvastatina sozinha reduziu IL-6, leptina, resistina e MCP-1; a pioglitazona sozinha reduziu IL-6, TNF- α , resistina e matriz e de metaloproteinases-9; e a associação de ambos reduziu IL-6, TNF- α , resistina e ADMA e MMP-9.

INTRODUÇÃO

Resultados foram baseados em comparação aos controles. No TAE não foram observados linfócitos B e T no grupo que usou pioglitazona sozinha e no grupo controle. Foi observado que houve redução de macrófagos com o uso dos medicamentos. Houve aglomerados de macrófagos, linfócitos T e B concentrados perto da borda ou em torno de vasos sanguíneos no TAE de pacientes tratados com sinvastatina. Entretanto, linfócitos B não foram observados no centro do TAE. Autores sugerem que a ação da sinvastatina e pioglitazona podem reduzir a inflamação no plasma e no TAE simultaneamente.

Távora et al.⁶⁹, em 2010, investigaram a associação entre o grau de inflamação linfocítica na camada adventícia nas artérias coronárias com o tipo de placa na camada íntima subjacente, em 81 homens e 13 mulheres com DAC grave e que sofreram morte súbita. Lesões com obstrução arterial $\geq 75\%$, estimado por inspeção macroscópica, foram analisadas. As artérias coronárias foram dissecadas e cortadas transversalmente entre 3 a 5 mm e as secções foram avaliadas de acordo com critérios da *American Heart Association* (AHA). Na amostra, 44 indivíduos apresentaram ruptura ou fissura aguda, 12 tinham erosão aguda e 38 apresentaram placas estáveis. Das 3868 secções analisadas histologicamente, foram avaliadas um subconjunto com 464 secções, algumas secções com aterosclerose e outras sem aterosclerose (dado não mostrado no artigo), sendo realizado imunistoquímica para macrófagos (CD68) com o objetivo de avaliar a densidade de macrófagos no tecido adiposo peri-adventicial com a característica e inflamação da placa aterosclerótica. Embora tenham incluído um grande número de indivíduos com lesões instáveis e culpadas, somente as secções estáveis foram utilizadas para avaliar a associação de densidade de macrófagos no tecido adiposo peri-adventicial com espessamento difuso da camada íntima, espessamento patológico da camada íntima, placa fibrosa, fibroateroma e *intimal xanthomata*. Os macrófagos foram quantificados em 4 ou mais campos com aumento de 40x e na camada íntima foi determinado o grau da quantidade de macrófagos através de uma classificação ordinal de 0 a 4. Foi encontrado que no tecido adiposo peri-adventicial, a maior densidade de macrófagos foi associada à maior *intimal xanthomata* e ao fibroateroma em relação aos outros tipos de placa. Houve correlação de macrófagos no tecido

INTRODUÇÃO

adiposo peri-adventicial com a quantidade de macrófagos na camada íntima e o escore de linfócitos na camada adventícia (linfócitos B [CD20] e T [CD3])⁶⁹.

Em um estudo mais recente, Kralova et al.⁷⁰, em 2015, investigaram a relação entre DAC e a quantidade de TAP, diâmetro da artéria coronária e o total do número de macrófagos no TAP em corações doados por indivíduos que receberam transplante cardíaco. Foram coletados corações de 96 pacientes (58 com DAC avançada e insuficiência cardíaca, e 38 com cardiomiopatia dilatada). O coração foi pesado, retirado duas amostras (proximal e distal) junto de TAP adjacente à artéria coronária DA, e em seguida, foram fixadas em formol por pelo menos 24h. Outro pesquisador, cego para a divisão dos grupos, foi responsável pela separação e avaliação das amostras. Foi realizada a técnica de imunistoquímica do TAP e artéria com CD68, e confeccionado lâminas da artéria com TAP para estimar a área de ambos através de quantificação estereológica (cruzamento de pontos com um *grid*). A quantificação do número de macrófagos foi realizada na parede da artéria coronária e no TAP com seis campos alocados de modo sistemático sob aumento de 40 vezes com um *grid*. Além disso, a área da artéria coronária e de TAP foram mensuradas. Não houve diferença na área de TAP entre os grupos de DAC e cardiomiopatia dilatada, tanto proximal, quanto distal, mas houve para a área da artéria coronária, que foi maior no grupo com DAC. Adicionalmente, o número de macrófagos no TAP no grupo DAC foi diferente do grupo controle, proximal e distal. O número de macrófagos na parede da artéria coronária DA foi superior no grupo DAC quando comparado ao grupo controle⁷⁰.

Estes estudos sugerem que a inflamação no tecido adiposo epicárdico ou epicárdico perivascular está associada com a aterosclerose coronariana, embora apresentem algumas limitações.

Em muitos estudos o TAE foi o objeto de análise^{62-65,67}, mas sugere-se que TAP apresenta uma atuação específica por ser um tecido especializado. O TAE foi alvo de ampla investigação na maior parte destes estudos^{62,64,65,70}, que obtiveram amostras provenientes de cirurgias e biópsias^{62,64,65,67,70}. A investigação das células inflamatórias no TAE foi amplo, incluindo linfócitos T no

INTRODUÇÃO

geral (CD3)⁶², linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺⁶⁴, e macrófagos que foram amplamente investigados em todos os estudos^{62,64,70} incluindo a sua fenotipagem⁶⁵ e foi detectada a presença de linfócitos B em *clusters* ao redor dos vasos, mas esta presença foi ausente no centro do TAE⁶⁷. No entanto, a cirurgia, principalmente as revascularizações do miocárdio com uso de circulação extracorpórea, pode desencadear inflamação^{71,72}, com elevações das proteínas de resposta ao choque térmico (HSPs) e monócitos⁷¹.

Dos estudos que investigaram TAP, a maior parte foram através de material de autópsia, porém mesmo com acesso à todas as artérias coronárias foi investigado apenas uma artéria coronária, principalmente a artéria coronária direita⁶³, ou descendente anterior^{66,70}. Somente Tavora et al.⁶⁹ investigaram a lesão culpada abrangendo todas as artérias. Além disso, somente os macrófagos (CD68) foram investigados no TAP^{63,66,69,70}.

Os macrófagos e leucócitos (CD45) foram comparados em áreas diferentes com e sem aterosclerose com o objetivo de investigar se a inflamação estava associada localmente à placa aterosclerótica. No entanto, os leucócitos foram comparados em relação à densidade do TAP através de estudos de imagem⁶³, o que é uma avaliação indireta comparado aos métodos que visualizam as células ou citocinas secretadas diretamente no tecido através de anticorpos. Além disso, Verhagen et al.⁶⁶ definiram como locais proximais e distais em relação à origem da artéria coronária e delimitação ao longo do trajeto da artéria coronária, ao invés de ser localmente à presença e ausência de placas ateroscleróticas. Placas ateroscleróticas distais ocorrem e estão associadas quando há múltiplas placas ateroscleróticas proximais e mediais, e são associadas também com altas pontuações no escore de cálcio, sendo que são raras em pacientes uniarteriais ou quando não há lesões proximais⁷³. Embora Távora et al.⁶⁹ tenham realizado esta comparação, os autores não consideraram a presença da medida de diferentes lesões no mesmo indivíduo. Kralova et al.⁷⁰ realizaram esta comparação, mas os tecidos foram obtidos após transplante cirúrgico e, como os demais estudos aqui citados, só investigaram em relação aos macrófagos (CD68).

INTRODUÇÃO

Somente os estudos de Konishi et al.⁶³, Verhagen et al.⁶⁶ e Grosso et al.⁶⁷ apresentaram critérios de exclusão com características que poderiam causar viés nos resultados. Em relação ao tamanho de amostra, a maior parte dos estudos apresentou um tamanho reduzido, com exceção dos estudos de Hirata et al.⁶⁵ e Kralova et al.⁷⁰. Nos estudos de Konishi et al.⁶³, Mazurek et al.⁶² e Távora et al.⁶⁹, a investigação das células inflamatórias foi realizada em apenas uma parte da amostra total. Em relação à análise dos dados, quase todos realizaram apenas a análise univariada, e somente o estudo de Verhagen et al.⁶⁶ realizou análise de regressão linear e logística mas com correções somente para os locais e as co-variáveis de interesse (composição de placa e localização – proximal ou distal). Nenhum estudo corrigiu as análises para os fatores de confusão associados à aterosclerose e inflamação no tecido adiposo. Além disso, os estudos que tentaram investigar se a inflamação está associada localmente com a placa aterosclerótica^{63,66,69,70} não consideraram que estas medidas são dependentes, pois são medidas repetidas no mesmo indivíduo.

Os estudos de Verhagen et al.⁶⁶ e Távora et al.⁶⁹ tiveram acesso às lesões instáveis por se tratar de material de autópsia. No entanto, no primeiro estudo as características de placa não consideraram sinais de instabilidade e a inflamação no TAP não foi associado como um grupo separado⁶⁶. No segundo estudo, embora o autor tivesse tido um amplo acesso às lesões instáveis, compondo a maior parte de sua amostra, somente as lesões estáveis foram selecionadas em uma subamostra para investigar a inflamação no tecido adiposo peri-adventicial com as características de placa aterosclerótica⁶⁹.

Além disso, os linfócitos T não foram investigados em estudos de autópsia e os linfócitos B não foram investigados até o presente momento no TAP associado com aterosclerose. O único estudo que detectou, avaliou os efeitos de terapia medicamentosa sobre as células inflamatórias no TAE⁶⁷. Finalmente, estudos que investiguem o comportamento da inflamação no TAP associado de modo independente com a doença arterial coronariana instável são necessários.

OBJETIVO

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a associação entre inflamação no tecido adiposo epicárdico perivascular e aterosclerose em artérias coronárias em um estudo clinicopatológico.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a correlação da inflamação do tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca com a porcentagem de obstrução das artérias coronárias e presença de placas ateroscleróticas estáveis e instáveis nas artérias coronárias.
- Comparar a inflamação no tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca (TAPp) com os demais tecidos adiposos controles (tecido adiposo epicárdico perivascular com ausência de aterosclerose [TAPaa], tecido adiposo abdominal subcutâneo [TAS] e perirrenal [TAPr]), de acordo com a porcentagem de obstrução e presença de placas ateroscleróticas estáveis e instáveis nas artérias coronárias.

MÉTODO

3 MÉTODO

3.1 Local de coleta de dados

O presente estudo foi desenvolvido nos laboratórios de Patologia Cardiovascular (Laboratório de Investigação Médica – LIM22) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e também no Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LFE–FMUSP). O LFE–FMUSP tem como objetivo o melhor entendimento dos processos relacionados à senescência e à senilidade. O LFE–FMUSP apresenta uma estrutura organizacional bem definida de coleta de dados, processamento, avaliação clínica e anatomopatológica. A coleta de dados é realizada no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP)^{74,75}. Este serviço realiza em média mais de 13.000 autópsias anualmente e tem como objetivo esclarecer a causa *mortis* em casos de óbito por moléstia mal definida ou sem assistência médica ocorridos no município de São Paulo⁷⁶.

O LFE–FMUSP criou uma estrutura organizacional de coleta de dados composta por enfermeiros, que abordam e convidam os familiares a participarem do estudo. Esta abordagem do familiar é realizada durante o período de 4 a 6 horas em que os familiares esperam no próprio local a liberação do corpo. São explicados objetivo e método do estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é aplicado. Após a aceitação e assinatura do TCLE é aplicada uma entrevista clínica semiestruturada, que dura em média 30 minutos. Este processo é realizado em uma sala privativa no próprio SVOC-USP. Além disso, a equipe de coleta faz captação do material biológico e os dados antropométricos na sala de autópsia^{74,75}.

O presente estudo utilizou a experiência e a estrutura do LFE-FMUSP para a coleta dos dados no período de 2013 a 2015. No período matutino a coleta de dados foi realizada pelas equipes citadas anteriormente e no período vespertino foi realizada pela aluna com o auxílio da equipe do Laboratório de Patologia Cardiovascular. Esta pesquisa é um projeto associado ao estudo de

MÉTODO

doutorado intitulado “Associação entre adiposidade e aterosclerose sistêmica”, sendo a pesquisadora executante Aline Nishizawa e o pesquisador responsável Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, com aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (412/11).

Este estudo foi aprovado como projeto independente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo 439/12 (ANEXO I), mas com vinculação ao projeto citado anteriormente, do qual foi autorizado a utilização do mesmo TCLE (ANEXO II). O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através do auxílio regular à pesquisa 2013/00335-2, aprovado em abril de 2013 (ANEXO III). Além disso, a aluna teve bolsa de mestrado concedida pela FAPESP (ANEXO IV).

3.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional de corte transversal.

3.3 Casuística

3.3.1 Critérios de Inclusão

- Ter idade igual ou acima de 30 anos na data do óbito;
- Ter autorização através do TCLE assinado pelo responsável legal;
- Intervalo *post mortem* inferior a 24 horas (contabilizados até o término do processamento das amostras);
- Coração e tecidos adiposos cedidos pelo médico assistente plantonista do SVOC-USP;
- Informantes com convívio diário ou semanal.

3.3.2 Critérios de Exclusão

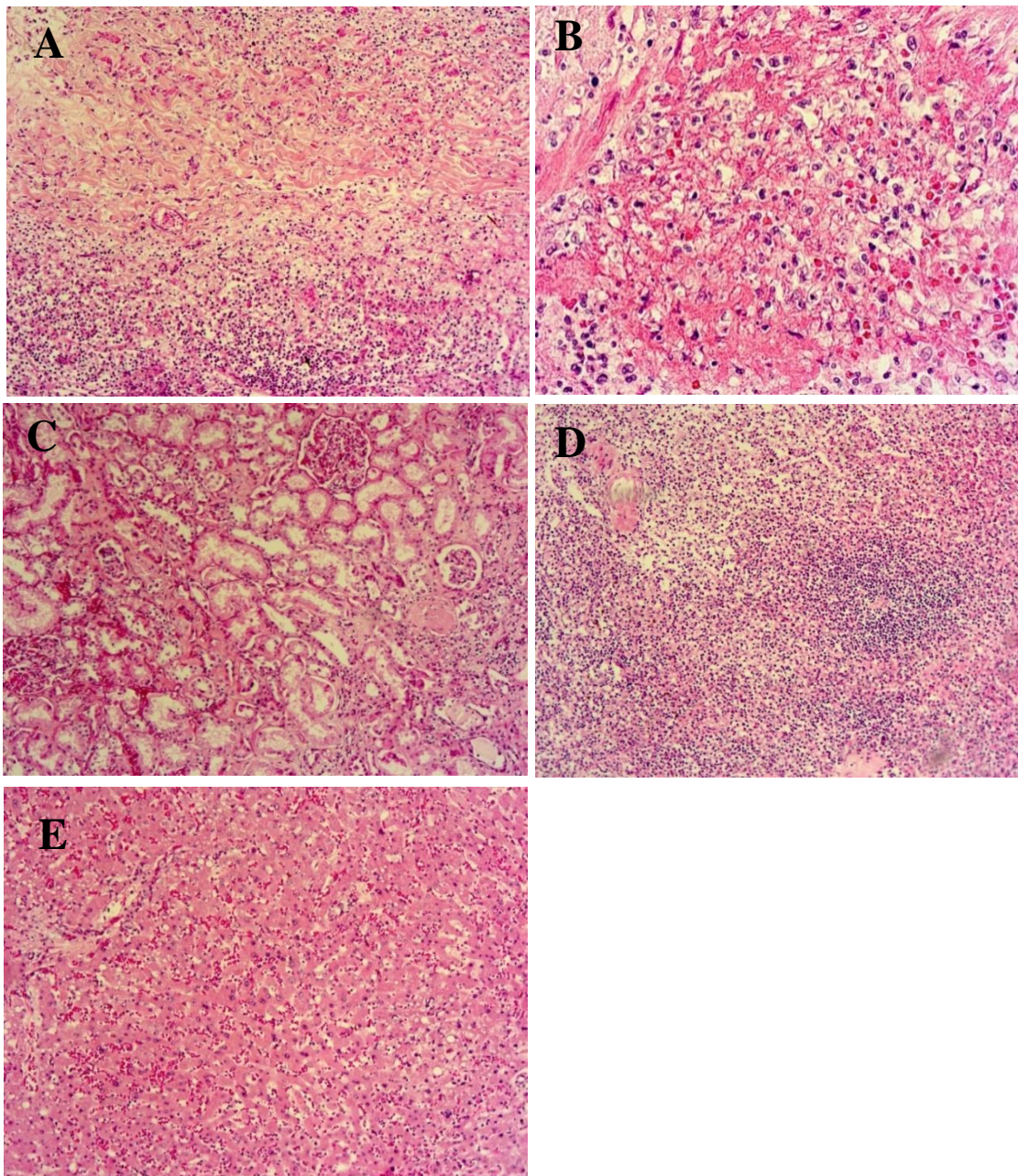
- Informante que não forneça dados consistentes, por motivos cognitivos, emocionais, ou por convívio com frequência superior ao semanal;

MÉTODO

- Tempo de fixação para amostras de tecido adiposo em um intervalo maior do que 72 horas;
- Presença das seguintes afecções durante a coleta de dados na entrevista clínica semiestruturada, exame de autópsia, durante o processamento ou na avaliação anatomopatológica:
 - *Stent* coronariano;
 - Sepses;
 - Uso de corticosteroides ou imunossupressores de uso atual ou contínuo;
 - Histórico de doença autoimune;
 - Histórico de pericardite crônica ou aguda;
 - Derrame pericárdico;
 - História atual de miocardite e/ou endocardite;
 - Doença de Chagas;
 - Hemopericárdio ou tamponamento cardíaco;
 - Transplante cardíaco;
 - Cirurgia cardíaca prévia;
 - Seguintos (apenas fragmentos) da artéria coronária que apresentaram ponte miocárdica, por ausência de amostra de tecido adiposo perivascular para correspondente avaliação.

3.3.2.1 Identificação de sinais de sepse *post mortem*

O diagnóstico de sepse é clínico, mas há evidências de estudos em patologia que examinaram as características dos principais órgãos em resposta à sepse⁷⁷. Quando há presença de pelo menos duas características é determinado o diagnóstico de sepse⁷⁸. Durante o exame de autópsia os técnicos de autópsia do SVOC amostram fragmentos dos principais órgãos, que são encaminhados para confecção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina para a determinação do diagnóstico da causa da morte. Para este estudo, foi feito a requisição destas lâminas no Laboratório de Histotécnica da FMUSP, para verificação de presença de alterações indicativas de sepse para cada caso⁷⁷. Os participantes que obtiveram dois ou mais critérios associados à sepse com um foco de infecção foram excluídos do estudo (exemplos na Figura 10). Esta avaliação foi realizada em conjunto com o patologista Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva.

MÉTOD

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10. Fragmentos de pulmão, rim, baço e fígado responsivos à sepse. A: pulmão, com aumento de 10x, com infiltração de neutrófilos associado à pleurite, devido à broncopneumonia. B: pulmão, com aumento de 40X, evidenciando infiltrado de neutrófilos. C: rim, com aumento de 10x, com necrose tubular aguda, responsivo à choque; D: baço, com aumento de 10x, com esplenite aguda; E: fígado, com aumento de 10x, responsivo à broncopneumonia, com congestão e esteatose hepática.

MÉTODO

3.3.3 Obtenção dos casos

A equipe de entrevista clínica, da qual a aluna fez parte, realizou a seleção, recepção dos casos e aplicação dos critérios de seleção iniciais: familiares de primeiro grau e responsáveis legais que possuíam convívio no mínimo semanal com o falecido, e o intervalo *post mortem* menor do que 24 horas. Posteriormente, o familiar foi convidado para um local privativo e silencioso, onde o TCLE foi explicado, e após o consentimento dos familiares ou responsável legal foi assinado. A entrevista clínica sobre o histórico de saúde do falecido foi realizada (ANEXO V). As variáveis de interesse obtidas através da entrevista clínica para este estudo incluem:

- Dados sociodemográficos: idade, sexo, cor, escolaridade, e frequência de convívio com o falecido.
- Antecedentes pessoais e fatores de risco cardiovascular: diagnóstico prévio de hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus, diagnóstico prévio de DAC, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), dislipidemia (DLP), AVC, sedentarismo, tabagismo, etilismo, histórico de cirurgia cardíaca prévia, angioplastia, doença de Chagas, e doença autoimune para verificar se havia critérios de exclusão.
- Uso de medicamentos (atual e contínuo) como corticosteroides e imunossupressores.

Concomitante a este processo, o corpo foi encaminhado à sala de autópsia e a equipe de coleta realizaram a captação do coração, amostras do tecido adiposo perirrenal e abdominal subcutâneo, após a assinatura do TCLE e do consentimento do médico patologista do SVOC. Além disso, o peso do indivíduo foi mensurado em quilogramas (kg) com o cadáver totalmente despido, em posição supina, utilizando uma balança com uma rampa de acesso (Filizola®), para peso mínimo de 4 kg e máximo de 600 kg, previamente tarada para a maca (descontado 32 kg da maca). A altura foi mensurada em centímetros (cm), na posição supina, utilizando o estadiômetro com variação de 1 milímetro (mm), para altura mínima de 116 cm e máxima de 211 cm.

MÉTODO

3.4 Padronização da técnica

3.4.1 Artérias coronárias

O coração e as amostras de tecido adiposo foram coletados e levados para o Laboratório de Patologia Cardiovascular para serem processados. O coração e as gorduras foram lavados em água corrente para a retirada do excesso de sangue e de coágulos. Os tecidos adiposos perirrenal e subcutâneo foram armazenados em cassetes e devidamente identificados.

A técnica de dissecação, processamento das artérias coronárias e fixação foram padronizados. Inicialmente, a fixação do coração foi testada com álcool a 70% por imersão por pelo menos 24 horas. Esta técnica apresentou a vantagem de facilitar a dissecação da gordura epicárdica e flexibilização do horário do processamento. No entanto, esta técnica apresentou algumas dificuldades específicas para este estudo, tanto para as artérias coronárias, quanto para tecido adiposo epicárdico perivascular. Em relação às artérias coronárias, foi observado colapso da parede arterial. Isto foi notado principalmente nas artérias que apresentavam ausência de aterosclerose ou estavam em estágio inicial. Devido à fixação por imersão, o colapso ocorreu pela pressão que o tecido adiposo e o miocárdio exerceram sobre a parede do vaso. Tentativas para abrir a artéria coronária não foram eficazes, pois ela já havia sido fixada colapsada pelo álcool. Além disso, o ágar injetado após a dissecação das artérias coronárias não permanecia dentro da artéria, devido à criação de novos orifícios durante processamento, que permitia o extravasamento do ágar (Figura 11).

MÉTODO

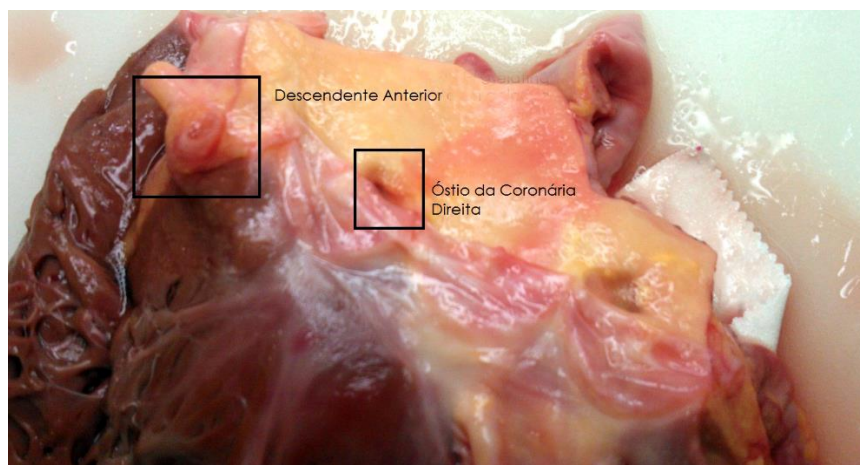


Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 11. Artéria coronária circunflexa após fixação por imersão em álcool 70%. A: Imagem macroscópica (aumento de 3x) da artéria coronária circunflexa com grau de obstrução menor do que 30% com colabamento importante. B: Imagem do corte histológico (aumento de 3x) do mesmo fragmento corado para Verhoeff.

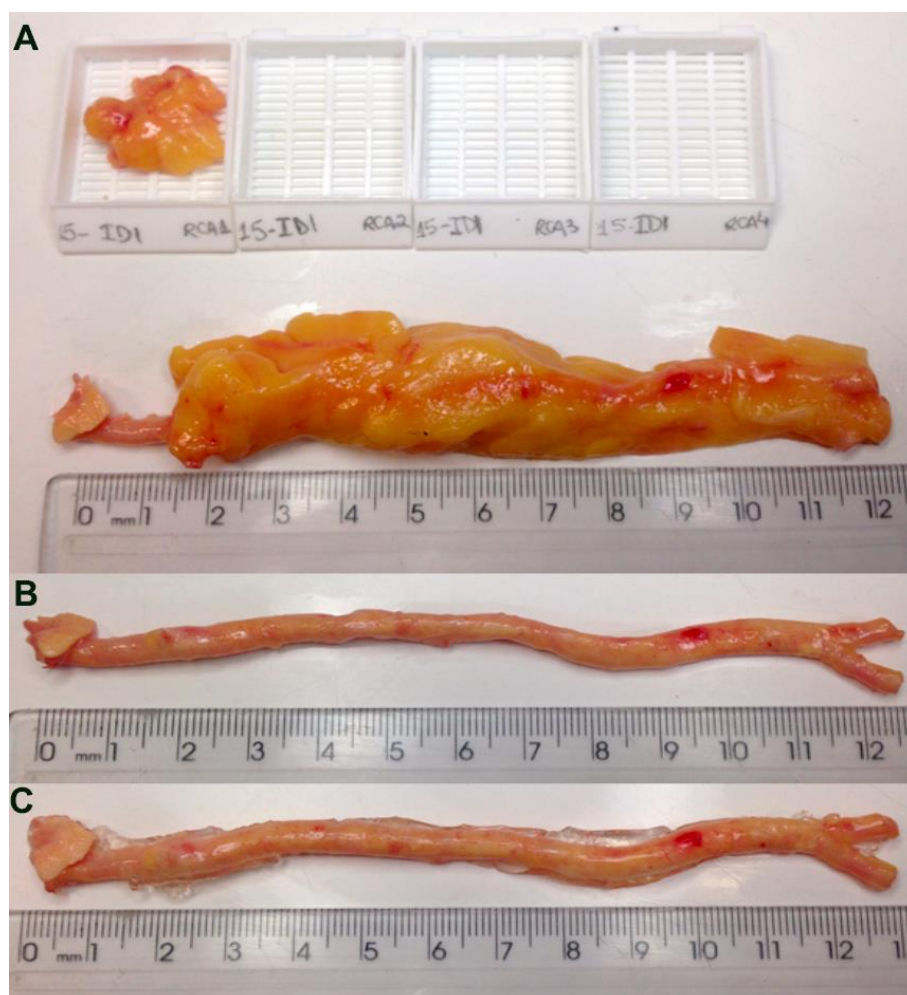
O colabamento arterial afeta a medida da porcentagem de obstrução, visto que este cálculo não é fidedigno nesta situação. Dessa forma, o protocolo de fixação foi alterado para dissecação do coração a fresco após a coleta. Para tanto (1) coração foi colocado em um freezer a -20°C para ser resfriado por dois minutos; (2) foi injetado ágar nas artérias coronárias através do óstio da coronária direita, no tronco da coronária esquerda e da artéria coronária circunflexa (Figura 12); (3) o coração foi resfriado novamente por 1 minuto para que o ágar se solidificasse; (4) as artérias coronárias foram dissecadas com 1cm de gordura epicárdica perivascular adjacente ao redor das artérias coronárias: direita (CD), tronco da coronária esquerda (TCE), artéria coronária descendente anterior (DA) e artéria coronária circunflexa (CX) através do óstio na aorta ascendente; (5) o tecido adiposo epicárdico perivascular foi removido sistematicamente a cada 1,5 cm a partir do óstio, devidamente identificado em cassete mantendo a ordem crescente de retirada para correspondência do fragmento das artérias posteriormente; (6) foi injetado ágar repetidas vezes nas artérias coronárias até que a artéria se abrisse completamente de modo uniforme, sob uma plataforma de gelo reutilizável (Figura 13).

MÉTODO



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 12. Ostio da artéria coronária direita e descendente anterior com a primeira injeção de ágar.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 13. Procedimento de remoção do tecido adiposo epicárdico perivascular e abertura das artérias coronárias. A: Remoção sistemática do tecido adiposo perivascular sistematicamente a cada 1,5 cm a partir do ostio; B: artérias coronárias após a dissecação com a injeção de ágar somente do início o

MÉTODO

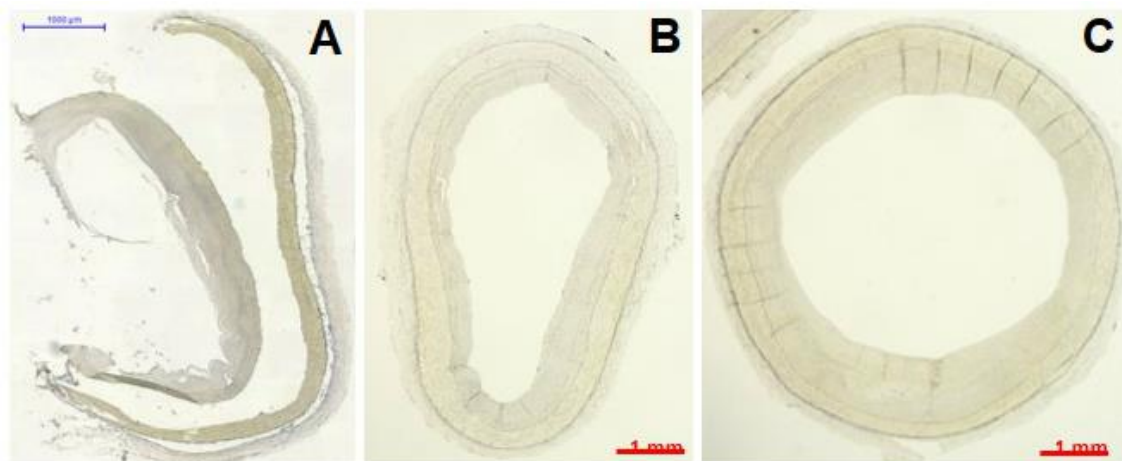
procedimento, enquanto estavam no coração; C: resultado das repetidas injeções de ágar com abertura eficaz.

Nota-se que a primeira injeção de ágar não foi completamente eficaz (Figura 13B). No entanto, foi essencial, pois o ágar solidificado fornece uma estrutura de sustentação para que as injeções repetidas de ágar não extravasassem através dos novos orifícios criados. A injeção de ágar somente após a remoção das artérias coronárias não foi eficaz, pois o ágar ficava em estado líquido e extravasava pelos orifícios.

Após este procedimento, as artérias coronárias foram identificadas e fixadas para a avaliação macroscópica. Dois agentes fixadores foram testados neste estudo para a fixação das artérias coronárias: (1) formol tamponado e diluído a 10% e (2) formol tamponado e diluído a 4%. O último foi obtido através do paraformaldeído, que foi tamponado com monobásico de sódio e bibásico de sódio, até atingir pH entre 7,2 e 7,4. Para as comparações dos fixadores, foram utilizados quatro fragmentos da mesma artéria coronária. O ágar foi injetado em dois fragmentos, e os outros dois foram fixados sem ágar, para verificar a agressão direta no tecido pelo formol, pois as amostras iriam ser encaminhadas ao laboratório de histotécnica sem ágar.

O primeiro a ser testado foi o formol diluído a 10%. Este mostrou-se muito agressivo e fez com que a camada íntima, e em algumas vezes até a média e adventícia, da coronária fossem danificadas (Figura 14A) e a ausência de ágar deixou a artéria coronária colabada (Figura 14B). Os resultados evidenciaram que o ágar ajuda a proteger a camada íntima da artéria coronária dos efeitos nocivos do fixador (Figura 14C). Além disso, o fixador que agrediu menos o tecido foi o formol a 4%, e por isso foi escolhido para ser utilizado neste estudo. O protocolo do tempo de fixação das artérias coronárias foi o preconizado pelo Laboratório de Histotécnica da FMUSP, que recomenda a fixação por 3 a 7 dias.

MÉTODOS



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14. Padronização da fixação das artérias coronárias. A: artéria coronária fixada sem ágar com formol diluído a 10%; B: artéria coronária fixada sem ágar com formol tamponado diluído a 4%; C: artéria coronária fixada com ágar com formol tamponado diluído a 4%.

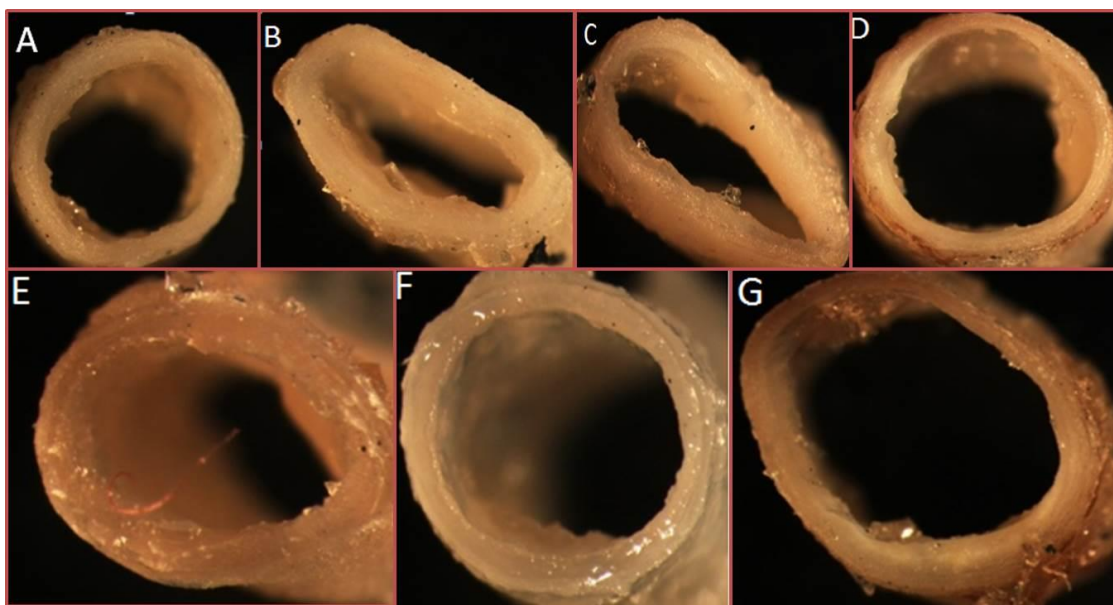
3.4.1.1 Avaliação das artérias coronárias

Após a fixação, as artérias coronárias foram cortadas transversalmente em fragmentos de 1,5 cm desde o óstio até a extremidade, do mesmo modo em que o tecido adiposo epicárdico perivascular foi retirado, e então cada fragmento foi cortado transversalmente em intervalos regulares de 5mm para avaliação macroscópica em cada secção. A avaliação foi feita sistematicamente em todas as artérias coronárias, com registro da estimativa da porcentagem de obstrução arterial e características macroscópicas da placa para cada fragmento. Durante a avaliação o fragmento com maior obstrução da luz do vaso ou com sinal de instabilidade da placa aterosclerótica (presença de ulcerações, hemorragia de placa ou trombos) foram amostrados para posterior análise histológica de acordo com a classificação da *American Heart Association (AHA)*^{21,28,30}. Além disso, foi amostrado também fragmento com ausência macroscópica de aterosclerose ou lesão inicial de cada artéria, distal à placa de ateroma amostrada inicialmente, que foi utilizado como controle intracardíaco.

Durante a avaliação foi registrado o número de placas ateroscleróticas ao longo de toda a artéria, como uma medida da extensão do comprometimento da

MÉTODO

doença. Estes procedimentos foram feitos com auxílio de uma lupa (Emporionet® LP 500, Brasil) com grande luminosidade. O ágar foi retirado de todas as secções amostradas e as artérias coronárias foram fotografadas com o auxílio de um estereomicroscópio (Nikon® SMZ 1000, Tóquio, Japão) para análise macroscópica (Figura 15).



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 15. Secções de artérias coronárias fixadas e fotografadas através do estereomicroscópio sob aumento de 1,5x. A: seguimento proximal da artéria coronária direita; B: seguimento distal da artéria coronária direita; C: tronco da artéria coronária esquerda; D: seguimento proximal da artéria coronária descendente anterior; E: seguimento distal da artéria coronária descendente anterior; F: seguimento proximal da artéria coronária circunflexa; G: seguimento distal da artéria coronária circunflexa.

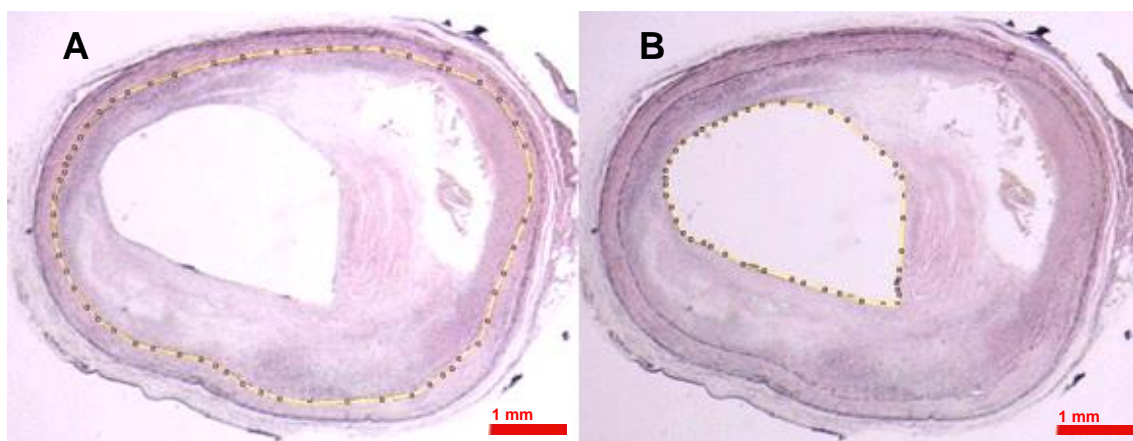
As amostras foram enviadas ao laboratório de Histotécnica da FMUSP. Os fragmentos das artérias amostradas passaram pelo processo de desidratação, diafanização e depois foram emblocadas em parafina. Com auxílio de um micrótomo, foram realizados cortes com 4µm de espessura para a confecção das lâminas. Cada fragmento foi corado com hematoxilina-eosina e Verhoeff. As lâminas confeccionadas foram fotografadas com auxílio de um estereomicroscópio (Nikon®, SMZ 1000, Tóquio, Japão) para a medida morfométrica da porcentagem de obstrução.

MÉTODO

3.4.1.2 Avaliação da porcentagem de obstrução

Para a avaliação do grau de obstrução arterial foi utilizado a lâmina corada com a coloração de Verhoeff, devido à fácil visualização da lâmina limitante elástica interna (LLEI). Foram medidas as áreas delimitadas pela LLEI e pelo lúmen com auxílio de um software de imagem (ImageJ®)⁷⁹ (Figura 16). A porcentagem de obstrução arterial foi calculada de acordo com a seguinte fórmula de acordo com estudos prévios⁸⁰:

$$\text{Porcentagem de Obstrução Arterial} = \frac{(\text{Área interna à LLEI} - \text{Área do lúmen}) \times 100}{\text{Área interna à LLEI}}$$



Fonte: Arquivo pessoal.

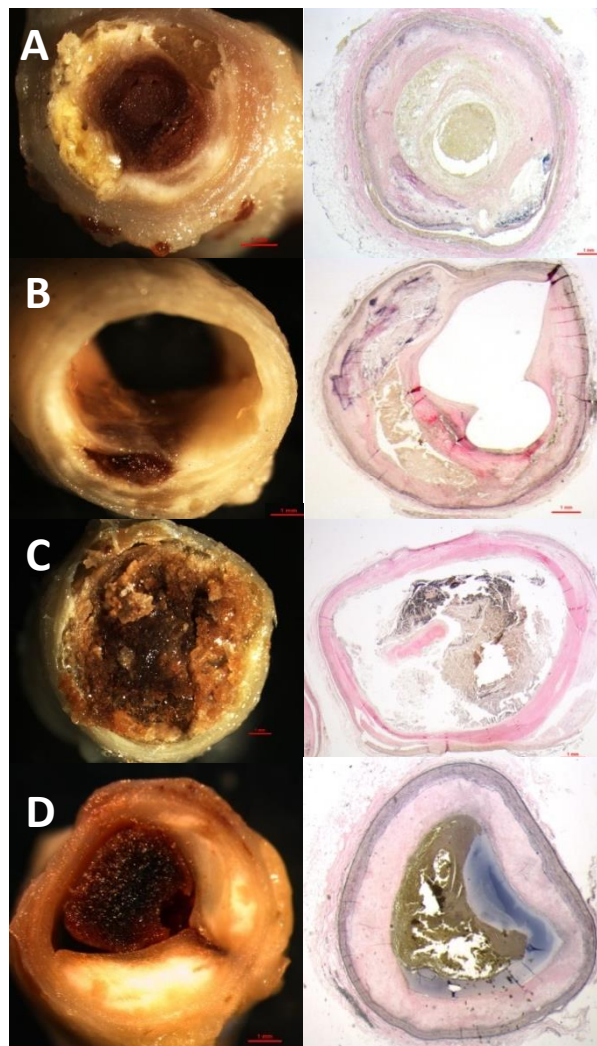
Figura 16. Artéria coronária corada com Verhoeff para a mensuração da porcentagem de obstrução através da medida morfométrica da área delimitada pela LLEI e da área do lúmen. A: linha amarela contorna e delimita a área interna da LLEI; B: linha amarela contorna e delimita a área do lúmen. Legenda: LLEI – Lâmina Limitante Elástica Interna.

3.4.1.3 Classificação da placa aterosclerótica pelos critérios da *American Heart Association*

A avaliação para a classificação do tipo da placa de aterosclerose foi realizada com o objetivo de determinar se a placa aterosclerótica era estável ou instável, de acordo com estudos prévios^{21,28,30}. As placas ateroscleróticas com

MÉTODO

fissuras, ulcerações, conteúdo hemorrágico e trombose (classificação VI) foram consideradas instáveis^{28,30} (Figura 17).

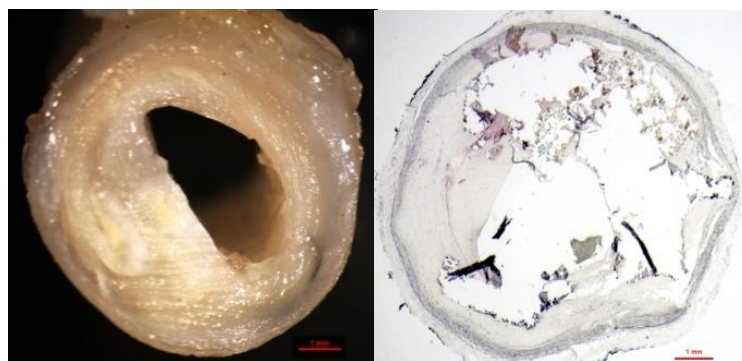


Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 17. Placas ateroscleróticas instáveis: macroscópica e microscópica. A: presença de trombose coronariana oclusiva que desencadeou óbito; B: presença de hemorragia na placa aterosclerótica; C: trombose coronariana oclusiva com presença de ulcerações, que desencadeou óbito; D: Ruptura da placa aterosclerótica, a seta indica o local de ruptura da placa, com trombo superposto.

As demais placas foram consideradas estáveis (Figura 18), de acordo com a AHA^{28,30}.

MÉTODO



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 18. Placa estável com a classificação VII da AHA

3.4.1.4 Classificação dos grupos

Cada participante foi alocado em dois grupos de acordo com o comprometimento aterosclerótico mais relevante clinicamente de cada uma das artérias coronárias: placas ateroscleróticas estáveis e instáveis. A classificação dos grupos foi realizada utilizando os dados da classificação da placa de ateroma de acordo com a classificação da AHA^{21,28,30}:

- Grupo com placas ateroscleróticas estáveis: classificação AHA diferente de VI, independentemente da porcentagem de obstrução.
- Grupo com placas ateroscleróticas instáveis: presença de pelo menos uma placa com a classificação VI (nível da placa instável)^{21,28,30}, independentemente da porcentagem de obstrução.

3.4.2 Tecido Adiposo

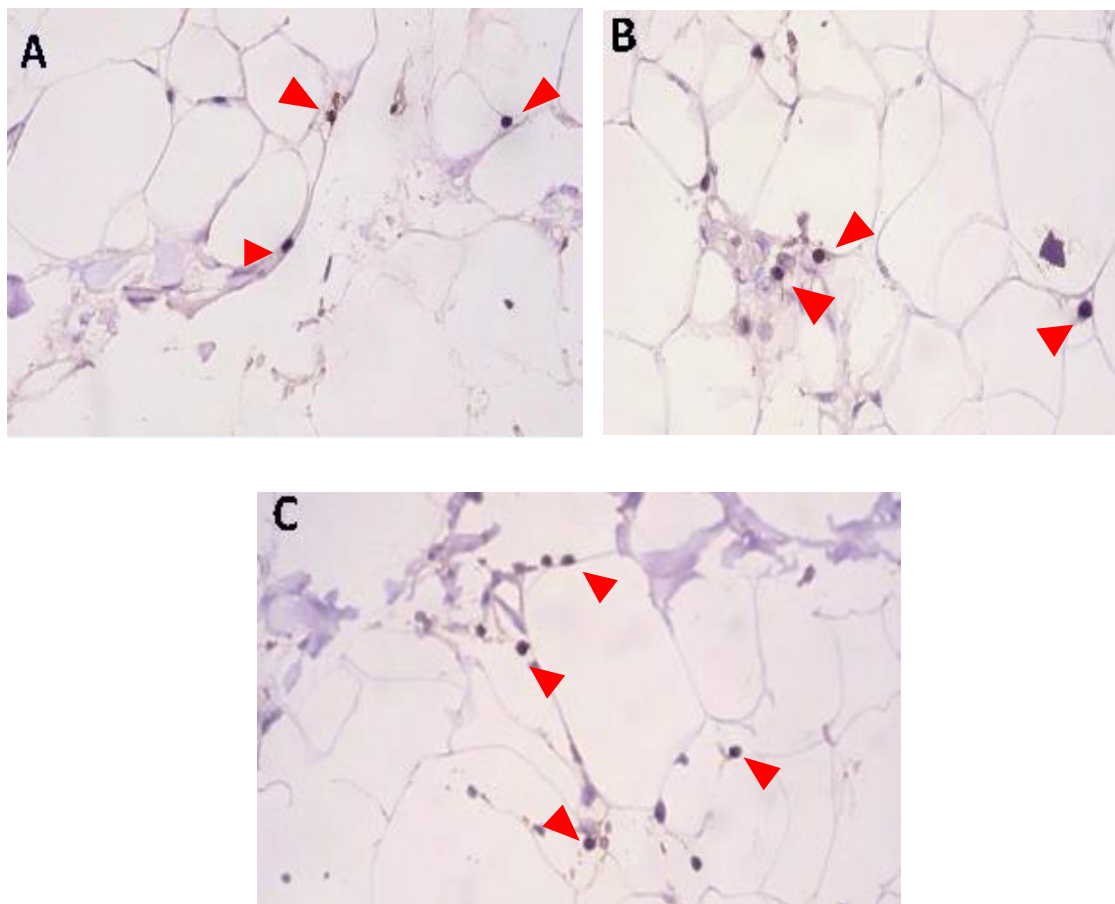
3.4.2.1 Padronização do método de imunohistoquímica (IHQ) e dos anticorpos no tecido adiposo

Também foi padronizado para este estudo o método da técnica de fixação para posterior realização da técnica de IHQ. O formol diluído a 4% e tamponado foi testado nos tecidos adiposos, uma vez que este foi o fixador que menos agrediu o tecido das artérias coronárias. O teste foi realizado somente com este fixador com o objetivo principal de determinar o tempo ideal de fixação. Se o

MÉTODO

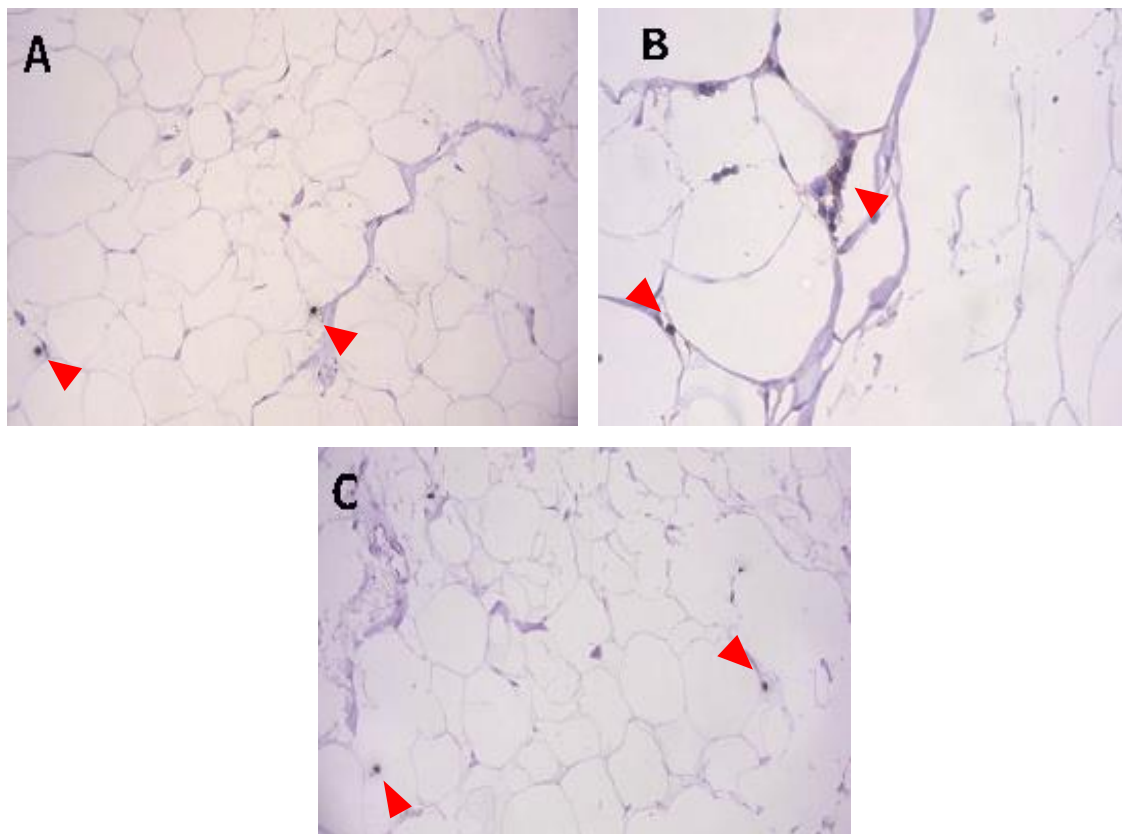
tempo de fixação fosse muito curto, limitaria a possibilidade de dias de coleta. Por outro lado, o tempo de fixação longo poderia levar à formação de ligações cruzadas entre epítomos, levando à perda de antigenicidade e com isso dificultar a ligação do anticorpo com o antígeno. Quando isto acontece é necessária a utilização de métodos para a recuperação antigênica. Além disso, há formação de proteínas não relacionadas, causadas pela oxidação do formol, que forma o ácido fórmico. O ácido fórmico se precipita no tecido sob a forma de coloração acastanhada, formando artefatos^{81,82}, que poderia gerar viés na quantificação das células inflamatórias.

O objetivo da padronização foi testar se havia perda de antigenicidade com diferentes tempos de fixação: 24, 48 e 72 horas. Os anticorpos primários usados foram: CD68 (Dako®) padronizado com titulação 1:5000 μ L (para marcação de macrófagos), CD20 (Dako®) com titulação 1:12000 μ L e CD3 (Dako®) com titulação 1:1500 μ L, para marcação de células B e T, respectivamente. Todos os anticorpos foram testados em um controle positivo (linfonodo para os linfócitos, e tecido pulmonar para os macrófagos). Nas amostras de tecido adiposo houve marcação positiva tanto para linfócitos, quanto para macrófagos (Figuras 19 a 21).

MÉTODO

Fonte: Arquivo pessoal.

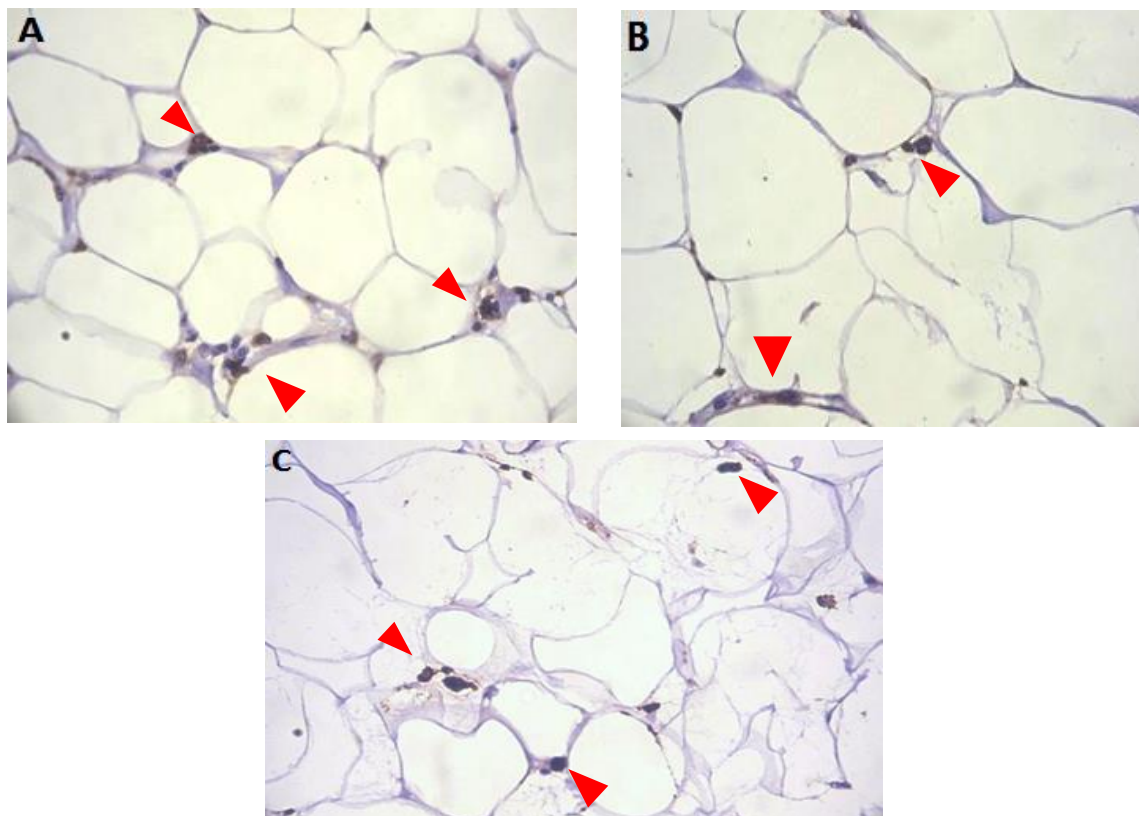
Figura 19. Linfócitos T identificados com o anticorpo primário CD3, através da técnica de imunohistoquímica no TAP, fotografados em microscópio com aumento de 20x. A: TAP fixado em formol a 4% tamponado por 24 horas. B: TAP fixado por 48 horas. C: TAP fixado por 72 horas. Nota-se que não houve diferença entre as marcações nos diversos tempos de fixação. Setas vermelhas indicam os linfócitos T corados. Legenda: TAP: tecido adiposo epicárdico perivascular.

MÉTODO

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 20. Linfócitos B corados com o anticorpo primário CD20, através da técnica de imunoistoquímica no TAP, fotografados em microscópio com aumento de 20x. A: TAP fixado em formol a 4% tamponado por 24 horas. B: TAP fixado por 48 horas. C: TAP fixado por 72 horas. Nota-se que não houve diferença entre as marcações nos diversos tempos de fixação. Setas vermelhas indicam os linfócitos B corados. Legenda: TAP: tecido adiposo epicárdico perivascular.

MÉTODO



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 21. Macrófagos identificados com o anticorpo primário CD68, através da técnica de imunohistoquímica, no TAP, fotografados em microscópio com aumento de 20x. A: TAE fixado em formol a 4% tamponado por 24 horas. B: TAP fixado por 48 horas. C: TAP fixado por 72 horas. Setas vermelhas indicam macrófagos corados. Legenda: TAP: tecido adiposo epicárdico perivascular.

As figuras 19 a 21 ilustram que não houve diferença na marcação das células inflamatórias (variabilidade de coloração, fundo e número de células coradas) em relação ao tempo de fixação para as amostras dos tecidos adiposos. Portanto, o tempo de fixação padronizado foi de 24 horas, com possibilidade de extensão de no máximo 72h, com a finalidade de otimizar ao máximo o período de coleta. Para evitar reação cruzada não foi realizado coleta dos casos em que previamente era sabido que o tempo de fixação seria maior do que 72 horas. Contudo, todas as amostras de tecido adiposo epicárdico perivascular retirado sistematicamente, além do tecido adiposo subcutâneo e perirrenal, foram fixadas de acordo com a padronização, e posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Histotécnica da FMUSP.

MÉTODO

3.4.2.2 Tecido adiposo visceral perirrenal e subcutâneo

A amostra do tecido adiposo visceral perirrenal (TAPr) foi retirada de forma aleatória do rim. O tecido adiposo subcutâneo (TAS) foi retirado na região abdominal, ao redor da região da cicatriz umbilical. A forma de fixação e análise foram idênticas às realizadas do TAP. A análise deste tecido visa comparar se havia diferenças no acometimento inflamatório em outros tecidos adiposos além do tecido adiposo cardíaco.

3.4.2.3 Procedimento de histologia e imunoistoquímica dos tecidos adiposos: perivascular, perirrenal e subcutâneo

Todos os fragmentos de tecidos adiposos (TAPp, TAPaa, TAS e TAPr) foram submetidos ao mesmo procedimento histológico para serem emblocados em parafina, da mesma forma que foi preconizado pelas artérias coronárias, dentro do intervalo estipulado de fixação. Posteriormente, todos os fragmentos ficaram armazenados em parafina, até a avaliação microscópica das artérias coronárias serem concluídas. Com os fragmentos arteriais separados, os blocos que fazem correspondência com o local adjacente à secção da artéria coronária amostrada foram selecionados e encaminhados para a continuidade do procedimento histológico. As amostras emblocadas em parafina foram cortadas em uma espessura de 4µm e foram colocados em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano; Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA) em um suporte adequado.

A técnica de IHQ, realizada no Laboratório de Imunoistoquímica da FMUSP, se constituiu primeiramente no processo de desparafinização: as lâminas foram colocadas em em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 5 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um banho de álcool 70°. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato pH 7,4. O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizada por alta temperatura em

MÉTODO

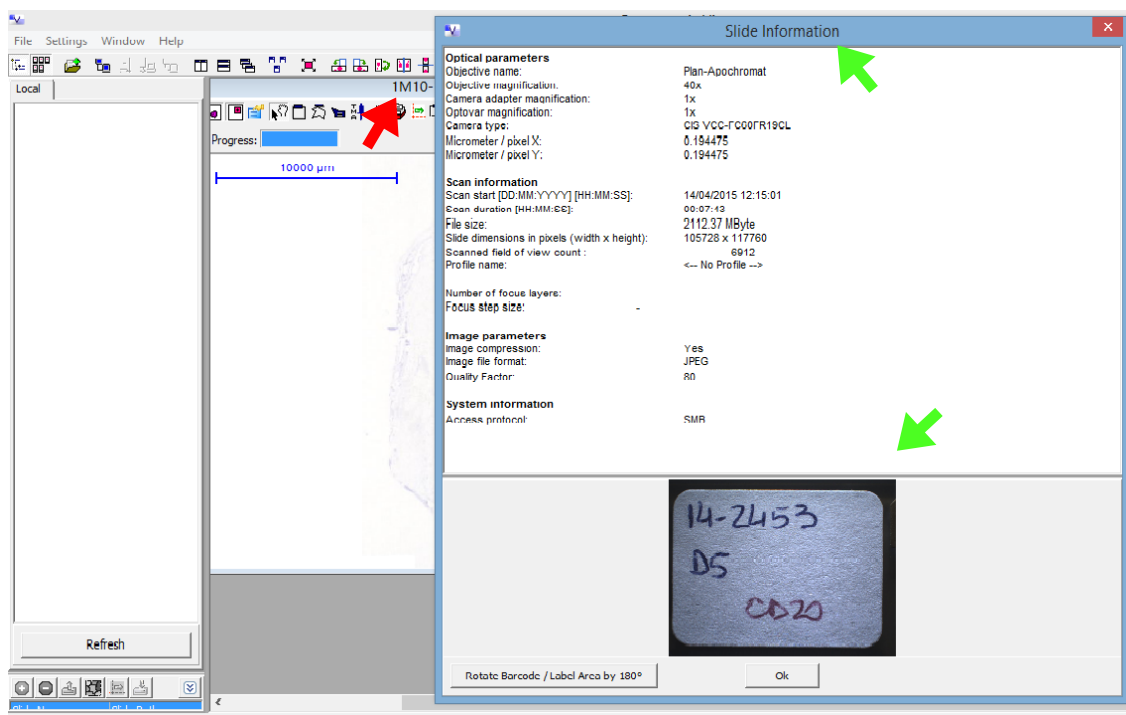
solução de ácido cítrico 10 mM pH6 em panela de pressão. O bloqueio da peroxidase endógeno presente nas hemácias foi feito com água oxigenada 10 volumes (3%). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em 1% de albumina de soro bovino por 24 horas à 4°C e posteriormente incubados com o anticorpo secundário EASYLINK ONE-Polímero HRP (EASYPATH- SP-BRASIL) e utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). Posteriormente ocorreu a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) para todos os casos.

3.4.2.4 Análise das lâminas

Após a marcação das células inflamatórias pela técnica de IHQ, as lâminas, foram digitalizadas através de um escâner de lâminas (Pannoramic Scam 250 Flash III, 3DHISTECH®, Hungria) e analisadas através de um software de imagem específico (Pannoramic Viewer, 3DHISTECH®, Hungria).

Este processo de digitalização das lâminas permitiu uma melhor qualidade da imagem a ser analisada. Além disso, os arquivos gerados não mostram o número de identificação do indivíduo, pois são gerados códigos de forma automática. Para visualizar a identificação do indivíduo na lâmina, é necessário entrar nas propriedades do arquivo para ter acesso à imagem da etiqueta da lâmina (Figura 22). O setor responsável pelo escaneamento gerou arquivos separados por anticorpo. Dessa forma, a aluna ficou cega para identificação do tecido adiposo a ser quantificado e para o número de identificação do participante, pois não era necessário consultar a etiqueta da lâmina no início da quantificação. Além disso, o escaneamento permitiu que os campos escolhidos não fossem sobrepostos, desse modo não era possível a mesma célula ser contada mais de uma vez.

MÉTODO

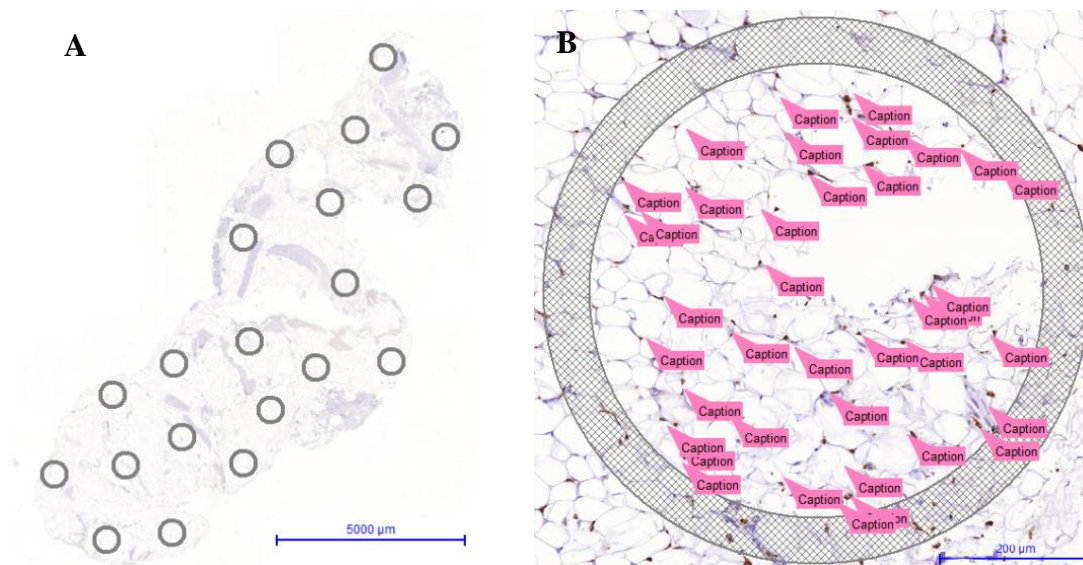


Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 22. Captura de tela do software Pannoramic Viewer utilizado para quantificar as células inflamatórias. Seta vermelha indica o comando que oculta a identificação do caso. Setas verdes indicam que o programa deixa a etiqueta visível somente na sessão “slide information”.

O software Pannoramic Viewer® funciona como um microscópio virtual. Vinte campos aleatórios com diâmetro de 600 µm foram marcados, de modo que toda a lâmina tivesse a possibilidade de ser avaliada (Figura 23A). O número total de células coradas dentro de cada campo foi quantificado (Figura 23B). Ao final da análise de cada lâmina o número total de células foi computado no banco de dados. Os campos foram determinados em um aumento onde não era possível identificar onde estavam as células coradas, com todo o fragmento enquadrado na tela (Figura 23A), ou seja, a escolha dos campos foi feita de modo sistemático e independente da presença de células, exceto para locais onde haviam grandes aglomerados possíveis de serem visualizados sob aumento menor do que 1x. Nesse caso, a quantificação desses aglomerados foi evitada.

MÉTODO



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 23. Captura de tela ilustra a distribuição dos 20 campos aleatórios e a contagem das células inflamatórias. A: 20 campos com menor aumento (*fit*: que é menor do que 1x), com cegamento para aglomerados celulares; B: Macrófagos identificados em aumento de 10x.

3.5 Análise estatística

3.5.1 Cálculo do tamanho de amostra

Os estudos prévios compararam o número leucócitos em dois grupos: indivíduos com DAC e controles. O cálculo da magnitude de efeito foi baseado em estudos prévios⁶³, que obteve número de leucócitos de $24 \pm 22 \text{ cm}^3$ no grupo controle e $44 \pm 21 \text{ cm}^3$ no grupo com DAC, apresentando magnitude de efeito de 0,93 calculado através do software estatístico G*Power® (Alemanha). O número total de casos necessários para o estudo foi estimado em 26 casos para cada grupo ($n=78$), para α de 5% e poder de 90%.

3.5.2 Análise descritiva

A variável independente foi a aterosclerose avaliada como porcentagem de obstrução e instabilidade da placa de ateroma de acordo com a classificação AHA. Para a análise estatística foram consideradas as medidas morfométricas e a classificação de AHA de cada lesão clinicamente mais relevante em todas as

MÉTODO

artérias coronárias (CD, TCE/DA e CX). A artéria coronária DA foi considerada como uma extensão do TCE, e, portanto, foi considerada como uma só, utilizando a lesão mais importante entre ambas. As respectivas medidas de número de macrófagos, linfócitos B e T na região TAPp (em todas as artérias), TAPaa, TAS e TAPr foram consideradas como variáveis dependentes. Foram considerados os seguintes fatores de confusão: idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, índice de massa corpórea, etilismo e tabagismo.

Para a análise descritiva foram apresentadas as variáveis clínicas e sociodemográficas através de medida de tendência central e dispersão para variáveis contínuas e medidas de frequência absoluta e relativa para variáveis categóricas. Estas variáveis foram comparadas com as variáveis independentes: porcentagem de obstrução através de regressão linear simples com erros padrões robustos, opção cluster e com a presença de estabilidade e instabilidade na placa aterosclerótica através da regressão logística com erros padrões robustos, opção cluster.

As variáveis dependentes foram apresentadas através de média e desvio padrão dos macrófagos, linfócitos T e B e comparadas com teste T, teste T pareado, teste de Mann-Whitney ou teste Wilcoxon de acordo com a distribuição, além das representações gráficas de acordo com a associação com as variáveis independentes.

3.5.3 Análise univariada e multivariada

3.5.3.1 Tecido Adiposo Perivascular Periplaca

A associação do número de macrófagos, linfócitos T e B com a porcentagem de obstrução nas três artérias coronárias de cada indivíduo foi investigada através de modelos lineares generalizados (GLM), com distribuição linear e *link* log, pois a distribuição do número de células não foi normal. Para investigar a associação entre o número de células inflamatórias e os grupos de estabilidade e instabilidade de placas ateroscleróticas, foi realizado a transformação logarítmica do número de células inflamatórias somado de uma

MÉTODO

unidade (1+ log) e utilizado regressão linear com erros padrões robustos, através da opção de cluster. Além disso, foi criado modelo que incluiu a porcentagem de obstrução, a presença de estabilidade (categoria de referência) e instabilidade de placa, e a interação entre essas variáveis.

3.5.3.2 Tecido Adiposo Perivascular com Ausência de Aterosclerose, Tecido Adiposo Subcutâneo e Tecido Adiposo Perirrenal

Para a investigação da inflamação entre o TAPp e os tecidos adiposos controles, foi realizado a diferença entre o número de macrófagos, linfócitos T e B. Foi realizada a subtração entre TAPp e TAPaa, TAS e TAPr no mesmo indivíduo em cada artéria avaliada. As diferenças foram comparadas com a porcentagem de obstrução arterial através de modelos lineares generalizados (GLM), com distribuição normal e *link identity*. Para avaliar a associação entre o número de células inflamatórias e a instabilidade de placa foi utilizado modelos de regressão linear com erros padrão robustos, através da opção cluster. Posteriormente foi incluído no mesmo modelo as variáveis independentes: porcentagem de obstrução, presença de instabilidade de placa e a interação entre essas variáveis.

Os resultados da análise multivariada foram apresentados em modelos simples e ajustados para os fatores de confusão descritos. Foi utilizado o pacote estatístico STATA 13.0 (Stata Corp, Texas, EUA) e SAS 9.3 (SAS Corp, Carolina do Norte, EUA).

O nível de significância foi de 5% em testes bicaudais para todos os testes descritos.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Casuística

A coleta dos casos foi realizada entre o período de outubro de 2013 a novembro de 2015. Dentre os 1439 possíveis casos no serviço de verificação de óbitos, dentro do período de coleta de dados, foram incluídos e processados 133 casos consecutivamente. Dentre estes, sete foram excluídos por apresentar sinais de sepse. Os casos foram analisados até completarem o tamanho estipulado para cada grupo. Dessa forma foram incluídos 82 participantes. O fluxograma ilustrado na figura 24 apresenta o número de possíveis participantes, os participantes excluídos e incluídos neste estudo, de acordo com os critérios, e o modo como foram agrupados.

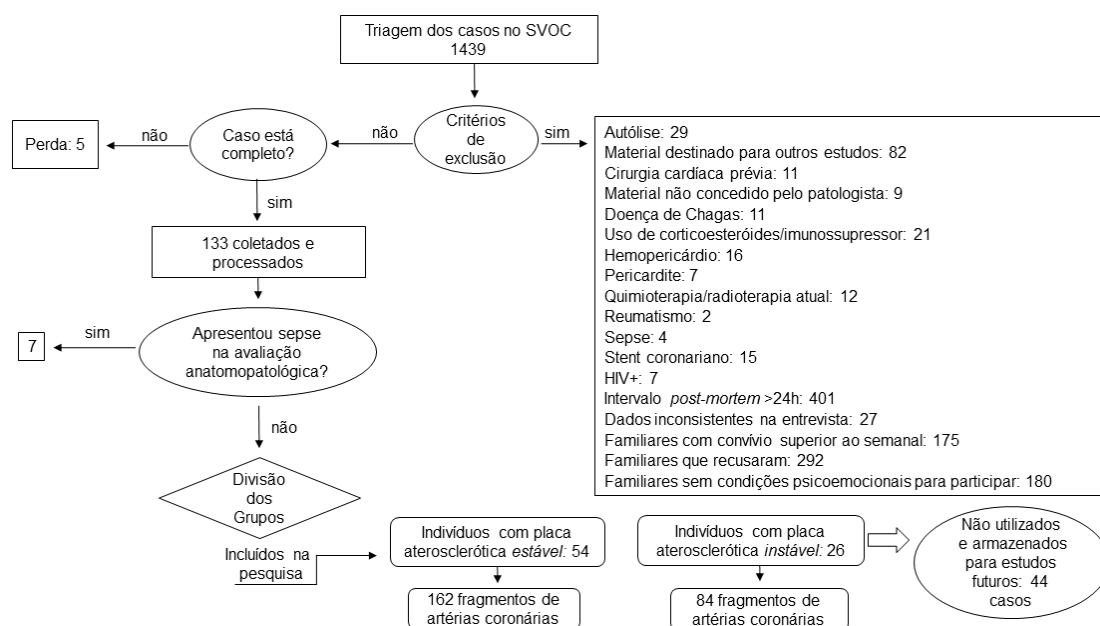


Figura 24. Fluxograma de entrada dos participantes no estudo.

4.2 Análise descritiva

4.2.1 Dados clínicos e sociodemográficos

A tabela 2 mostra a distribuição das variáveis sociodemográficas e clínicas dos 82 participantes analisados. Os informantes apresentaram em sua maioria convívio diário com o falecido (85,4%). A média de idade da amostra foi de $69,0 \pm 14,4$ anos (mínimo 30 e máximo 94 anos). Em relação ao sexo, a

RESULTADOS

amostra foi igualmente distribuída (50,0% para homens e mulheres) e apresentou uma maior frequência de indivíduos brancos (58,5%). Os participantes apresentaram baixa escolaridade (mediana de 4 anos e intervalo interquartilico entre 1-6 anos). Os grupos com placas estáveis e instáveis foram semelhantes quando comparados com as variáveis clínicas e sociodemográficas.

Tabela 2. Análise descritiva das variáveis clínicas e sociodemográficas da amostra (n=82 participantes), São Paulo, 2013-2015.

Variável	Total	Placas estáveis (n=54)	Placas instáveis (n=28)	p [§]
Idade (anos), média (DP)[*]	69,0 (14,4)	67,7 (15,4)	71,5 (11,9)	0,26
Sexo Feminino, n (%)[†]	41 (50,0)	29 (53,7)	12 (42,9)	0,35
Cor, n (%)[†]				0,25
. Branca	48 (58,5)	34 (63,0)	14 (50,0)	
. Não branca	34 (41,5)	20 (37,0)	14 (50,0)	
Escolaridade (anos), mediana (ITQ)[§]	4 (1-6)	4 (0-5)	4 (4-7,5)	0,11
HAS, n (%)[†]	61 (74,4)	38 (70,3)	23 (82,1)	0,24
Diabetes, n (%)[†]	30 (36,6)	29 (38,9)	9 (32,1)	0,54
Sintomas de DAC, n (%)[†]	10 (12,2)	5 (9,3)	5 (17,9)	0,25
Insuficiência Cardíaca, n (%)[†]	19 (23,2)	11 (20,4)	8 (28,6)	0,14
AVC, n (%)[¶]	10 (12,2)	6 (11,1)	4 (14,3)	0,40
Dislipidemia, n (%)[†]	14 (17,1)	9 (16,7)	9 (17,9)	0,89
IMC, média (DP) [*]	24,4 (5,8)	24,7 (5,9)	23,8 (5,6)	0,48
Sedentarismo, n (%)[†]	56 (68,3)	36 (66,7)	20 (71,4)	0,66
Tabagismo, n (%)[†]				0,55
. Sim	12 (14,6)	7 (13,0)	5 (17,9)	
. Não	70 (85,4)	47 (87,0)	23 (82,1)	
Uso de álcool, n (%)[†]				0,26
. Sim	24 (29,3)	18 (33,3)	6 (21,4)	
. Não	58 (70,7)	36 (66,7)	22 (78,6)	

DP: desvio padrão; ITQ: intervalo interquartilico; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DAC: Doença arterial coronariana; AVC: acidente vascular cerebral, IMC: índice de massa corpórea.

§ Comparação das variáveis clínicas e sociodemográficas entre os grupos: placas estáveis e placas instáveis.

*Teste T de *student*; † teste qui-quadrado; ¶ teste exato de Fisher; § Teste de Mann-Whitney.

4.2.2 Artérias coronárias

A porcentagem de obstrução em cada artéria coronária proximal de acordo com os grupos pode ser visualizada na Tabela 3.

RESULTADOS

Tabela 3. Análise descritiva da porcentagem de obstrução (análise microscópica) da lesão proximal mais significativa de cada artéria (CD, TCE ou DA e CX), de acordo com os grupos (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Grupos	<u>Porcentagem de Obstrução</u>			
	CD	TCE	DA	CX
. Placa aterosclerótica estável (n=162)	44,9 (20,9)	43,4 (20,4)	50,0 (22,1)	44,5 (23,3)
. Placa aterosclerótica instável (n=84)	84,0 (18,9)	87,7 (17,5)	77,0 (17,0)	69,7 (19,3)
Total	58,2 (27,6)	54,5 (27,5)	59,6 (24,1)	53,1 (25,2)

Números representam média (desvio padrão).

CD: artéria coronária direita; TCE: tronco da coronária esquerda; DA: artéria coronária descendente anterior; CX: artéria coronária circunflexa.

As artérias coronárias CD e DA apresentaram maior obstrução ($58,2 \pm 27,6$ e $59,6 \pm 24,1$ respectivamente). A média de porcentagem de obstrução proximal (CD, TCE/DA e CX) foi comparada com a média da porcentagem de obstrução distal (sem aterosclerose significativa) entre os grupos e no mesmo indivíduo (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação da porcentagem de obstrução (análise microscópica) da média das lesões mais significativas proximais, e distais de cada artéria (CD, TCE/DA e CX), de acordo com os grupos (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Variável	Placa estável (n=162)	Placa instável (n=84)	p [§]	p [*]	p [°]
Porcentagem de Obstrução					
<i>Proximal</i>	46,1 (22,2)	77,3 (19,6)	0,0004	0,0004	
<i>Distal</i>	16,1 (10,6)	20,7 (8,3)	0,0004		0,03

Números representam média (desvio padrão).

CD: artéria coronária direita; TCE: tronco da coronária esquerda; DA: artéria coronária descendente anterior; CX: artéria coronária circunflexa.

§ Comparação entre placas ateroscleróticas proximais e distais no mesmo indivíduo com teste t de *student* pareado.

* Comparação entre placas ateroscleróticas proximais entre os grupos teste t de *student*.

° Comparação entre placas ateroscleróticas distais entre os grupos teste t de *student*.

P valor ajustado para múltiplos testes através do método de Bonferroni.

De modo geral, o grupo com placa aterosclerótica estável apresentou média de porcentagem de obstrução nas lesões proximais de $46,1 \pm 22,1$ e o grupo instável apresentou média de $77,2 \pm 19,6$ nas lesões proximais. A amostra

RESULTADOS

como um todo apresentou média de $56,7 \pm 26,0$. A média das lesões proximais foram diferentes das lesões distais no mesmo indivíduo. Adicionalmente, a média das lesões proximais foram diferentes entre os grupos, assim como as lesões distais, desse modo o grupo com placas instáveis apresentaram maior porcentagem de obstrução.

O número de placas foi quantificado em toda a amostra coletada (n=82), sendo quantificado em 323 fragmentos de artérias coronárias com a finalidade de dimensionar a extensão da doença arterial coronariana (Tabela 5).

Tabela 5. Análise descritiva do número de placas (análise macroscópica) de todas as artérias coronárias em toda a amostra (n=323 fragmentos de artérias coronárias, considerando DA e TCE separadamente), São Paulo, 2013-2015.

Artérias	<u>Número de artérias de acordo com o número de placas</u>				p [§]
	Artérias sem placas	Artérias com 1 a 2 lesões	Artérias com 3 a 4 lesões	Artérias com lesões difusas	
CD	18	34	13	17	
. Grupo placas estáveis	17	26	7	4	<0.001
. Grupo placas instáveis	1	8	6	13	
TCE	24	53	-	-	
. Grupo placas estáveis	21	28	-	-	0.005
. Grupo placas instáveis	3	25	-	-	
DA	14	47	6	15	
. Grupo placas estáveis	14	33	2	5	<0.001
. Grupo placas instáveis	0	14	4	10	
CX	22	43	3	14	
. Grupo placas estáveis	21	26	3	4	<0.001
. Grupo placas instáveis	1	17	0	10	
Total	78	177	22	46	

§ Comparação do número de placas entre os grupos com o Teste Exato de Fisher.

CD: artéria coronária direita; TCE: tronco da coronária esquerda; DA: artéria coronária descendente anterior; CX: artéria coronária circunflexa.

Os indivíduos em sua maioria apresentaram uma ou duas lesões em todo o trajeto da artéria coronária (177 artérias coronárias) e 46 artérias apresentaram comprometimento difuso. As pessoas que apresentaram lesões instáveis, apresentaram maior gravidade de DAC, o número de artérias não comprometidas foi mínimo, e apresentou maior número de artérias com lesões difusas.

RESULTADOS

4.2.3 Células inflamatórias

Análise descritiva da distribuição dos macrófagos, linfócitos T e B no TAPp pode ser observada na Tabela 6.

Tabela 6. Análise descritiva da distribuição dos macrófagos, linfócitos T e B no TAPp em toda a amostra (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013 a 2015.

Células Inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Mediana	Intervalo Interquartilico
. <i>Macrófagos</i>	607,88	(322,73 - 1083,13)
. <i>Linfócitos T</i>	152,52	(75,15 - 265,25)
. <i>Linfócitos B</i>	4,42	(0 - 17,69)

TAPp: tecido adiposo perivascular periplaca.

A distribuição gráfica dos macrófagos, linfócitos T e B no TAPp pode ser observada na figura 25:

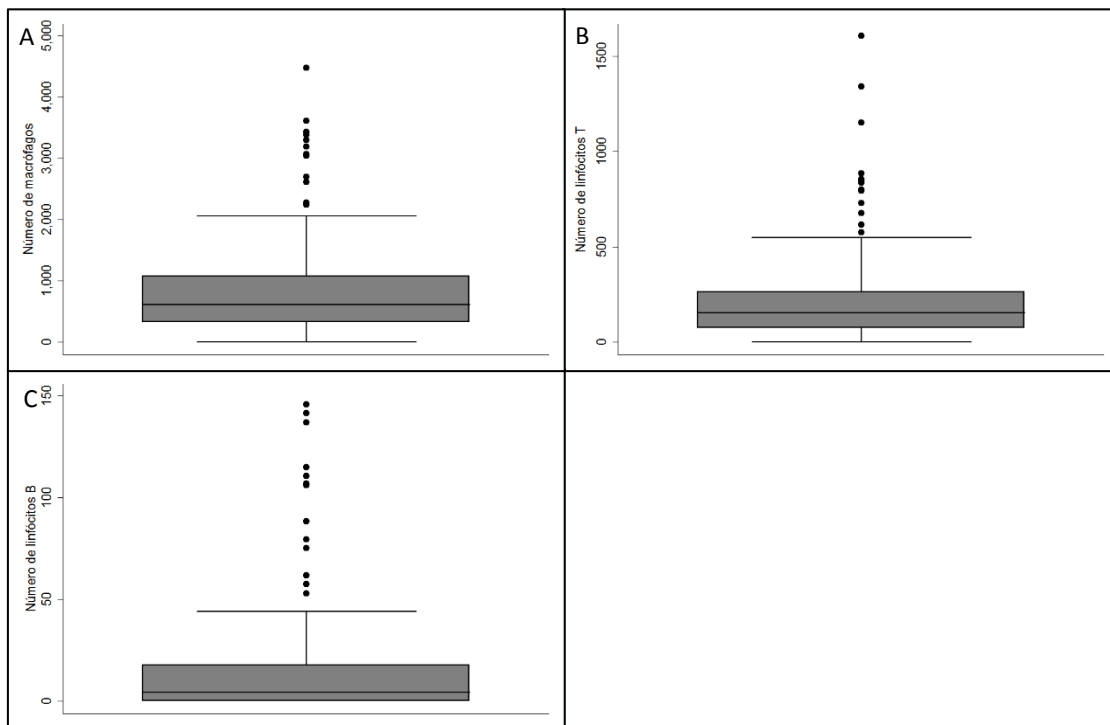


Figura 25. Distribuição dos macrófagos, linfócitos T e B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) no TAPp em toda a amostra (n=246 fragmentos).

Os dados de medida central e de dispersão da diferença das células inflamatórias nos tecidos adiposos podem ser observados na tabela 7.

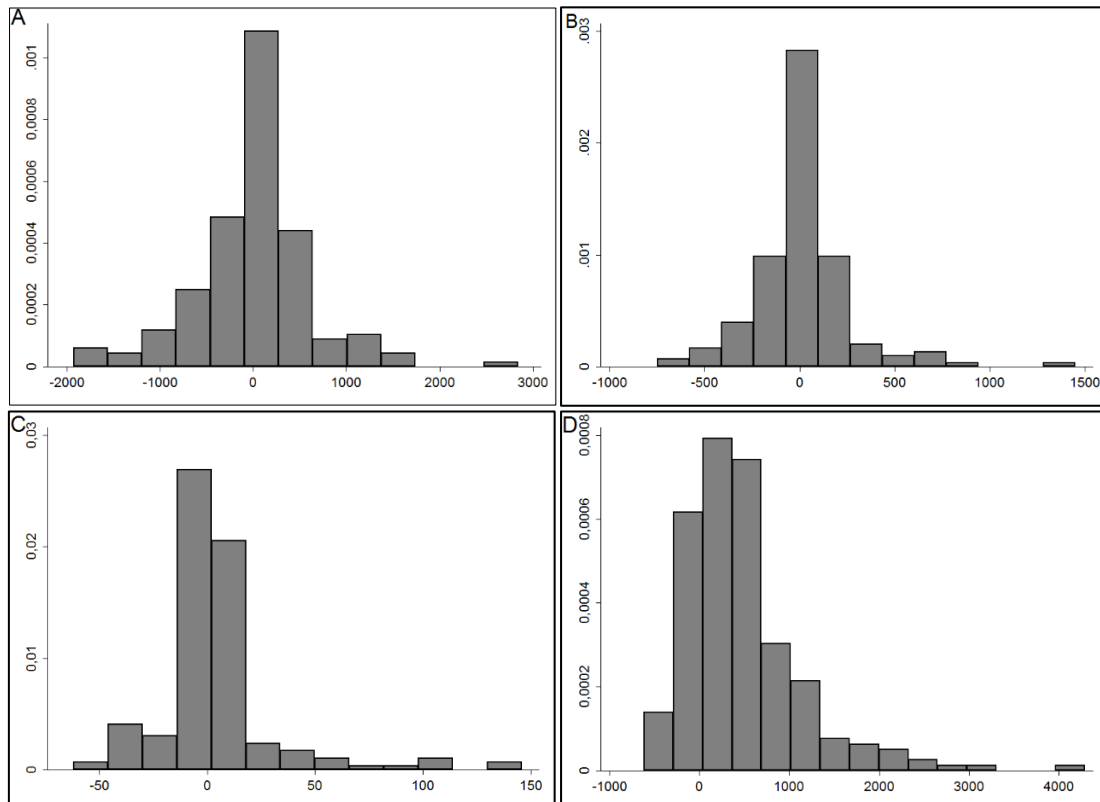
RESULTADOS

Tabela 7. Análise descritiva da diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre o TAPp e TAPaa, TAS, TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Diferença do Número de células inflamatórias entre os tecidos ($10^8/\mu\text{m}^2$)	Média da diferença e (DP)
Diff TAPp e TAPaa	
. Macrófagos	7,19 (615,83)
. Linfócitos T	7,29 (249,46)
. Linfócitos B	4,61 (27,87)
Diff TAPp e TAS	
. Macrófagos	479,04 (646,54)
. Linfócitos T	110,10 (197,56)
. Linfócitos B	7,00 (29,38)
Diff TAPp e TAPr	
. Macrófagos	309,11 (662,08)
. Linfócitos T	-22,37 (233,64)
. Linfócitos B	0,57 (33,65)

DP: desvio padrão; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular periapla; TAPaa: tecido adiposo epicárdico perivascular com ausência de aterosclerose; TAS: tecido adiposo subcutâneo; TAS: tecido adiposo perirrenal.

Os histogramas das diferenças dos macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e os tecidos controles podem ser observadas na figura 26:



RESULTADOS

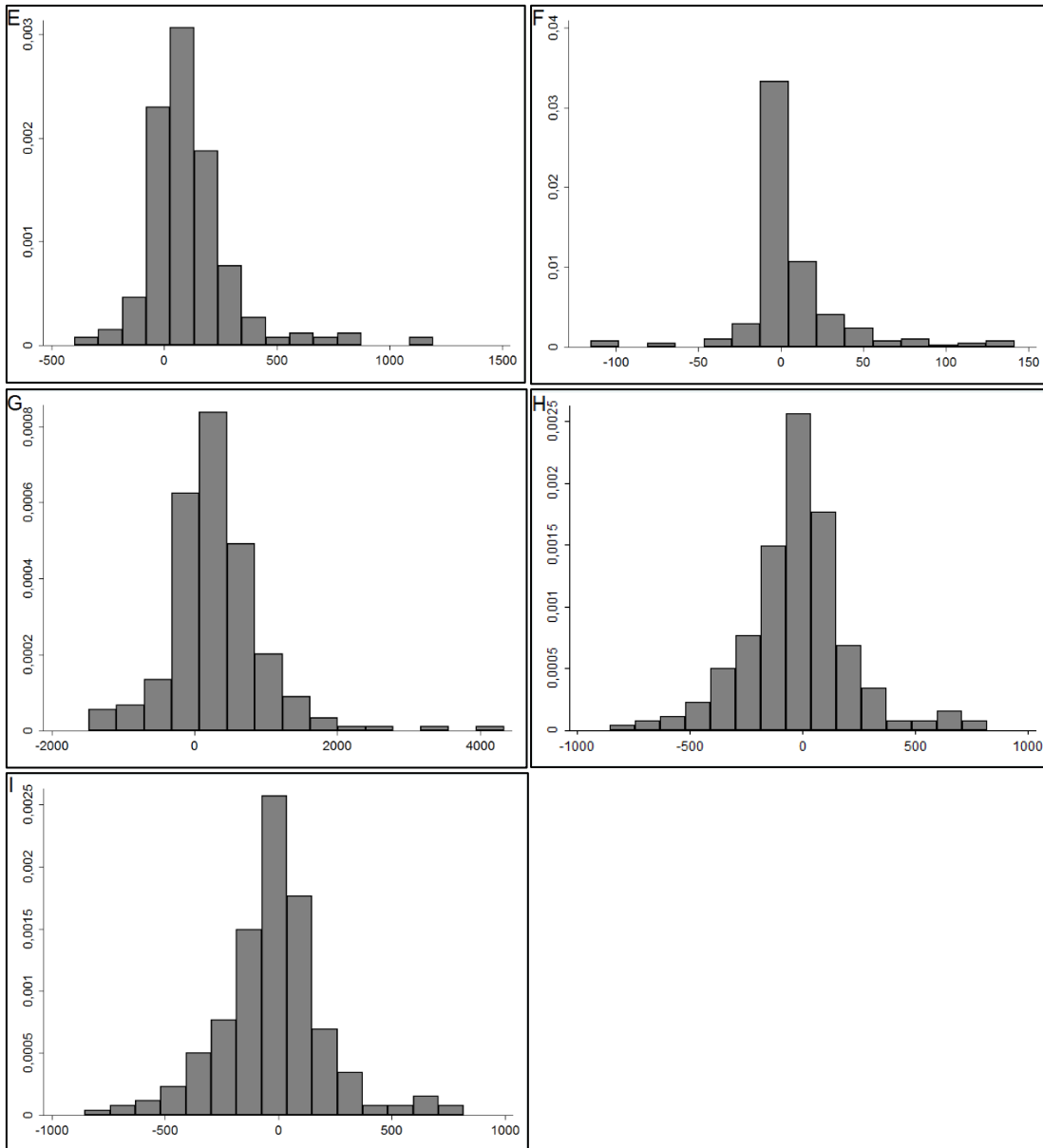
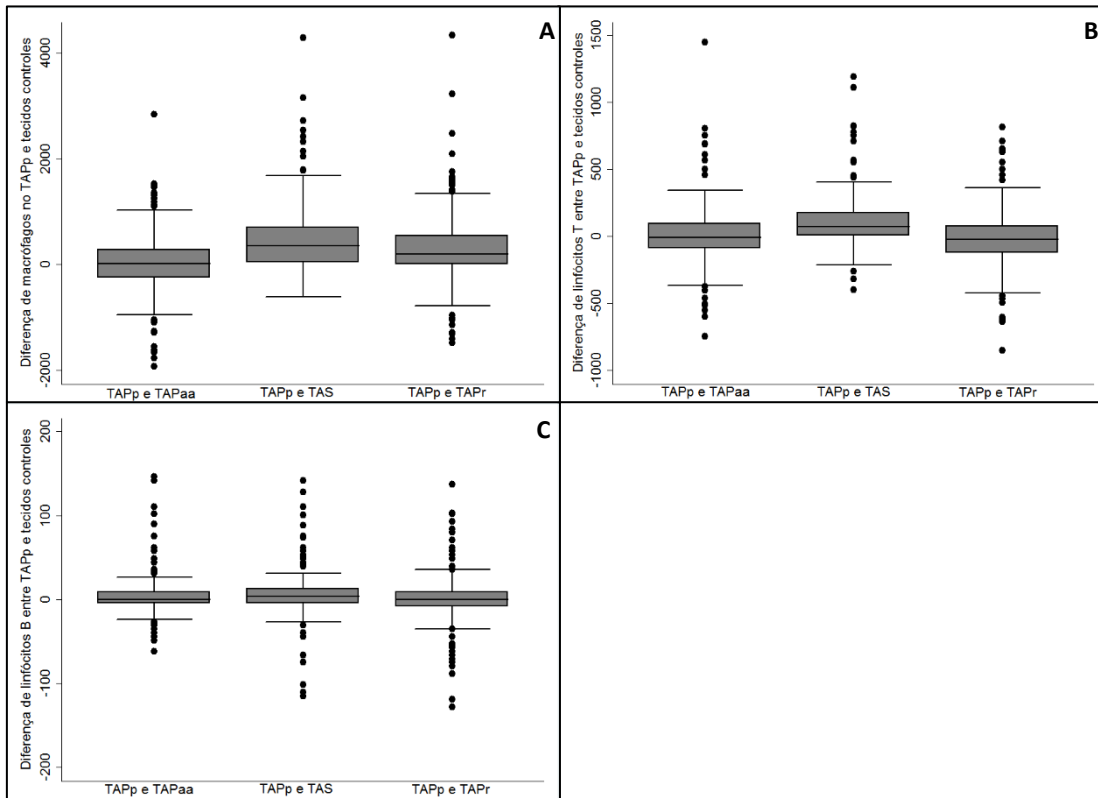


Figura 26. Histogramas das diferenças. A: Diferença do número de macrófagos entre TAPp e TAPaa; B: Diferença do número de linfócitos T entre TAPp e TAPaa; C: Diferença do número de linfócitos B entre TAPp e TAPaa; D: Diferença do número de macrófagos entre TAPp e TAS; E: Diferença do número de linfócitos T entre TAPp e TAS; E: Diferença do número de linfócitos B entre TAPp e TAS; F: Diferença do número de macrófagos entre TAPp e TAPr; G: Diferença do número de linfócitos T entre TAPp e TAPr; I: Diferença do número de linfócitos B entre TAPp e TAPr.

RESULTADOS

A representação, em gráficos de caixa das diferenças do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e os demais tecidos adiposos, pode ser observada na figura 27.



TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular peri-placa; TAPaa: tecido adiposo epicárdico perivascular com ausência de aterosclerose; TAS: tecido adiposo subcutâneo; TAS: tecido adiposo perirrenal.

Figura 27. Gráficos de caixa entre as diferenças entre TAPp e tecidos controles. A: Diferença de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e TAPaa, TAS e TAPr. B: Diferença de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e TAPaa, TAS e TAPr. C: Diferença de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e TAPaa, TAS e TAPr.

RESULTADOS

4.3 Análise univariada

Porcentagem de Obstrução

A associação entre a variável independente porcentagem de obstrução com as variáveis clínicas e sociodemográficas são mostrados na tabela 8:

Tabela 8. A análise de regressão das variáveis sociodemográficas e clínicas com a porcentagem de obstrução (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Variável	β	IC de 95%	p [§]
Idade	0,42	0,06; 0,78	0,02
Sexo Feminino	5,70	-4,54; 15,9	0,27
Cor Branca	2,31	-8,19; 12,82	0,66
Escolaridade	-0,001	-1,26; 1,25	0,99
HAS	15,25	2,70; 27,81	0,01
Diabetes	7,24	-2,75; 17,23	0,15
Diagnóstico prévio de DAC	14,42	1,15; 27,69	0,03
Insuficiência Cardíaca	9,92	-0,12; 19,97	0,05
AVC	9,08	-3,31; 21,47	0,14
Dislipidemia	10,01	1,60; 21,63	0,09
IMC	-0,08	-0,93; 0,76	0,84
Sedentarismo	-2,77	-13,96; 8,40	0,62
Tabagismo atual	-2,46	-16,08; 11,14	0,71
Uso de álcool atual	-10,75	-21,68; 0,16	0,05

IC: Intervalo de Confiança; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DAC: Doença arterial coronariana; AVC: acidente vascular cerebral, IMC: índice de massa corpórea.

§Relação das variáveis clínicas e sociodemográficas com a porcentagem de obstrução através da regressão linear simples com erros padrões robustos, opção cluster.

Idade apresentou associação com porcentagem de obstrução ($\beta=0,42$; IC95% 0,06; 0,78; $p < 0,02$). Foram observadas associações entre porcentagem de obstrução com hipertensão arterial sistêmica ($\beta=15,25$; IC95% 2,70; 27,81; $p < 0,01$), e com diagnóstico prévio de DAC ($\beta=14,42$; IC95% 1,15; 27,69; $p=0,03$).

Foi realizada a correlação entre a porcentagem de obstrução com o número de macrófagos, linfócitos T e B (Tabela 9).

RESULTADOS

Tabela 9. Correlação entre o número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp com a porcentagem de obstrução arterial (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013 a 2015.

Células Inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Coeficiente de correlação (r)	p [§]
. <i>Macrófagos</i>	0,24	0,0001
. <i>Linfócitos T</i>	0,13	0,03
. <i>Linfócitos B</i>	0,20	0,001

TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca.

§ Correlação entre o número de entre o número de macrófagos, linfócitos T e B com a porcentagem de obstrução arterial com o teste de correlação de Spearman.

Os macrófagos, linfócitos T e B no TAPp apresentaram correlação positiva e estatisticamente significativa com a porcentagem de obstrução arterial da placa aterosclerótica adjacente ao tecido adiposo. A associação pode ser visualizada nos gráficos de dispersão na figura 28 para macrófagos, linfócitos T e B.

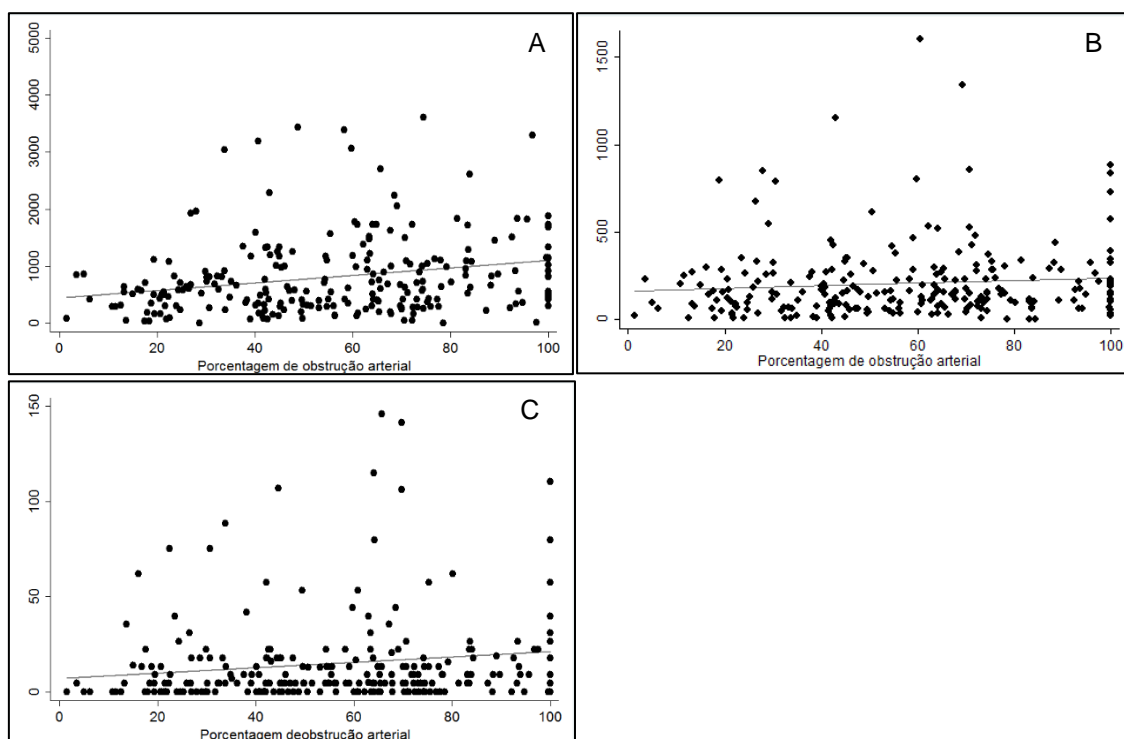


Figura 28. Gráficos de dispersão da associação entre o número de células inflamatórias no TAPp e porcentagem de obstrução arterial da placa adjacente ao tecido adiposo. A: Associação entre o número de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$). B: Associação entre o número de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$). C: Associação entre o número de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$).

RESULTADOS

A correlação entre a diferença das células inflamatórias entre TAPp e tecidos controles com a porcentagem de obstrução arterial foi testada (Tabela 10).

Tabela 10. Correlação da diferença de macrófagos, linfócitos T e B entre o TAPp e os tecidos adiposos controles com a porcentagem de obstrução arterial (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013 a 2015.

Número de células inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Coeficiente de correlação (r)	p [§]
Diff TAPp e TAPaa		
. <i>Macrófagos</i>	0,25	0,0004
. <i>Linfócitos T</i>	0,09	0,19
. <i>Linfócitos B</i>	0,16	0,02
Diff TAPp e TAS		
. <i>Macrófagos</i>	0,22	0,0004
. <i>Linfócitos T</i>	0,11	0,07
. <i>Linfócitos B</i>	0,05	0,37
Diff TAPp e TAPr		
. <i>Macrófagos</i>	0,18	0,004
. <i>Linfócitos T</i>	0,04	0,48
. <i>Linfócitos B</i>	-0,027	0,68

TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular peri-placa. TAPaa: tecido adiposo epicárdico perivascular com ausência de aterosclerose; TAS: tecido adiposo subcutâneo; TAPr: tecido adiposo perirrenal.

§ Correlação entre o número de entre a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp e tecidos adiposos controles, com a porcentagem de obstrução arterial com o teste de correlação de Pearson.

O número de macrófagos foi maior no TAPp do que nos tecidos TAPaa, TAS e TAPr, quanto maior a porcentagem de obstrução arterial, com uma correlação fraca, porém significativa ($r=0,25$ e $p=0,0004$; $r=0,22$ e $p=0,0004$, e $r=0,18$ e $p=0,004$, respectivamente). Os linfócitos B foram maiores no TAPp em relação ao TAPaa ($r=0,16$ e $p=0,02$), quanto maior a porcentagem de obstrução arterial. As correlações podem ser observadas nos gráficos de dispersão entre TAPp e TAPaa (Figura 29), TAPp e TAS (Figura 30) e TAPp e TAPr (Figura 31):

RESULTADOS

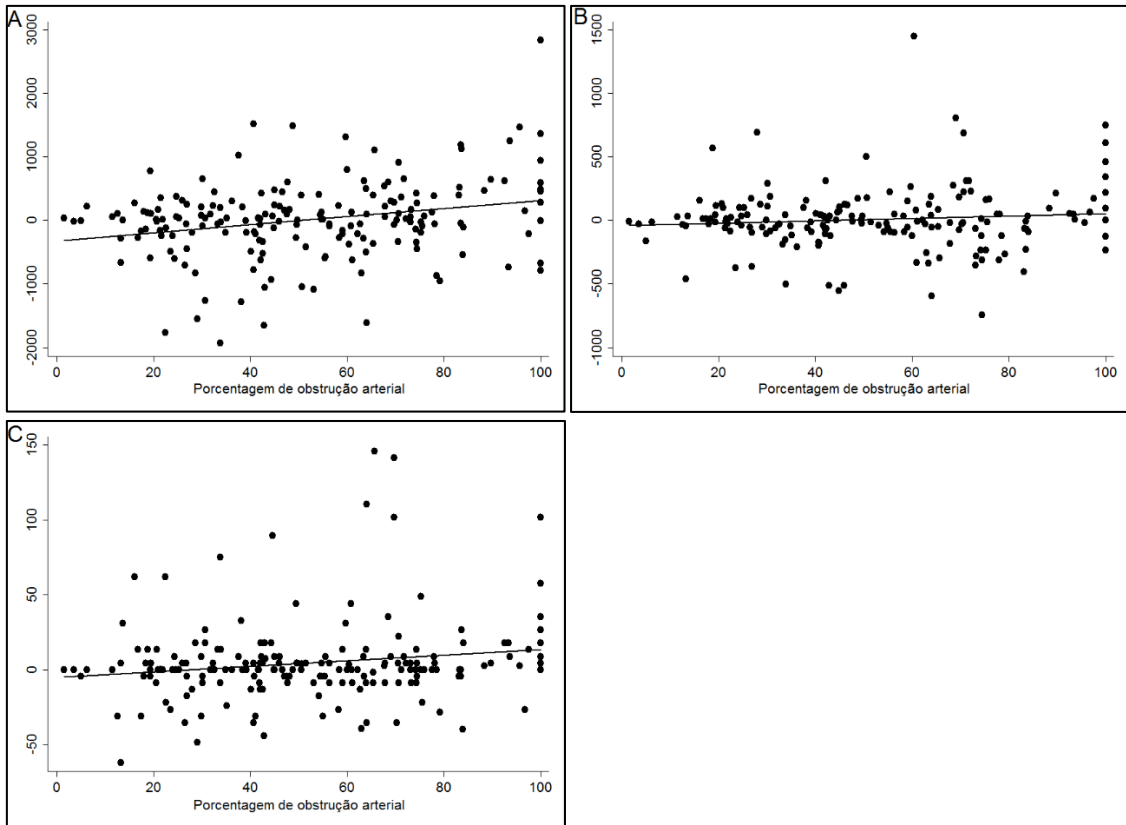


Figura 29. Gráficos de dispersão da diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPaa. A: gráfico de dispersão da diferença do número de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); B: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); C: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$).

RESULTADOS

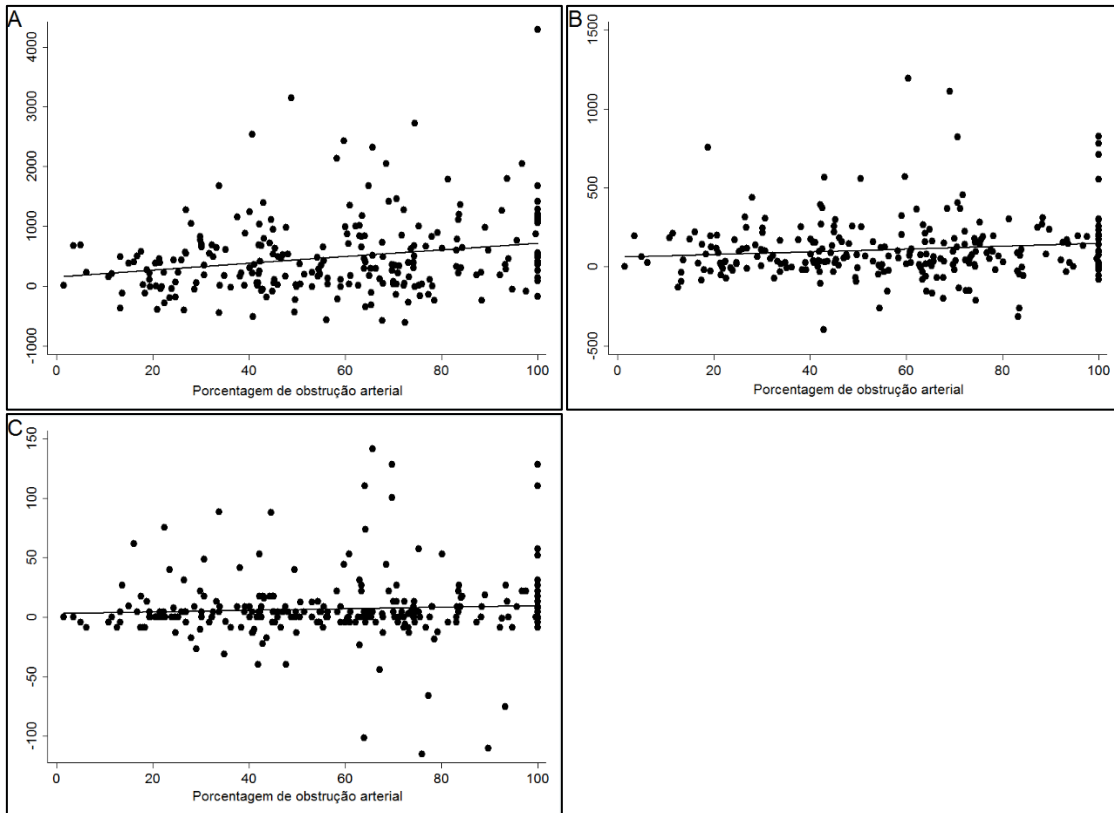


Figura 30. Gráficos de dispersão da diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAS. A: gráfico de dispersão da diferença do número de macrófagos ($10^8/\mu\text{m}^2$); B: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos T ($10^8/\mu\text{m}^2$); C: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos B ($10^8/\mu\text{m}^2$).

RESULTADOS

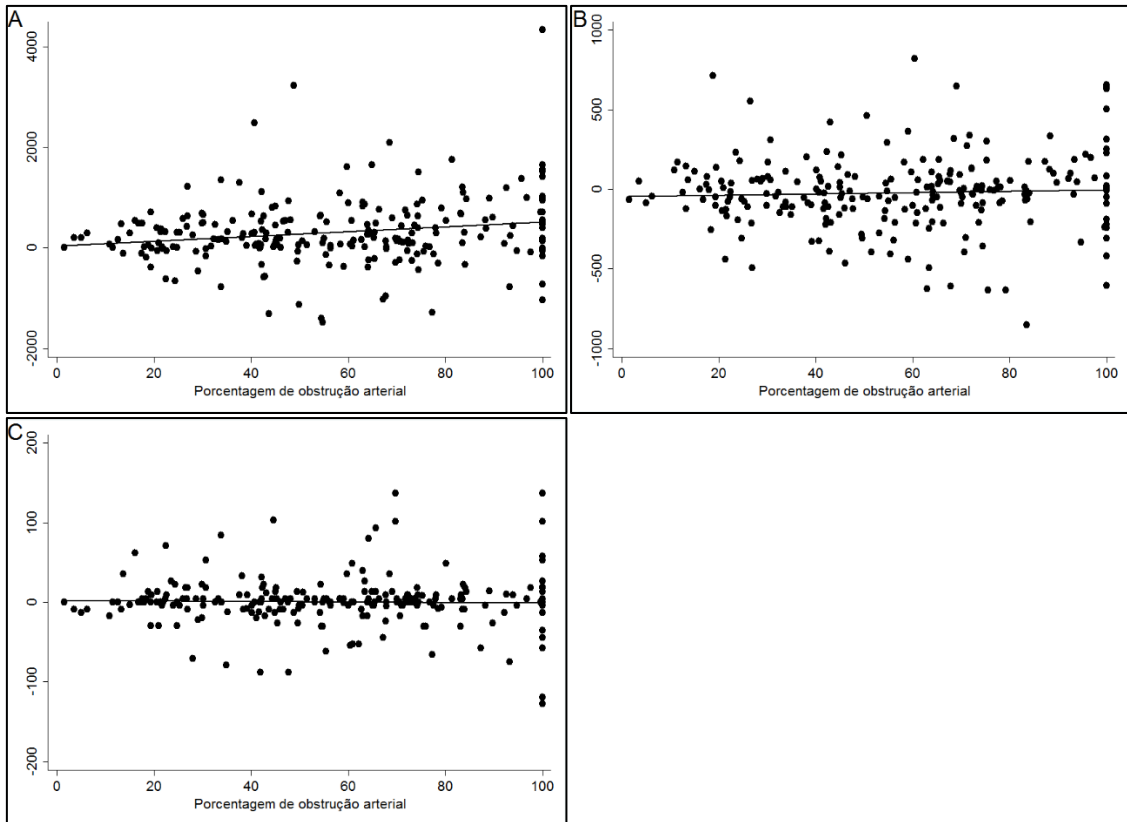


Figura 31. Gráficos de dispersão da diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPr. A: gráfico de dispersão da diferença do número de macrófagos ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); B: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$); C: gráfico de dispersão da diferença do número de linfócitos B ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$).

RESULTADOS

Estabilidade e instabilidade das placas ateroscleróticas

A associação entre as variáveis clínicas e sociodemográficas foi realizada para os grupos de acordo com a presença de estabilidade e instabilidade das placas ateroscleróticas, sendo a categoria de placas estáveis a categoria de referência. Os resultados podem ser visualizados na tabela 11.

Tabela 11. Análise de regressão das variáveis sociodemográficas e clínicas com os grupos de acordo com a presença de placas estáveis ou instáveis (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Variável	OR	IC de 95%	p [§]
Idade	0,41	0,006; 0,07	0,02
Sexo Feminino	0,43	-0,48; 1,36	0,35
Cor Branca	-0,13	-1,07; 0,79	0,77
Escolaridade	-0,01	-0,12; 0,10	0,84
HAS	1,32	0,27; 2,36	0,01
Diabetes	0,80	-0,21; 1,81	0,12
Diagnóstico prévio de DAC	1,68	-0,44; 3,81	0,12
Insuficiência Cardíaca	1,25	-0,08; 2,59	0,06
AVC	1,68	-0,44; 3,81	0,12
Dislipidemia	0,75	-0,61; 2,13	0,28
IMC	-0,01	-0,09; 0,06	0,65
Sedentarismo	0,27	-0,69; 1,25	0,57
Tabagismo atual	0,04	-1,26; 1,34	0,94
Uso de álcool atual	-1,22	-2,22; -0,21	0,01

OR: *odds ratio*; IC: Intervalo de Confiança; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DAC: doença arterial coronariana; AVC: acidente vascular cerebral, IMC: índice de massa corpórea.

§Relação das variáveis clínicas e sociodemográficas com os grupos de acordo com a estabilidade/instabilidade da placa aterosclerótica através da regressão logística simples com erros padrões robustos, opção cluster (categoria de referência placa aterosclerótica estável).

Podemos observar, assim como ocorreu associação com a porcentagem de obstrução, a idade também se associou com placas instáveis (OR: 0,41; IC95% 0,006; 0,07, p 0,02), assim como HAS (OR: 1,32; IC95% 0,27; 2,36; p 0,01). Uso de álcool atual apresentou associação negativa com presença de placas instáveis (OR: -1,22; IC95% -2,22; -0,21, p 0,01).

RESULTADOS

A distribuição do número de células inflamatórias no TAPp de acordo com a presença de placas ateroscleróticas estáveis ou instáveis pode ser observada na tabela 12 e graficamente na figura 32.

Tabela 12. Número de células inflamatórias no TAPp de acordo com a presença de estabilidade e instabilidade da placa aterosclerótica (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Número de Células Inflamatórias ($10^{-8}/m^2$)	Placas ateroscleróticas estáveis (n=162)	Placas ateroscleróticas instáveis (n=84)	p [*]
. Macrófagos	588,0 (305,05 - 999,14)	729,46 (370,73 - 1200,29)	0,15
. Linfócitos T	150,31 (70,73 - 260,83)	154,73 (84,0 - 289,57)	0,46
. Linfócitos B	4,42 (0 - 13,26)	12,94 (4,42 - 26,52)	0,0002

Números representam mediana (intervalo interquartilico).

TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular peri-placa.

* Comparação entre os grupos com o teste não paramétrico Mann-Whitney.

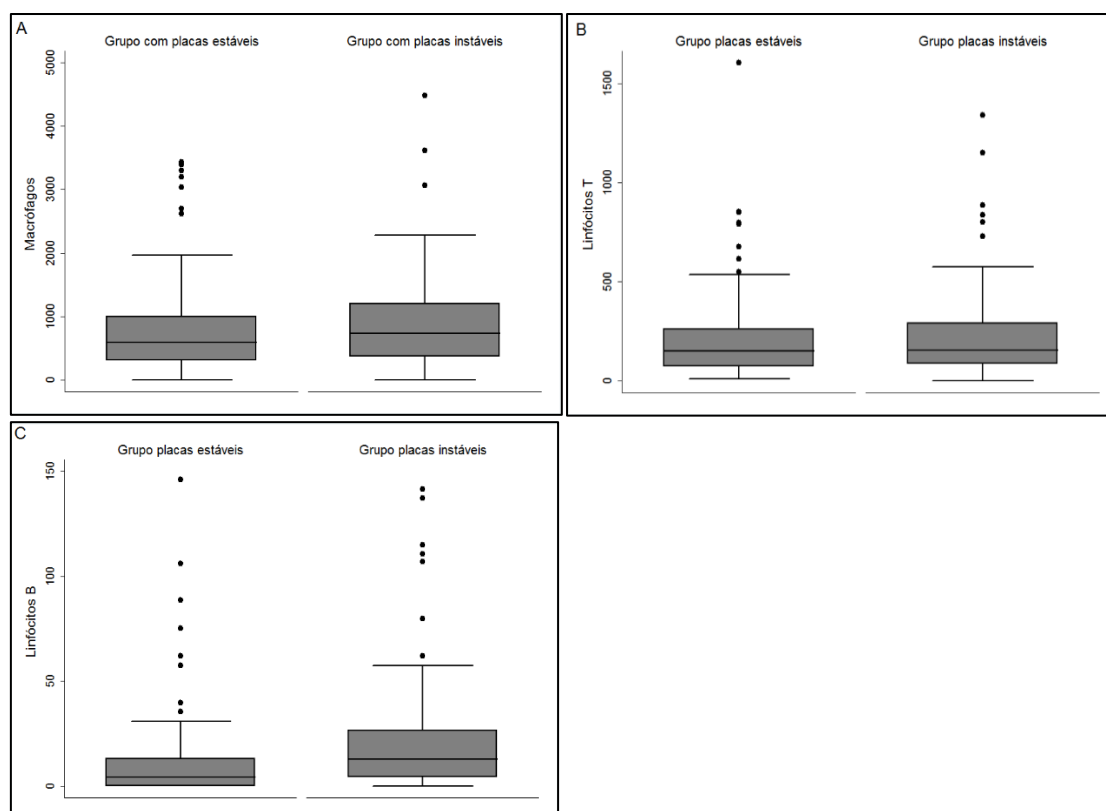


Figura 32. Número de células inflamatórias ($10^{-8}/\mu m^2$) no TAPp de acordo com os grupos. A: macrófagos; B: linfócitos T; C: linfócitos B.

RESULTADOS

A diferença entre o número de células inflamatórias no TAPp e nos tecidos adiposos controles: TAPaa, TAS e TAPr pode ser observada na tabela 13.

Tabela 13. Diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPaa, TAS e TAPr, de acordo com a presença de placas estáveis ou instáveis (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Diferença do número de células inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Placa aterosclerótica estável (n=162)	Placa aterosclerótica instável (n=84)	p*
Diff TAPp e TAPaa			
. Macrófagos	-24,8 (545,8)	107,4 (795,5)	0,21
. Linfócitos T	-5,7 (235,6)	46,2 (286,2)	0,22
. Linfócitos B	1,0 (23,8)	15,9 (35,9)	0,0016
Diff TAPp e TAS			
. Macrófagos	441,2 (566,9)	550,7 (774,0)	0,21
. Linfócitos T	103,3 (175,3)	123,3 (235,2)	0,45
. Linfócitos B	3,9 (26,2)	12,9 (34,1)	0,02
Diff TAPp e TAPr			
. Macrófagos	246,6 (541,3)	418,5 (824,8)	0,05
. Linfócitos T	-16,5 (195,9)	-34,0 (296,1)	0,58
. Linfócitos B	-6,0 (46,2)	2,8 (45,1)	0,17

Números representam média (desvio padrão).

TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca; TAPaa: tecido adiposo epicárdico perivascular com ausência de aterosclerose; TAS: tecido adiposo subcutâneo; TAPr: tecido adiposo perirrenal.

* Comparação da diferença das células inflamatórias entre o grupo com placas ateroscleróticas estáveis e placas ateroscleróticas instáveis entre TAPp e TAPaa; TAPp e TAS; e TAPp e TAPr com o teste t *de student*.

Os linfócitos B apresentaram maior diferença entre TAPp e TAPaa na presença de placas ateroscleróticas instáveis ($p=0,0016$), ou seja, na presença de placas ateroscleróticas instáveis a inflamação periplaca é maior do que na área controle adjacente à artéria com ausência de placa aterosclerótica. Este resultado também foi encontrado na diferença entre TAPp e TAS ($p=0,02$). Encontramos uma tendência para macrófagos em relação à diferença do número de células no TAPp e TAPr ($p=0,05$). As diferenças entre o número de células inflamatórias entre TAPp e os diversos tecidos adiposos controles podem ser observadas graficamente abaixo para macrófagos (Figura 33), para linfócitos T (Figura 34) e para linfócitos B (Figura 35).

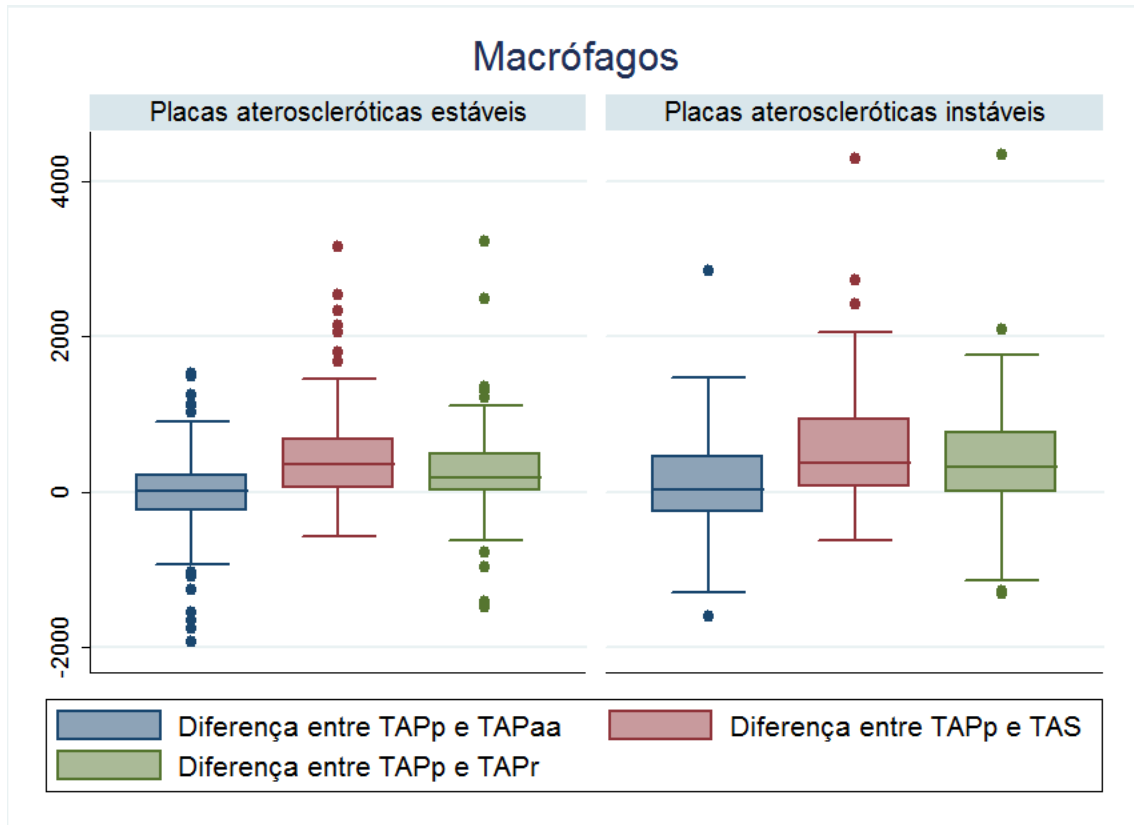
RESULTADOS

Figura 33. Gráfico de caixa da diferença do número de macrófagos ($10^8/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e tecidos adiposos controles: TAPaa, TAS e TAPr, de acordo com a classificação da placa aterosclerótica.

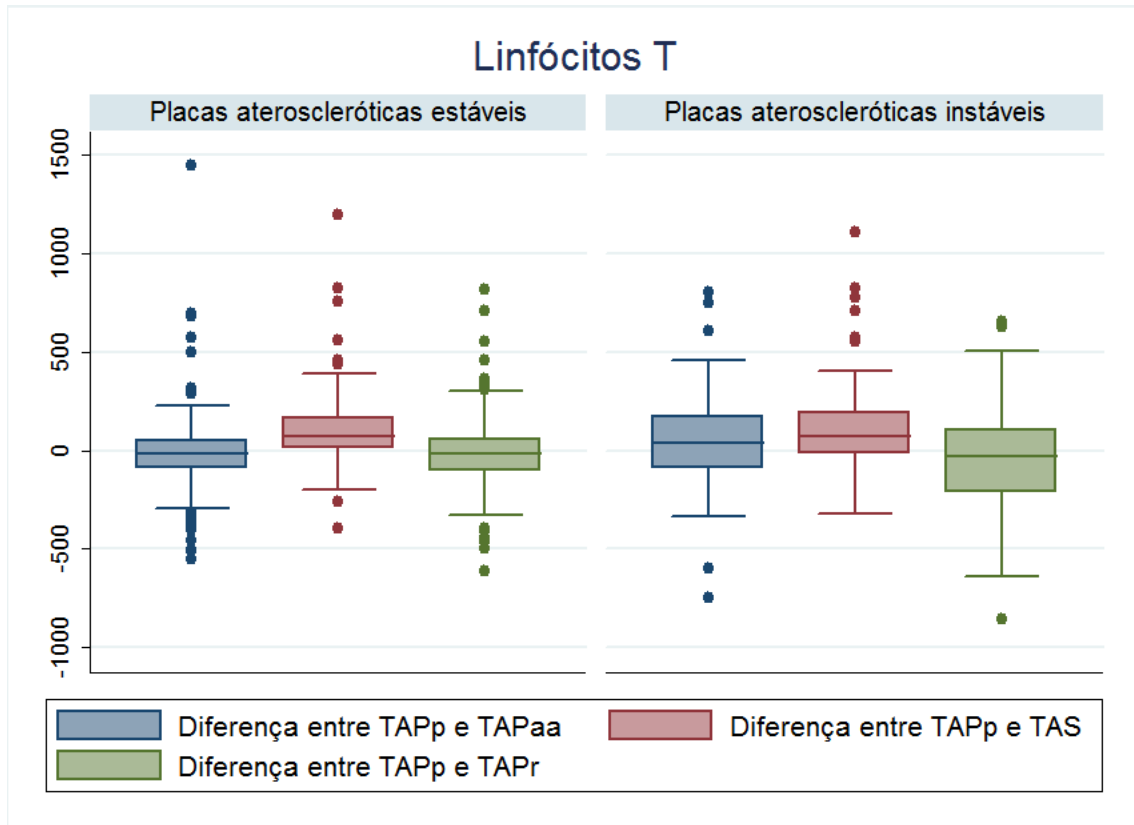


Figura 34. Gráfico de caixa da diferença do número de linfócitos T ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e tecidos adiposos controles: TAPaa, TAS e TAPr, de acordo com o tipo de placa aterosclerótica.

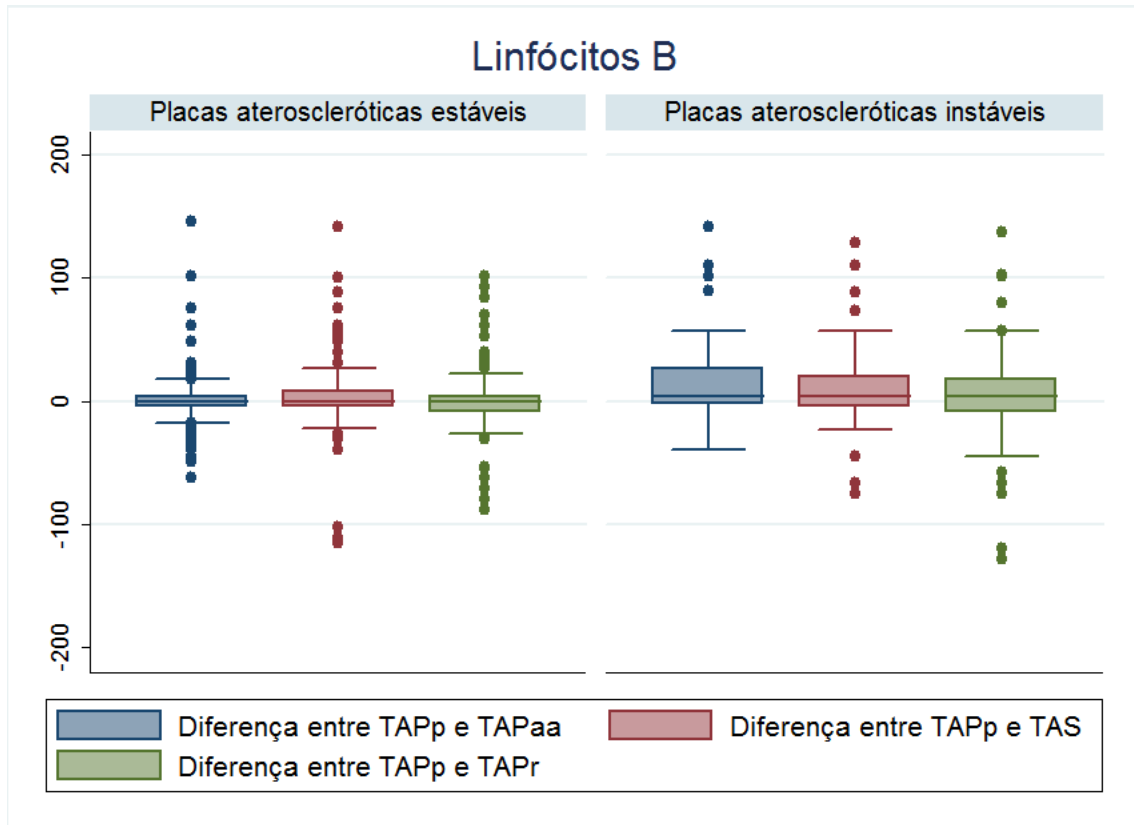
RESULTADOS

Figura 35. Gráfico de caixa da diferença do número de linfócitos B ($10^8/\mu\text{m}^2$) entre TAPp e tecidos adiposos controles: TAPaa, TAS e TAPr, de acordo com o tipo de placa aterosclerótica.

RESULTADOS

4.4 Análise multivariada

4.4.1 Tecido adiposo perivascular periplaca (TAPp)

Primeiramente foi realizada regressão por modelos lineares generalizados (GLM) simples (não ajustada) e a multivariada (ajustada para os fatores de confusão) para a associação entre a porcentagem de obstrução arterial e o número de células inflamatórias. O resultado pode ser observado na tabela 14.

Tabela 14. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias com o número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Número de Células Inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Modelo Simples			Modelo Multivariado*		
	β	IC de 95%	p [§]	β	IC de 95%	p [§]
. Macrófagos	0,009	0,002; 0,156	0,005	0,008	0,002; 0,014	0,007
. Linfócitos T	0,004	-0,001; 0,010	0,08	0,004	-0,001; 0,010	0,11
. Linfócitos B	0,011	0,003; 0,018	0,002	0,009	0,002; 0,015	0,01

IC=intervalo de confiança de 95%; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca.

§ Regressão por modelos lineares generalizados entre a porcentagem de obstrução nas artérias coronárias e o número de células inflamatórias no TAPp.

* Ajustado para idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, tabagismo e etilismo.

Os macrófagos e os linfócitos B apresentaram associação com a porcentagem de obstrução no modelo simples, que se manteve no modelo ajustado ($\beta=0,008$, IC95%= 0,002; 0,014, $p=0,007$) e ($\beta=0,009$, IC95%= 0,002; 0,015, 0,01), respectivamente.

Foi realizado a análise da associação do (1+log) do número de macrófagos, linfócitos T e B com a presença de estabilidade/instabilidade na placa aterosclerótica (Tabela 15).

RESULTADOS

Tabela 15. Associação entre grupos de estabilidade e instabilidade das placas ateroscleróticas artérias coronárias com (1+log) do número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Número de Células Inflamatórias ($10^8/\mu\text{m}^2$)	Modelo Simples			Modelo Multivariado*		
	β	IC de 95%	p [§]	β	IC de 95%	p [§]
. Macrófagos	0,123	-0,286; 0,533	0,55	0,053	-0,326; 0,432	0,78
. Linfócitos T	0,061	-0,272; 0,324	0,17	0,053	-0,283; 0,390	0,75
. Linfócitos B	0,687	0,312; 0,061	<0,001	0,554	0,194; 0,914	0,003

IC=intervalo de confiança; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular peri-placa.

§ Modelo de regressão linear com erros padrões robustos (opção cluster) entre os grupos estabilidade e instabilidade de placa ateroscleróticas nas artérias coronárias com o (1+log) do número de células inflamatórias no TAPp. Grupo com placa estável foi a categoria de referência.

* Ajustado para idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, tabagismo e etilismo.

O número de linfócitos B no TAPp se associou com a presença de placas instáveis ($\beta=0,554$, IC95%=0,195; 0,914, $p=0,003$), independente dos fatores de confusão.

A interação entre as variáveis porcentagem de obstrução e grupos de acordo com a composição da placa aterosclerótica foi testada, porém não houve diferença no modelo ajustado: macrófagos ($\beta= 0,002$, IC95%= -0,009; 0,01, $p=0,66$), linfócitos T ($\beta= -0,19$, IC95%= -1,44; 1,05, $p=0,76$) e linfócitos B ($\beta=0,008$, IC95%= -0,025; 0,009, $p=0,35$).

4.4.2 Comparação da inflamação no tecido adiposo perivascular peri-placa (TAPp) com tecido adiposo perivascular com ausência de aterosclerose (TAPaa)

A mesma análise foi realizada para a diferença do número das células inflamatórias nos diferentes tecidos. Mais macrófagos ($\beta=7,2320$, IC95% 1,892; 12,572, $p=0,007$) e linfócitos B ($\beta=0,2001$, IC95% 0,001; 0,400, $p=0,04$) foram encontrados no TAPp quando comparado com o TAPaa, distal, mostrados na tabela 16. Isto evidencia que o número de células inflamatórias é maior na região

RESULTADOS

próxima à placa aterosclerótica, do que a região distal, e esta diferença aumenta de acordo com o aumento da porcentagem de obstrução arterial.

Tabela 16. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAPaa (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Diferença do Número de Células Inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Modelo Simples			Modelo Multivariado*		
	β	IC de 95%	p [§]	B	IC de 95%	p [§]
. Macrófagos	6,471	1,746; 11,195	0,007	7,232	1,892; 12,572	0,007
. Linfócitos T	0,954	-0,578; 2,487	0,22	1,015	-0,685; 2,7157	0,24
. Linfócitos B	0,189	0,008; 0,370	0,04	0,200	0,001; 0,400	0,04

IC=intervalo de confiança; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca; TAPaa: tecido adiposo epicárdico perivascular com ausência de aterosclerose.

§ Regressão por modelos lineares generalizados entre a porcentagem de obstrução nas artérias coronárias e a diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPaa.

* Ajustado para idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, tabagismo e etilismo.

A diferença entre as células inflamatórias entre TAPp e TAPaa de acordo com a composição de placa estável ou instável é mostrada na tabela 17.

Tabela 17. Associação entre os grupos de estabilidade e instabilidade de placas ateroscleróticas das artérias coronárias com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAPaa (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Diferença do Número de Células Inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Modelo Simples			Modelo Multivariado*		
	B	IC de 95%	p [§]	β	IC de 95%	p [§]
. Macrófagos	132,211	-155,720; 420,141	0,36	144.383	-166,609; 455,374	0,35
. Linfócitos T	51.884	-61,486; 165.254	0,36	56.615	-75,469; 188.700	0,39
. Linfócitos B	14,897	2,627; 27,166	0,01	15,321	2,022; 28,620	0,02

IC=intervalo de confiança; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca; TAPaa: tecido adiposo epicárdico perivascular com ausência de aterosclerose.

§ Regressão linear com erros padrões robustos (opção cluster) entre grupos com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis, com a diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPaa. Grupo placa estável foi a categoria de referência.

* Ajustado para idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, tabagismo e etilismo.

RESULTADOS

O número de linfócitos B se associou com placas ateroscleróticas instáveis, independente dos fatores de confusão ($\beta=15,321$, IC95% 2,022; 28,620, $p=0,02$). Dessa forma, na presença de placas instáveis, há uma diferença entre linfócitos B no TAPp em relação ao TAPaa, ou seja, o número de linfócitos B foi maior no TAP adjacente à placa de aterosclerose do que no TAP adjacente à uma região pericoronária com ausência de lesão.

Não foi encontrada interação entre a porcentagem de obstrução arterial e a instabilidade de placa em relação à diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPaa (macrófagos: $\beta=9,819$, IC95%= -3,982; 23,621, $p=0,16$; linfócitos T: $\beta=2,161$, IC95%= -2,464; 6,785, $p=0,35$, e linfócitos B: $\beta= -0,049$, IC95%= -0,496; 0,398 e $p=0,83$).

Portanto, pode-se afirmar que houve aumento do número de macrófagos no TAPp com o aumento da porcentagem de obstrução, e quando as placas ateroscleróticas foram instáveis, o número de linfócitos B aumentou no TAPp. Essas associações foram restritas à placa aterosclerótica.

4.4.3 Comparação da inflamação no tecido adiposo perivascular periplaca (TAPp) com tecido adiposo subcutâneo (TAS)

Em relação à diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAS, o número de macrófagos foi maior no TAPp em relação ao TAS, quanto maior a porcentagem de obstrução ($\beta=5,717$, IC95%=1,802; 9,632, $p=0,004$), assim como os linfócitos T ($\beta=0,991$, IC95%=0,030; 1,951, $p=0,04$), independente dos fatores de confusão. Embora os linfócitos T apresentaram um efeito pequeno e não tenham se associado com a porcentagem de obstrução e composição de placa no TAPp, foram presentes no tecido adiposo cardíaco pois apresentou maior número em relação ao tecido adiposo subcutâneo. Os resultados podem ser visualizados na tabela 18.

RESULTADOS

Tabela 18. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAS (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Diferença do Número de Células Inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Modelo Simples			Modelo Multivariado*		
	β	IC de 95%	p [§]	β	IC de 95%	p [§]
. Macrófagos	5,667	2,054; 9,280	0,002	5,717	1,802; 9,632	0,004
. Linfócitos T	0,877	-0,104; 1,858	0,07	0,991	0,030; 1,951	0,04
. Linfócitos B	0,060	-0,097; 0,217	0,45	0,066	-0,090; 0,222	0,40

IC=intervalo de confiança; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular peri-placa; TAS: tecido adiposo subcutâneo.

§ Regressão por modelos lineares generalizados entre a porcentagem de obstrução nas artérias coronárias com a diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAS.

* Ajustado para idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, tabagismo e etilismo.

A diferença do número de macrófagos, linfócitos B e T entre TAPp e TAS não se associou com a composição de placa estável e instável (Tabela 19).

Tabela 19. Associação entre grupo com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp e TAS (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Diferença do Número de Células Inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Modelo Simples			Modelo Multivariado*		
	β	IC de 95%	p [§]	β	IC de 95%	p [§]
. Macrófagos	109,462	-154,262; 373,187	0,41	87,661	-183,710; 359,032	0,52
. Linfócitos T	20,042	-47,914; 87,998	0,55	22,578	-44,669; 89,825	0,50
. Linfócitos B	9,022	-1,035; 19,080	0,07	8,722	-3,392; 20,836	0,15

IC=intervalo de confiança; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular peri-placa; TAS: tecido adiposo subcutâneo.

§ Regressão linear com erros padrões robustos (opção cluster) entre grupos com placa aterosclerótica estável e instável com a diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAS. Grupo placa estável foi a categoria de referência.

* Ajustado para idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, tabagismo e etilismo.

A interação entre a porcentagem de obstrução e composição de placa estável e instável não atingiu diferença estatística para macrófagos ($\beta=3,043$, IC95%=-5,685; 11,770, p=0,49), linfócitos T ($\beta=1,272$, IC95%=-1,561; 4,106 e p=0,37) e linfócitos B ($\beta=0,003$, IC95%=-0,444; 0,450 e p=0,98).

RESULTADOS

4.4.4 Comparação da inflamação no tecido adiposo perivascular periplaca (TAPp) com tecido adiposo visceral perirrenal (TAPr)

Em relação às diferenças de células inflamatórias entre TAPp e TAPr, o número de macrófagos permaneceu maior no TAPp comparado ao TAPr, conforme o aumento da porcentagem de obstrução, ou seja, quanto maior a obstrução arterial coronariana, maior é a diferença, e, portanto, maior é o número de macrófagos no TAPp ($\beta=5,523$, IC95%= 0,910; 10,136, $p=0,01$). Dados podem ser visualizados na tabela 20.

Tabela 20. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Diferença do Número de Células Inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Modelo Simples			Modelo Multivariado*		
	β	IC de 95%	p^{\S}	β	IC de 95%	p^{\S}
. Macrófagos	4,715	0,895; 8,535	0,01	5,523	0,910; 10,136	0,01
. Linfócitos T	0,418	-1,171; 2,008	0,60	0,621	-1,174; 2,4163	0,49
. Linfócitos B	-0,006	-0,290; 0,277	0,96	-0,013	-0,300; 2732	0,92

IC=intervalo de confiança; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca; TAPr: tecido adiposo perirrenal.

\S Regressão por modelos lineares generalizados entre a porcentagem de obstrução nas artérias coronárias com a diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPr.

* Ajustado para idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, tabagismo e etilismo.

Na presença de placas ateroscleróticas instáveis, a diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPr não foi suficiente para atingir diferença estatística. Resultados podem ser observados na tabela 21.

RESULTADOS

Tabela 21. Associação entre grupo com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis em artérias coronárias, com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B no TAPp e TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Diferença do Número de Células Inflamatórias ($10^{-8}/\mu\text{m}^2$)	Modelo Simples			Modelo Multivariado*		
	B	IC de 95%	p [§]	β	IC de 95%	p [§]
. Macrófagos	171,973	-111,829; 455,776	0,23	455,776	-112,450; 489,233	0,21
. Linfócitos T	-17,534	-118,773; 83,705	0,73	-9,013	-115,241; 97,213	0,86
. Linfócitos B	8,754	-10,300; 27,808	0,36	6,738	-13,227; 26,703	0,50

IC=intervalo de confiança; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivasculoso periplaca; TAPr: tecido adiposo perirrenal.

§ Regressão linear com erros padrões robustos (opção cluster) entre a porcentagem de obstrução nas artérias coronárias em indivíduos com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis, e a diferença do número de células inflamatórias entre TAPp e TAPr.

Grupo placa estável foi a categoria de referência.

* Ajustado para idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, tabagismo e etilismo.

Quando ambas variáveis independentes estão presentes no mesmo modelo, os macrófagos continuam associados. Esta diferença entre TAPp e TAPr mostrou-se independente da composição de placa nos indivíduos ($\beta=5,203$, IC95%= 0,644; 9,763, $p=0,02$). Embora a diferença entre o número de células inflamatórias não foi associada de modo independente com à instabilidade da placa, a presença da mesma influencia no aumento do número de macrófagos no TAPp, pois a interação entre os dois fatores potencializou o aumento da diferença de macrófagos entre TAPp e TAPr ($\beta=12,781$, IC95%= 4,363; 21,200 $p=0,002$). Dessa forma, quando ambas estão presentes, há um aumento do número de macrófagos em TAPp. Dados mostrados na tabela 22:

RESULTADOS

Tabela 22. Associação entre a porcentagem de obstrução das artérias coronárias, e grupos de acordo com a composição de placa, com a diferença do número de macrófagos, linfócitos T e B entre TAPp e TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Diferença do Número de Células Inflamatórias (10 ⁻⁸ /μm ²)	Modelo Simples			Modelo Multivariado*		
	B	IC 95%	p [§]	β	IC 95%	p [§]
Porcentagem de Obstrução						
. Macrófagos	4,375	0,963; 7,788	0,011	5,203	0,644; 9,763	0,02
. Linfócitos T	0,915	-0,586; 2,415	0,23	1,062	-0,605; 2,730	0,21
. Linfócitos B	-0,157	-0,423; 0,110	0,24	-0,129	-0,376; 0,117	0,30
Instabilidade da placa aterosclerótica						
. Macrófagos	30,986	-259,375; 321,346	0,83	29,679	-271,665; 331,024	0,84
. Linfócitos T	-46,869	-146,794; 53,056	0,35	-41,736	-141,160; 57,687	0,41
. Linfócitos B	13,876	-4,801; 32,554	0,14	10,724	-8,117; 29,566	0,26
Interação entre Porcentagem de Obstrução e placas ateroscleróticas instáveis						
. Macrófagos	10,552	3,184; 17,919	0,004	12,781	4,363; 21,200	0,002
. Linfócitos T	0,922	-2,989; 4,833	0,64	0,235	-3,981; 4,450	0,91
. Linfócitos B	-0,357	-1,072; 0,357	0,32	-0,221	-0,810; 0,367	0,46

IC=intervalo de confiança; TAPp: tecido adiposo epicárdico perivasculare peri-placa; TAPr: tecido adiposo perirrenal.

§ Regressão por modelos lineares generalizados entre a porcentagem de obstrução nas artérias coronárias, grupos com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis e o número de células inflamatórias no TAPp e TAPr. Grupo placa estável foi a categoria de referência.

* Ajustado para idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, tabagismo e etilismo.

RESULTADOS

4.5 Resumo dos resultados

O resumo dos resultados pode ser observado na tabela 23.

Tabela 23. Resumo dos resultados do estudo entre as associações das células inflamatórias com a porcentagem de obstrução, grupos com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis e interação entre ambas no TAPp com TAPaa, TAS e TAPr (n=246 fragmentos), São Paulo, 2013-2015.

Tecidos	Porcentagem de obstrução arterial	Composição de placa (estáveis e instáveis)	Análise de interação
			Interação entre porcentagem de obstrução arterial
Análise TAPp			
. <i>Macrófagos</i>	Presente *	Ausente	Ausente
. <i>Linfócitos T</i>	Ausente	Ausente	Ausente
. <i>Linfócitos B</i>	Presente *	Presente *	Ausente
Diferença entre TAPp (proximal) e TAPaa (distal)			
. <i>Macrófagos</i>	Presente *	Ausente	Ausente
. <i>Linfócitos T</i>	Ausente	Ausente	Ausente
. <i>Linfócitos B</i>	Presente *	Presente *	Ausente
Diferença entre TAPp e TAS			
. <i>Macrófagos</i>	Presente *	Ausente	Ausente
. <i>Linfócitos T</i>	Presente *	Ausente	Ausente
. <i>Linfócitos B</i>	Ausente	Ausente	Ausente
Diferença entre TAPp e TAPr			
. <i>Macrófagos</i>	Presente *	Ausente	Presente *
. <i>Linfócitos T</i>	Ausente	Ausente	Ausente
. <i>Linfócitos B</i>	Ausente	Ausente	Ausente

TAPp: tecido adiposo epicárdico perivascular peri-placa (proximal); TAPaa: tecido adiposo epicárdico perivascular com ausência de aterosclerose (distal); TAS: tecido adiposo subcutâneo; TAPr: tecido adiposo perirrenal.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi encontrado uma correlação entre o aumento do número de macrófagos e linfócitos B no TAPp com o aumento da porcentagem de obstrução em artérias coronárias. Adicionalmente, houve aumento do número de linfócitos B na presença de placas ateroscleróticas instáveis. Macrófagos e linfócitos B foram maiores no TAPp com o aumento da obstrução arterial, e linfócitos B aumentaram na presença de placas instáveis no TAPp, em relação ao TAPaa (distal). Estas associações foram restritas à área adjacente à placa aterosclerótica comparado com outros sítios de tecidos adiposos, independente dos fatores de confusão. Embora os linfócitos T não tenham se associado à porcentagem de obstrução ou com placas ateroscleróticas instáveis no TAPp, foram presentes em maior número no TAPp quando comparado ao TAS, com o aumento da porcentagem de obstrução arterial. O número de macrófagos também aumentou no TAPp com o aumento da porcentagem de obstrução arterial coronariana comparado com TAPr de modo independente. Além disso, observamos interação entre a presença de placa instável e porcentagem de obstrução arterial em relação ao número de macrófagos no TAPp.

5.1 Casuística

O tamanho de amostra foi superior quando comparado à maior parte dos estudos prévios⁶²⁻⁶⁷. Em relação às características desta amostra comparado com estudos prévios, a maior parte dos estudos também apresentou um predomínio de indivíduos idosos, com exceção de Tavora et al.⁶⁹ e Kralova et al.⁷⁰ que tiveram uma maior prevalência de indivíduos de meia idade. Os estudos prévios apresentaram um predomínio do sexo masculino, e nossa casuística foi igualmente dividida. Em relação à cor dos participantes, a grande parte dos estudos avaliaram indivíduos amarelos⁶³⁻⁶⁵ ou brancos⁶⁶, brancos e pretos⁶⁹ e alguns não reportam esta informação^{62,70,67}, o que mostra há poucos estudos multiétnicos entre inflamação no TAP e aterosclerose. Alguns estudos tiveram alta prevalência de obesidade^{62,69}, e alguns destes indivíduos apresentavam obesidade mórbida⁶². A obesidade está associada tanto para disfunção no tecido adiposo⁴³, quanto à doença arterial coronariana⁴⁹. Em relação à presença de

HAS, diabetes mellitus e dislipidemia, as prevalências foram semelhantes quando comparadas com este estudo. Em nosso estudo, houve coleta da informação sobre tabagismo, que está associado com aumento de inflamação no TAP⁶⁰, e, portanto, foi ajustado nas análises. Alguns estudos coletaram informação sobre tabagismo^{62,66,69}, mas não ajustaram nas análises, e um estudo considerou como critério de exclusão⁶⁷. Em nenhum estudo foi mencionado quanto ao consumo de álcool, que está associado com DAC^{83,84} e a inflamação no tecido adiposo, com aumento de TNF- α e IL6, aumento da quantidade de tecido adiposo visceral, diminuição do tecido adiposo subcutâneo e aumento da resistência à insulina⁸⁵.

5.2 Inflamação no TAPp

Os macrófagos quantificados no TAPp aumentaram com o aumento da porcentagem de obstrução arterial da placa aterosclerótica. Este dado corrobora com outros estudos que investigaram macrófagos tanto no TAE^{62,64,65}, quanto no TAP após procedimento cirúrgico⁷⁰, e no TAP em estudos *post mortem*^{63,69}. Todos estes estudos compararam o grupo com DAC com grupo controle (DAC-). Os resultados do nosso estudo também estão de acordo com um estudo *post mortem*⁶⁶, que investigou a correlação entre o tamanho da placa com o número de macrófagos. No entanto, neste estudo, todas as associações foram independentes de fatores de confusão e corrigidos para medidas repetidas no mesmo indivíduo, que não foram feitos em estudos anteriores.

Estudos no TAE⁶⁵ identificaram que os macrófagos estão alternativamente ativados para M1 ou M2, sendo que macrófagos M1 (pró-inflamatório) são presentes em maior número e proporção do que os macrófagos M2 (ação anti-inflamatória) na presença de aterosclerose. Na presença de obesidade, observou-se macrófagos M1 tanto em estudos em humanos com resistência à insulina^{86,87}, quanto em ratos com obesidade induzida por dieta em modelos experimentais⁵². Entretanto, estudos em humanos *post mortem* sobre a associação entre macrófagos polarizados no TAPp e aterosclerose são necessários.

Os linfócitos T, corados com CD3 (pan-linfócitos T⁸⁸), foram observados no TAPp neste estudo, embora não tenhamos encontrado diferença entre o número com o aumento da porcentagem de obstrução arterial e presença de placas ateroscleróticas instáveis no TAPp. Estudos prévios encontraram linfócitos T em pacientes com DAC^{62,67}. Mazurek et al.⁶² encontraram linfócitos T, corados com CD3, infiltrados no TAE de pacientes submetidos à revascularização do miocárdio, avaliados de forma qualitativa. Além disso a infiltração de linfócitos T foi encontrada próximo de vasos sanguíneos ou circulantes nos mesmos, diferentemente deste estudo, que encontrou infiltrados entre os adipócitos com análise quantitativa, permitindo a comparação entre os tecidos de forma mais efetiva. Grosso et al.⁶⁷, com uma casuística semelhante ao estudo anterior (material proveniente de cirurgia), encontraram os mesmos achados, porém os resultados foram avaliados com objetivo de identificar a diferença dessas células entre pacientes sob efeito de medicamentos em relação à inflamação no plasma e no TAE, diferentemente deste estudo. A amostra do estudo de Mazurek et al.⁶² eram de indivíduos obesos, embora os autores relatem que IMC não se associou com a inflamação com o TAE na análise univariada. Entretanto, a inflamação parece estar associada com a obesidade, que leva a um aumento de linfócitos T por proliferação e recrutamento. A proliferação de linfócitos T está relacionada com a liberação de leptina e a quimiocina RANTES (Regulada por Ativação Expressa e Secretada por Linfócitos T Normais), que recrutam leucócitos para locais com inflamação⁸⁹. Além disso, foi demonstrado por estudos experimentais que as células T estão presentes em maior quantidade em ratos obesos do que ratos magros, formando *clusters* com outros subtipos de células T e macrófagos, formando *crown-like structures* ao redor dos adipócitos⁵³. Finalmente, a amostra foi muito reduzida para a análise (n=11) do estudo do Mazurek et al.⁶², e não houve ajuste para fatores de confusão.

Outros estudos prévios investigaram a associação entre diferentes tipos de linfócitos T e DAC. Hirata et al.⁶⁴, examinaram linfócitos T e os subtipos CD4⁺ e CD8⁺, em indivíduos com DAC e em controles. Foi encontrado maior número de linfócitos CD8⁺ em ambos grupos. Os linfócitos CD8⁺ foram encontrados em menor número, em relação aos linfócitos CD4⁺ na placa aterosclerótica³³, o que

demonstra que a não detecção de CD4⁺ associada à aterosclerose deve ser mais amplamente investigada. Alguns estudos experimentais com o desenvolvimento de placas ateroscleróticas vulneráveis, através de indução de apoptose, formação de núcleo necróticos e formação de capa fibrosa fina, sugerem que a atuação dos linfócitos CD8⁺ é pró-aterogênica⁹⁰. No entanto, outros estudos reportam que sua atuação pode ser ateroprotetora, com uma atuação supressora de linfócitos T⁹¹. Em ratos os subtipos de células T foram detectados no tecido adiposo e associados com a obesidade, sendo que a citocina IFN- γ , assinatura do subtipo Th1, pode promover a inflamação neste tecido⁵³. O marcador utilizado em nosso estudo não detecta entre estes e mais outros subtipos⁸⁸, portanto não permite uma comparação direta com estes estudos prévios. A análise dos subtipos não foi realizada neste estudo e é fundamental para o esclarecimento da associação entre linfócitos T no TAPP e aterosclerose em humanos.

Os linfócitos B aumentaram com o aumento da porcentagem de obstrução arterial, e foram específicos para placas ateroscleróticas instáveis. Em placas ateroscleróticas os linfócitos B CD20 (anticorpo utilizado neste estudo) tem possível atuação pró-aterogênica em placas ateroscleróticas avançadas com manifestações de complicações clínicas³³. Grosso et al.⁶⁷, os detectaram no TAE⁶⁷ em indivíduos submetidos à cirurgia, porém sob efeito medicamentoso, que foi seu desfecho. Os linfócitos B foram detectados em forma de *clusters* próximos aos vasos sanguíneos no TAE. *Cluster* é uma estrutura linfoide denominada como *FALCs (fat-associated lymphoid cluster)*, associada a tecidos adiposos, descrita inicialmente no tecido adiposo mesentérico⁹². A sinvastatina aumentou o número de linfócitos B e o uso de pioglitazona isolado ou combinado com sinvastatina diminuiu os níveis de células inflamatórias no tecido e de citocinas no plasma. Quanto às limitações metodológicas, as comparações não foram ajustadas para os níveis celulares e de citocinas no *baseline*. Neste estudo, áreas com aglomerados celulares foram evitadas, pois o número de linfócitos B nos clusters era muito discrepante das células livres encontradas no tecido.

Não foram encontrados outros estudos de linfócitos B em TAE relacionados com DAC em seres humanos, além do estudo de Grosso et al.⁶⁷, em 2014, e ainda não foram descritos em TAP relacionados com DAC até este momento. No tecido adiposo visceral abdominal, como o omento, já foram relatados⁵⁴. No tecido adiposo tanto em ratos, como em humanos os linfócitos B presentes são compostos principalmente pelo subtipo B1, que respondem a agentes patógenos mais rapidamente do que o subtipo B2. Adicionalmente, as células B1 podem expressar anticorpos que reagem às OxLDL⁸⁹. Em relação à aterosclerose seu papel ainda é controverso, mas acredita-se que as células B2 sejam pró-aterogênicas e as B1 atenuem o processo aterogênico. Além disso, as células B2 são a maioria na placa aterosclerótica^{33,37,42}. Os linfócitos B, em conjunto com alguns linfócitos T, macrófagos e células dendríticas também foram descritos na aterosclerose, estas células podem se agrupar em centros nodulares na camada adventícia, e o número de células em proliferação aumentou de acordo com o tamanho destes centros nodulares⁹³.

O tecido adiposo perivascular coronariano se infiltra na camada adventícia, podendo influenciar diretamente a inflamação na artéria coronária^{61,69}. O *vasa vasorum* intercala estruturalmente com o TAP^{59,94}, e também pode ser um grande elo entre a inflamação no TAP e a aterosclerose. Esta interação complexa pode ter impacto na aterosclerose, como em outras doenças vasculares comum, como hipertensão arterial⁴², através de transmissão de mediadores inflamatórios do TAP à vasculatura interior⁹⁴. Quando há um espessamento na camada íntima, o *vasa vasorum* se desenvolve em direção à camada íntima²⁶, podendo contribuir para o recrutamento de linfócitos na camada adventícia⁴², que pode auxiliar na instabilização da placa aterosclerótica²⁸. Estudos experimentais relatam a possibilidade do *vasa vasorum* estar presente antes do espessamento da camada íntima. A infiltração de células inflamatórias na camada adventícia pode preceder esta angiogênese. O TAPp parece exercer o papel através pela estimulação da inflamação e fatores de crescimento angiogênicos⁹⁵. Na camada adventícia, os linfócitos B^{69,96} e linfócitos T^{33,69}, além de serem predominantes, foram associados com placas instáveis em estudos prévios^{69,96}. O TAPp, através do contato direto com a camada adventícia^{61,69}, e o *vasa vasorum* no auxílio do recrutamento de

linfócitos⁴², e com a comunicação da camada média com a média e íntima, na presença de aterosclerose²⁶, podem permitir uma difusão da inflamação para a parede da artéria coronária.

5.3 Inflamação no TAPp em relação TAPaa

O tecido adiposo epicárdico perivascular foi comparado em duas áreas distintas no tecido adiposo cardíaco, uma proximal à placa aterosclerótica mais relevante clinicamente dentre todas as artérias coronárias e outra distal, com ausência de placas ateroscleróticas, no mesmo indivíduo. Estudos prévios^{66,70}, delimitaram a área proximal e distal em relação ao óstio da artéria coronária e não à presença de placas ateroscleróticas. Estes estudos mostraram que há diferenças entre o tamanho da LLEI⁶⁶, lúmen⁶⁶, área da placa⁶⁶ e área da parede da artéria coronária DA proximal e distal entre grupos⁷⁰, e não houve diferenças para a estenose do lúmen⁶⁶. No entanto, estas diferenças podem ser secundárias à diminuição do calibre dos vasos ao longo do trajeto. Encontramos diferenças na porcentagem de obstrução arterial proximal e distal nos grupos, e no mesmo indivíduo. O cálculo de porcentagem de obstrução arterial neste estudo considera a diferença da área da LLEI com o lúmen, dividida pela área da LLEI⁸⁰. Dessa forma, o cálculo de porcentagem de obstrução arterial é corrigido pela área da LLEI, e deste modo, é possível realizar a comparação direta entre as duas regiões sem haja interferência do calibre da artéria.

Mostramos que a associação de macrófagos e linfócitos B com aterosclerose foi restrita e adjacente à placa aterosclerótica. Estudo prévio de Verhagem et al.⁶⁶, mostraram que o número de macrófagos em TAP esteve associado com a área do lúmen e razão da placa/média, ajustadas para o local, o que corrobora os nossos resultados. Entretanto, diferentemente do nosso estudo não houve associação de macrófagos com a área da placa (medida mais semelhante à obstrução arterial). Kralova et al.⁷⁰, não encontraram diferenças entre o número de macrófagos no TAP proximal e distal entre os grupos, mas encontrou para diferença entre o número de macrófagos na parede da artéria coronária proximal em relação à distal entre pacientes com DAC. Houve aumento de macrófagos nas artérias coronárias proximal e distal e no TAP no grupo com

DAC. O mesmo não ocorreu no grupo controle, o que evidencia que a inflamação no TAP tem correlação com a aterosclerose. Estudo de Távora et al.⁶⁹, parece ter encontrado o mesmo achado, porém não foram analisados de forma quantitativa comparadas com o mesmo indivíduo.

Nossos resultados corroboram com os estudos de imagem, pois encontraram maior densidade de TAP ao redor de lesões instáveis em indivíduos com SCA^{63,97}. Desta forma, as diferenças entre os resultados dos estudos de autópsia prévios e os resultados deste estudo parecem estar relacionadas ao fato de que quantificamos a inflamação em regiões proximais e distais em relação à placa de ateroma e não pelo trajeto das artérias coronárias.

5.4 Inflamação no TAPp em relação TAS e TAPr

O TAS abdominal, diferentemente do tecido adiposo visceral, não foi associado com fatores de risco como obesidade e triglicérides elevados em estudos prévios⁹⁸. Entretanto, o aumento de tecido adiposo visceral em relação ao subcutâneo foi associado com DCV⁹⁹. Estudos prévios compararam a inflamação no TAS entre grupos com DAC (com placas ateroscleróticas estáveis) e grupo controle. Não foram encontradas diferenças entre macrófagos^{62,64,65}, macrófagos polarizados⁶⁵, células T de modo geral (CD3)⁶², e seus subtipos CD4⁺ ou CD8⁺⁶⁴ no TAS entre grupos com DAC e grupo controle (ausência de DAC). Comparações de inflamação no TAPp e TAS entre indivíduos com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis com material de autópsia em humanos ainda não foram realizadas. Dessa forma, comparamos se as diferenças das células inflamatórias nos tecidos descritos estão associadas com a aterosclerose. O número de macrófagos foi maior no TAPp em relação ao TAS, com o aumento da porcentagem de obstrução arterial. Os linfócitos T, embora não tenham aumentado de acordo com a obstrução arterial ou instabilidade de placa no TAPp, foram observados em maior número no TAPp em relação ao TAS de acordo com o aumento da porcentagem de obstrução arterial. Isso demonstra que os linfócitos T exercem um papel em conjunto com os macrófagos no TAPp, uma vez que respectivamente representam as duas maiores populações nas placas ateroscleróticas¹⁰⁰. A porcentagem de obstrução arterial e a presença de

placas ateroscleróticas instáveis não influenciou na diferença entre os linfócitos B entre os dois sítios de tecido adiposo.

O TAPr é o tecido adiposo menos estudado em comparação com o TAP, TAE ou TAS. O TAPr tem despertado grande interesse recentemente por conter tecido adiposo marrom. No entanto, os adipócitos brancos são maioria e há evidências que este tecido possui uma grande plasticidade no espectro de tecido adiposo branco-marrom¹⁰¹. O tecido adiposo marrom já foi descrito parece ser resistente à infiltração de macrófagos em condições de obesidade por indução de dieta rica em gordura¹⁰². Isto pode explicar os resultados encontrados de que os macrófagos foram encontrados em maior número no TAPp em relação ao TAPr de acordo com a porcentagem de obstrução arterial, e ainda, na interação entre a presença de placas ateroscleróticas instáveis e porcentagem de obstrução arterial. A porcentagem de obstrução arterial e presença de placas ateroscleróticas instáveis não influenciou na diferença do número de linfócitos T e B no TAPp e TAPr.

O TAP em condições sem aterosclerose, tanto em cultura de células humanas, quanto em ratos, apresenta características morfológicas distintas do TAS e do TAPr. O TAP é composto por adipócitos menores e mais irregulares. Além disso apresenta um estado pró-inflamatório elevado, com maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL8 e IL6), principalmente de MCP-1, que é responsável pelo recrutamento de macrófagos, que pode ser encontrado de 10 a 40 vezes em relação ao TAS e TAPr⁶¹. Isto pode explicar o aumento de macrófagos em TAP em relação ao TAS e TAPr neste estudo. Contudo, mostramos que há maior inflamação no TAPp em relação ao TAPaa. Este fenótipo pró-inflamatório parece acontecer em TAP peri-coronária e peri-aórtica¹⁰³, pois estudos com humanos com TAP em artérias tibiais/poplíteas tiveram níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α , MCP-1) menores do que TAS, coletados em membros inferiores¹⁰⁴. Finalmente, por estes motivos, sugere-se que o TAP pericoronária pode desempenhar um papel em induzir a inflamação na camada adventícia da artéria coronária⁶¹. Este achado explica parcialmente os resultados encontrados, pois mostramos que na presença de aterosclerose a presença de macrófagos no TAPp é maior do que no TAP distal com ausência

de aterosclerose, no TAS e TAPr. Contudo, o mecanismo que leva o TAPp ter maior inflamação adjacente à placa aterosclerótica ainda precisa ser elucidado.

5.5 Inflamação no TAP e aterosclerose: perspectivas

A aterosclerose requer a ativação do endotélio vascular¹⁰⁵, que desencadeia uma resposta inflamatória principalmente por macrófagos e linfócitos T^{31,32}. Mais recentemente há evidências de que os linfócitos B também fazem parte deste processo³⁷. O TAE tem sido alvo de investigação pela fácil mensuração de seu volume e espessura e tem sido associado com aumento da adiposidade, síndrome metabólica, resistência à insulina e gravidade de DAC^{106,56}. Os resultados deste estudo sugerem que a inflamação no TAPp pode ser associada à gravidade da DAC e à instabilidade de placas ateroscleróticas, devido à esta inflamação ser restrita ao TAE adjacente à placa aterosclerótica. Dessa forma, os resultados sugerem que a inflamação no TAP pode contribuir para a desestabilização da placa aterosclerótica.

Estas evidências podem ter uma grande aplicabilidade clínica com tratamentos que objetivam atenuar esta inflamação e com isso estabilizar a progressão da aterosclerose. As estatinas têm sido reportadas como um potencial imunossupressor, com demonstração de bloqueio específico da integrina β -2 (receptores das moléculas de adesão) e do antígeno associado a função leucocitária-1, um co-estimulador das células T, que é expresso na superfície dos leucócitos, e quando ativados ligam-se às moléculas de adesão. Este bloqueio beneficia tanto indivíduos com DAC, quanto indivíduos submetidos a transplante cardíaco¹⁰⁷. Além disso, no ensaio clínico randomizado, duplo-cego e multicêntrico JUPITER, homens com idade maior do que 50 anos e mulheres acima dos 60 anos aparentemente saudáveis com proteína C reativa elevada foram randomizados para receber rosuvastatina 20mg ou placebo. Depois de dois anos o estudo foi interrompido pelo grande benefício de pacientes tratados com rosuvastatina, com taxas significativamente reduzidas de um primeiro evento cardiovascular e morte por qualquer causa entre os participantes que receberam rosuvastatina¹⁰⁸. O benefício da estatina parece ser maior em pessoas que apresentam alto risco genético para desenvolvimento de DAC¹⁰⁹.

Na abordagem anti-inflamatória e imunossupressora, os corticoides foram considerados como uma possível terapêutica, no entanto, além dos inúmeros efeitos colaterais, foram pró-aterogênicos¹¹⁰ e aumentaram a incidência de infarto agudo do miocárdio em um estudo de coorte¹¹¹. O metotrexato, imunossupressor utilizado em doenças autoimunes e câncer, está sendo investigado pelo ensaio clínico *Cardiovascular Inflammation Reduction Trial - Inflammation Imaging Study* (CIRT) para verificar se doses baixas de metotrexato reduz morbidade e mortalidade por DCV entre pacientes com infarto do miocárdio prévio ou pacientes multiarteriais comprovados por angiografia¹¹². O estudo encontra-se na terceira fase, com conclusão prevista para 2019. Ensaio clínico com drogas que bloqueiam interleucinas também estão em curso, como o *Cardiovascular Risk Reduction Study (Reduction in Recurrent Major CV Disease Events) – CANTOS*, que está em curso e tem o objetivo principal de verificar se o medicamento canakinumab previne eventos cardiovasculares em indivíduos que tiveram infarto do miocárdio pelo menos um mês antes do estudo, ou com proteína C reativa elevada¹¹³. Por outro lado, o ensaio clínico que investigou o bloqueio da lipoproteína associada à fosfolipase A2, que produz mediadores pró-inflamatórios e apoptóticos associadas principalmente à placas ateroscleróticas vulneráveis, não reduziu óbitos cardiovasculares, AVC e infarto do miocárdio¹¹⁴.

A vacina contra a aterosclerose pode ser uma outra abordagem terapêutica, porém o desafio é identificar antígenos específicos e relevantes na aterogênese. A maioria dos estudos em busca de antígenos potenciais estão em estágios experimentais pré-clínicos. Em estudos com animais, a imunização contra *P. gingivalis* (bactéria periodontal) atenua aterosclerose induzida pelo agente patogênico. Entretanto, há muitos antígenos endógenos potenciais como por exemplo o LDL oxidado, que em animais reduziu a aterosclerose; e as HSPs que têm achados divergentes, visto que algumas imunizações induziram a aterosclerose, enquanto outras reduziram lesões ateroscleróticas¹¹⁵.

5.6 Limitações do estudo

Devido à natureza do estudo *post mortem*, que é observacional de corte transversal, não é possível estabelecer relações de causalidade entre as variáveis dependentes e independentes. Além disso, a falta de seguimento dos participantes não permitiu realizar a coleta de dados das características clínicas antes do óbito. A busca ativa através de prontuários não foi considerada uma alternativa, devido à descentralização do sistema de saúde e pelo fato de que estes dados não foram coletados de modo uniforme e sistematizado para fins de estudo. Contudo, os critérios de inclusão e exclusão para este estudo foram exigentes, principalmente no que se refere ao informante apto a responder a entrevista clínica e semiestruturada.

Os dados referentes às medicações de uso contínuo não foram ajustados nestas análises, devido ao fato de que muitos dos participantes deste estudo eram independentes, e com isso, muitos familiares não souberam referir medicamentos de uso contínuo, salvo àqueles que faziam tratamentos específicos em que os familiares participavam do acompanhamento (corticoesteroides e imunossupressores), que foi diferente nos estudos com acesso à material cirúrgico^{62,64,65,67}. Contudo, estes estudos apenas realizaram a comparação entre estes os grupos de interesse e controles, e mesmo quando havia diferença estatística, os dados não foram ajustados.

A composição de nossa amostra é de conveniência, entretanto não fez parte de nossos objetivos estimar a prevalência de placas ateroscleróticas estáveis e instáveis em artérias coronárias na nossa amostra. A amostra de conveniência não inviabiliza investigar a associação entre aterosclerose e inflamação no TAP, que foi o objetivo deste estudo.

Não foi possível avaliar se o processo inflamatório associado à porcentagem de obstrução arterial e às placas instáveis é pró-inflamatório ou anti-inflamatório, pois a polarização das células ou identificação das citocinas inflamatórias não foi realizada. Estudos futuros serão realizados pela aluna Daniela para avaliar essa questão.

É importante ressaltar de que não pode ser descartado um processo inflamatório sistêmico desencadeado pelo estado agonal. No entanto, casos com sinais de sepse foram excluídos, assim como participantes com doenças inflamatórias cardíacas e sistêmicas. Além disso, células inflamatórias dentro das artérias coronárias não foram quantificadas.

5.7 Pontos fortes do estudo

O acesso ao coração como um todo permitiu a análise de todas as artérias coronárias e a coleta do TAE perivascular adjacente à placa aterosclerótica mais relevante clinicamente, escolhida após a análise macro e microscópica de todas as lesões ateroscleróticas. A padronização do método foi aprimorada para que a artéria coronária fosse totalmente aberta para a mensuração da porcentagem de obstrução e a técnica de imunistoquímica fosse eficaz sem que houvesse artefatos ou viés por não coração das células.

As variáveis de interesse, aterosclerose e inflamação nos diversos tecidos adiposos, foram avaliadas por métodos morfométricos e quantitativos, com medidas diretas no tecido.

Ainda em relação às variáveis de interesse, a medida das células inflamatórias teve uma representatividade maior pela análise através de 20 campos com 600 μm de diâmetro. Estudos prévios utilizaram diferentes métodos: dez imagens capturadas com aumento de 400x^{63,66}, três campos com 200 μm de diâmetro^{64,65}, cinco ou mais campos com 40x de aumento e posteriormente categorizados em escore de zero a quatro⁶⁹, quantificação de macrófagos através de grade estereológica⁷⁰, e em três campos com aumento de 20x (centro do TAE, borda e dentro de vasos) e em um não foi referido⁶². Neste estudo, houve cegamento para fragmento, tipo de tecido adiposo e localização das células, exceto para aglomerados que foram evitados, e não houve variabilidade inter observador.

A validade de critério preditivo da entrevista clínica foi testada e apresentou boa especificidade e sensibilidade¹¹⁶. Além disso, a maior parte de nossa amostra apresentava convívio diário, o que demonstra uma boa confiabilidade dos dados. Diferentemente de outros estudos *post mortem*^{63,66,69,70}, avaliamos fatores de risco cardiovasculares e sociodemográficos. O acesso às variáveis clínicas, mesmo que pelo informante, nos permitiu que realizássemos a análises de regressões multivariadas ajustadas para os fatores de confusão, que não haviam sido realizadas até o momento.

Um estudo de coorte com acompanhamento dos indivíduos com posterior acesso ao material de autópsia seria o cenário ideal para evitar as limitações já citadas, como o acesso ao material por procedimento cirúrgico.

5.8 Divulgação científica

Os dados preliminares deste estudo foram apresentados em formato de pôster (ANEXO VI) no congresso da *American Heart Association, Scientific Sessions* em novembro de 2015. O resumo foi publicado na revista *Circulation*¹¹⁷.

Foi confeccionado um artigo científico com os resultados de toda a padronização do método criado para este estudo. O artigo foi submetido e aceito na revista *Journal of Medical Internet Research: JMIR – Research Protocols*, com fator de impacto de 4,53. Encontra-se em atual edição¹¹⁸.

Além disso, estamos confeccionando os artigos científicos para os resultados principais e mais outros a partir dos dados coletados.

6 CONCLUSÃO

A doença arterial coronariana está associada com a inflamação no tecido adiposo epicárdico perivascular adjacente à placa aterosclerótica nas artérias coronárias.

Os macrófagos e linfócitos B no tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca aumentaram de acordo com o aumento da porcentagem de obstrução. O aumento do número de linfócitos B foi associado às lesões instáveis. Todos os achados foram independentes de possíveis fatores de confusão.

A associação do número de células inflamatórias com a porcentagem de obstrução e placas ateroscleróticas instáveis foi maior na área adjacente à placa aterosclerótica em relação ao tecido adiposo epicárdico perivascular distal com ausência de aterosclerose. O número de macrófagos e linfócitos T no tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca foi maior em relação ao tecido adiposo subcutâneo. Finalmente, houve também aumento de macrófagos no tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca em relação ao tecido adiposo perirrenal, do qual a interação entre porcentagem de obstrução arterial e a instabilidade da placa contribuiu para potencializar este aumento de macrófagos no tecido adiposo perivascular periplaca.

Dessa forma, a inflamação no tecido adiposo epicárdico perivascular periplaca parece estar associada a maior porcentagem de obstrução da placa de ateroma e esta inflamação pode contribuir para a desestabilização da placa aterosclerótica.

ANEXOS**ANEXO I. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo****APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **12/12/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **439/12** intitulado: **"ASSOCIAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO DO TECIDO ADIPOSITO EPICÁRDICO E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA: UM ESTUDO CLINICOPATOLÓGICO"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao **CEP-FMUSP**, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Claudia Kimie Suemoto

Pesquisador (a) Executante: Daniela Souza Farias

CEP-FMUSP, 19 de Dezembro de 2012.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Cardiovascular

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°:.....SEXO: M () F () DATA DE NASCIMENTO:...../...../.....
 ENDEREÇO:..... N°: APTO:
 BAIRRO:.....CIDADE:.....
 CEP:TELEFONE: DDD (.....).....
 RESPONSÁVEL LEGAL:
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°:.....SEXO: M () F () DATA DE NASCIMENTO:...../...../.....
 ENDEREÇO:.....N°: APTO:.....
 BAIRRO:.....CIDADE:
 CEP:TELEFONE: DDD (.....).....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **CORRELAÇÃO ENTRE GORDURA VISCERAL ABDOMINAL E TORÁCICA COM O GRAU DE ATEROSCLEROSE SISTÊMICA.**

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci

CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor do Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo e Diretor do Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo.

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL N°: 26.475 UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Patologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO (X) RISCO MÍNIMO () RISCO BAIXO ()
 RISCO MÉDIO () RISCO MAIOR ()

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Muito obrigado por sua atenção.

Estamos realizando uma pesquisa que visa avaliar a associação entre o acúmulo de gordura em vários lugares do corpo e a obstrução dos vasos. Este estudo permitirá identificar os indivíduos com maior risco de obstrução dos vasos que está associada a infartos e derrames. Novos tratamentos para as doenças só são descobertos fazendo estudos como este.

Este estudo ocorrerá da seguinte maneira:

O (a) Senhor (a) será entrevistado por um enfermeiro (a) a respeito do estado de saúde do seu parente que faleceu. O Sr(a) deverá fornecer o contato de uma pessoa que morava com o falecido e fazia pelo menos 2 refeições diárias com ele nos últimos doze meses. Essa pessoa será contatada por telefone por um pesquisador da equipe, que fará uma entrevista a respeito dos hábitos alimentares do falecido.

Não será feito nada a mais que o procedimento normal da autópsia e o corpo não será mutilado, ou seja, o corpo é liberado para a família devidamente vestido, sem apresentar sinal visível de que a autópsia tenha sido realizada. Durante a autópsia, serão retirados fragmentos do coração, do cérebro e da gordura dos órgãos. Esses fragmentos serão analisados com bastante cuidado e armazenados para estudos futuros. Os resultados serão comparados com as respostas que o (a) senhor (a) respondeu.

Não há benefício direto para o (a) senhor (a). Com sua colaboração, poderemos saber se existia obstrução dos vasos de seu familiar que pudessem ser responsáveis por provocar doenças. Os resultados que conseguiremos poderão ajudar na prevenção de doenças do coração e dos vasos em muitas pessoas e com isso beneficiará a população em geral.

Não há nenhum risco neste estudo e, além disso, este não atrasará a realização da autópsia.

IV- ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Qualquer dúvida que o (a) senhor (a) tenha será esclarecida pelo próprio médico responsável pelo trabalho e os resultados estarão disponíveis somente a (o) senhor (a). Se a (o) senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 1º andar – tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004 – Email: cep.fmusp@hcnet.usp.br.

A qualquer momento, se for sua vontade, o seu familiar poderá ser retirado da pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade da autópsia e todas as informações obtidas serão sigilosas. O (a) senhor (a) terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados da pesquisa. Não há despesas pessoais para o (a) senhor (a) em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO

O principal investigador é o Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Arnaldo 455, Laboratório de Patologia Cardiovascular, Sala 1212, 1º andar, Jardim América - São Paulo, SP, telefone: (011) 3061-3105.

VI. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador, ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

São Paulo, _____ de _____ de 201 ____ . Horário do término: _____

Data ____/____/____

Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Para casos de representantes legais analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do representante legal para a participação neste estudo.

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO III. Termo de Outorga do Auxílio Regular à Pesquisa concedida pela agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP)



Para uso exclusivo da FAPESP
Processo: 2013/00335-2
Data Impressão: 12/04/2013 15:41:31
Folha: _____
Volume: _____
Rubrica: _____

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS

PROCESSO 2013/00335-2

<p>Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.</p>	
1.OUTORGADO:	<p>Claudia Kimie Suemoto CPF: 271.656.768-99 RG: 249958612-SSP/SP</p>
2.Correspondência:	<p>Rua Ministro Godoi, 171 - apto 131, Perdizes, São Paulo/SP, CEP 05015-000 cksuemoto@usp.br</p>
3.Instituição Sede:	<p>Faculdade de Medicina/FM Universidade de São Paulo/USP</p>
4.Projeto de Pesquisa:	<p>ASSOCIAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO NO TECIDO ADIPOSEO EPICÁRDICO E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA:UM ESTUDO CLINICOPATOLOGICO</p>
5.Linha de Fomento:	<p>Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular</p>
6.Área/Subárea:	<p>Medicina Outra Subárea Medicina</p>
7.Coordenação:	<p>Saúde I</p>
8.Período da Vigência:	<p>01/05/2013 a 30/04/2015</p>
9.Relatórios Científicos:	<p>30/04/2014, 30/05/2015</p>
10.Prestações de Contas:	<p>30/04/2014, 30/05/2015</p>

ANEXO IV. Termo de Outorga da bolsa de mestrado, fluxo contínuo, da aluna Daniela

FAPESP

Processo: 2013/12290-3
 Data impressão: 02/12/2013 13:39:37
 Folha: _____
 Volume: _____
 Rubrica: _____

Termo de Outorga Processo 2013/12290-3

O Conselho Técnico-Administrativo da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, doravante denominada OUTORGANTE , usando das atribuições que lhe confere o Artigo 14, letra "b" da lei Estadual no 5.918, de 18 de outubro de 1960, e de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que são parte integrante desde Termo, concede:	
OUTORGADO	Daniela Souza Farias CPF: 369.463.498-30
Orientador/Supervisor	Claudia Kimie Suemoto CPF: 271.656.768-99
Instituição	Faculdade de Medicina/FM/USP
Linha de Fomento	Programas Regulares / Bolsas / No País / Mestrado
Projeto	ASSOCIAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO NO TECIDO ADIPOSEO EPICÁRDICO E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA: UM ESTUDO CLINICOPATOLÓGICO
Área	Medicina
Grande Área	Ciências da Saúde
Sub-área	Outra Subárea Medicina
Vigência	01/10/2013 a 30/09/2015
Relatórios Científicos até	10/09/2014, 10/10/2015
Ata de Defesa até	15/01/2016
Prestação de Contas até	10/09/2014, 10/10/2015
Observações	
- Concessão improrrogável.	

ANEXO V. Entrevista Clínica Semiestruturada do Laboratório de Fisiopatologia no Envelhecimento

ENTREVISTA CLÍNICA

NPROT

NSVO

Data da necropsia: ___/___/___

Nome: _____ Idade: ___/___/___ DN: ___/___/___

Sexo: _____ Raça: B N P A Natural: _____ Proced: _____ Estado Civil: S C V A D Filhos: _____Escolaridade: _____ anos (A <4a <8a <12a >15a) _____ Destro CanhotoProfissão: do lar doméstica outros _____Situação: Ainda trabalhava Aposentado _____ a Ap por invalidez _____ a Outro _____

Informante

 Parentesco: _____ Freq com o pte: D S M _____ Cuidador primário: sim não NA Escolaridade do Informante: _____ Com quem residia: _____

Causa do Óbito:

Como ocorreu o óbito: em casa no hospital: _____

HPMA:

AP: Nega ou desconhece qualquer antecedente patológico

 HAS DM DAC ICC (TF _____) Aritmia MP IVF/ OAC IRC DLP Hepatite Insuficiência Hepática AVCi // h prévio? Há _____ a – sem seqüela com seqüela: cognitiva motora _____ AOI/OP Reumatismo Chron/ colite Gastrite Dist Tireóide Bronquite/ Asma DPOC _____ AIDS Sífilis Down D Parkinson EM Epilepsia TCE Neurodermite Alergias _____ Depressão Esquizofrenia Mania TOC Psoríase Neoplasias _____ Internação Psiquiátrica: _____ Tentativa de suicídio _____ TTOs anteriores: Clínicos: _____ Cirúrgicos: _____ Convênio SUS Não fazia tratamento/ acompanhamento médico atualmente Nunca foi ao médico: recusa/ sem acesso Sd demencial diagnosticada em vida: não sim Há _____ a Etiologia: _____ História compatível com Síndrome demencial: não simInício dos sintomas: lento súbito memória comportamento outro _____Curso: lento e progressivo rápido evolução em degraus curso flutuante

Função anterior à morte

 Acuidades visual e auditiva preservadas ↓acuidade visual óculos hipoacusia prótese auditiva Dentição preservada uso de prótese dentária disfagia SNG/SNE Sedentário Atividade física: caminhada doméstica outra _____ Freq _____ /sem Andava: sem auxílio com auxílio: pessoas parede/ móveis equipamentos auxiliares Amputações _____ Lesões cutâneas (úlceras) _____ Acamado _____ Independente Dependente Tomava decisões sozinho Não tomava decisões Em que situações convivia com muitas pessoas _____FR: Obesidade (P _____ A _____ IMC _____) Reposição hormonal _____ Tabagismo: não sim _____ anos/maço parou _____ Etilismo: não social alcoolismo parou _____ Drogadição: _____ uso/ abuso parou _____

ANEXO VI – Pôster apresentado no Congresso da American Heart Association, Scientific Sessions, em novembro 2015.

INFLAMMATION IN THE PERIVASCULAR ADIPOSE TISSUE IS ASSOCIATED WITH CORONARY ARTERY DISEASE: AN AUTOPSY STUDY

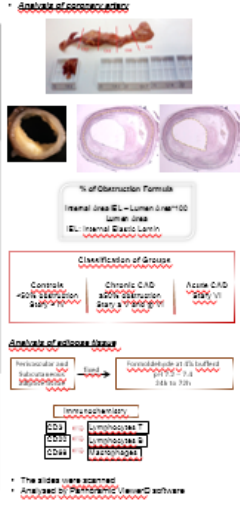
Authors: Daniela Souza Fariás^{1,2}; Carlos Augusto Pasquellucci¹; Aline Niehizawa^{1,2}; Luiz Fernando Ferraz da Silva¹; Fernanda Marinho Campos¹; Karen Cristina Souza Silva^{1,2}; Anderson Cuelho^{1,2}; Renata Paralzo Leite¹; Renara Eloah de Lucena Ferretti-Rebustini^{1,4}; Lea Tenenholz Grinberg¹; José Marcelo Fartek^{1,5}; Wilson Jacob Filho^{1,5}; Claudia Kilmie Suemoto^{1,4,6}

¹ Laboratory of Cellulose for Pathology, Department of Pathology, University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil; ² Laboratory of Pathophysiology in Aging, Department of Pathology, University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil; ³ Department of Pathology, University of São Paulo Medical School and Director of the Autopsy Service of the University of São Paulo São Paulo, SP, Brazil; ⁴ Department of Medical-Surgical Nursing, University of São Paulo Nursing School, São Paulo, SP, Brazil; ⁵ Discipline of Geriatrics, University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brazil.

Background
Evidence from biopsy and autopsy studies suggested that inflammation in the perivascular adipose tissue (PAT) may be related to the pathophysiology of CAD. However, lymphocyte B in PAT has not been previously investigated, neither the presence of inflammation in acute CAD.

Aim
Investigate the association between inflammation in perivascular adipose tissue and coronary artery disease.

Methods
• Cross-sectional clinicopathologic study.
• 40 subjects that were autopsied at a general autopsy service.
• **Inclusion criteria:**
Age > 20 years old at death
Information that had been the deceased at least weekly prior to death
Knee and Informed Consent Form signed
• **Exclusion Criteria:**
• Incomplete clinical data
• Adipose tissue fixed for > 72 hours
• Presence of:
- Corticosteroid use and immunosuppressive drugs
- Sepsis
- Coronary stent
- Auto-immune diseases
- Pericarditis
- Pericardial effusion
- Chagas's disease
- Hypertonia
- Endocarditis
- Cardiac tamponade
- Hemopericardium
- Previous cardiac surgery



Abstracts

- Bind to case and sample identies
- Bind to histology
- Results was express in cell/mm² in μm²

Table 1. Descriptive analysis of the clinical and demographic variables periles and groups.

Variable	Mean (± SD)	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Median	Q1	Q3
Age (years)	59.8 (12.5)	12.5	45	75	58	52	65
Sex (M/F)	21 (52.5%) / 19 (47.5%)						
Cholesterol (mmol/L)	2.1 (0.5)	0.5	1.5	3.0	2.0	1.8	2.2
Triglycerides (mmol/L)	1.5 (0.8)	0.8	0.5	3.0	1.2	0.8	1.8
LDL-C (mmol/L)	1.5 (0.4)	0.4	1.0	2.5	1.4	1.2	1.6
HDL-C (mmol/L)	0.8 (0.2)	0.2	0.5	1.5	0.7	0.6	0.8
Diabetes Mellitus (%)	25 (62.5%)						
Smoking Status (%)	15 (37.5%)						
Family History (%)	30 (75%)						
Obesity (%)	20 (50%)						
Arterial Hypertension (%)	25 (62.5%)						
Myocardial Infarction (%)	10 (25%)						
Stroke (%)	5 (12.5%)						
Coronary Artery Disease (%)	40 (100%)						

Table 2. Descriptive analysis of the percentage of obstruction and Stain's analysis of adipose tissue.

Group	% of Obstruction	Stain
Control	<20%	H&E
Chronic CAD	>20%	H&E, Masson's Trichrome
Acute CAD	>20%	H&E, Masson's Trichrome, IHC

Table 3. Analysis among groups of the number of cells in perivascular and subcutaneous adipose tissue.

Number of Lymphocytes (x 10 ³)	Total	CD3+	CD4+	CD8+	p
Perivascular Adipose Tissue	450 (200-700)	300 (100-500)	150 (50-300)	100 (30-200)	<0.05
Subcutaneous Adipose Tissue	150 (50-300)	100 (30-200)	50 (10-100)	50 (10-100)	<0.05

Table 4. Analysis intragroups of the number of cells in perivascular and subcutaneous adipose tissue.

Group	Perivascular Adipose Tissue (x 10 ³)	Subcutaneous Adipose Tissue (x 10 ³)	p
Control	100 (30-200)	50 (10-100)	<0.01
Chronic CAD	300 (100-500)	150 (50-300)	<0.01
Acute CAD	500 (150-800)	250 (70-400)	<0.001

Conclusions

1) We found larger number of lymphocytes B in perivascular adipose tissue in chronic and acute CAD compared to the control group, which suggests an inflammatory response mediated by humoral mechanisms in CAD.

2) The subcutaneous adipose tissue presents inflammation mediated by macrophages and lymphocytes T in chronic and acute CAD groups. This finding suggests that inflammation in CAD is systemic.

3) Although the inflammation seemed to be generalized, it was more intense in perivascular adipose tissue than in the subcutaneous one.

Corresponding author: daniela@usp.br

Keywords: Coronary Artery Disease, Inflammation, Adipose Tissue, Lymphocytes B, Histology.

References:

1. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;413:17-24.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis: implications for diagnosis and therapy. *Circulation*. 2002;106:1411-1422.
3. Libby P. Inflammation in atherosclerosis: implications for diagnosis and therapy. *Circulation*. 2002;106:1411-1422.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis: implications for diagnosis and therapy. *Circulation*. 2002;106:1411-1422.
5. Libby P. Inflammation in atherosclerosis: implications for diagnosis and therapy. *Circulation*. 2002;106:1411-1422.
6. Libby P. Inflammation in atherosclerosis: implications for diagnosis and therapy. *Circulation*. 2002;106:1411-1422.

Conflict of Interest: None.

Financial Support: FAPESP (2012/00000-0).



REFERÊNCIAS

1. (WHO) WHO. World Health Statistics 2016: monitoring health for the Sustainable Development Goals (SDGs). http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en/. Published 2016. Accessed June 14, 2016.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2015 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2015;131(4):E29-E322. doi:10.1161/cir.000000000000152.
3. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016;133(4):e38-e360. doi:10.1161/CIR.0000000000000350.
4. (WHO) WHO. Projections of mortality and causes of death, 2015 and 2030. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/. Published 2013. Accessed June 14, 2016.
5. Collaborators GBD 2013 M, of Death C. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385(9963):117-171. doi:10.1016/S0140-6736(14)61682-2.
6. (WHO) WHO. GLOBAL HEALTH ESTIMATES 2014 SUMMARY TABLES: DALY BY CAUSE, AGE AND SEX, 2000-2012. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/. Published 2014. Accessed June 15, 2016.
7. Cardiologia SB de. Panorama atualizado da mortalidade por doenças do aparelho circulatório no Brasil no período de 2003 a 2012. <http://www.cardiol.br/dados/>. Published 2015. Accessed June 16, 2016.
8. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;386(10010):2287-2323. doi:10.1016/S0140-6736(15)00128-2.
9. Blakely T, Hales S, Kieft C, Wilson N, Woodward A. The global distribution of risk factors by poverty level. *Bull World Heal Organ*. 2005;83(2):118-126. doi:/S0042-96862005000200012.
10. Schmidt MI, Duncan BB, e Silva G, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011;377(9781):1949-1961. doi:10.1016/S0140-6736(11)60135-9.
11. Roth GA, Forouzanfar MH, Moran AE, et al. Demographic and

- epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *N Engl J Med*. 2015;372(14):1333-1341. doi:10.1056/NEJMoa1406656.
12. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-874. doi:10.1038/nature01323.
 13. Tsiantoulas D, Sage AP, Mallat Z, Binder CJ. Targeting B cells in atherosclerosis: closing the gap from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):296-302. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303569.
 14. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-1695. doi:10.1056/NEJMra043430.
 15. Libby P, Hansson GK. Inflammation and Immunity in Diseases of the Arterial Tree: Players and Layers. *Circ Res*. 2015;116(2):307-311. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.301313.
 16. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*. 2016;118(4):535-546. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307611.
 17. Teague H, Mehta NN. The Link Between Inflammatory Disorders and Coronary Heart Disease: a Look at Recent Studies and Novel Drugs in Development. *Curr Atheroscler Rep*. 2016;18(1):3. doi:10.1007/s11883-015-0557-y.
 18. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1992;85(1):391-405. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1728483>. Accessed June 21, 2016.
 19. Schoen F. O Coração. In: Elsevier, ed. *Patologia – Bases Patológicas Das Doenças*. 7^o. Rio de Janeiro; 2005:583-650.
 20. Stary HC. Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*. 1987;64(2-3):91-108. doi:10.1016/0021-9150(87)90234-6.
 21. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arter Thromb*. 1994;14(5):840-856. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8172861>.
 22. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.

- 2000;20(5):1262-1275. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807742>. Accessed June 25, 2016.
23. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science*. 1976;193(4258):1094-1100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/822515>. Accessed June 29, 2016.
 24. Choi B-J, Matsuo Y, Aoki T, et al. Coronary endothelial dysfunction is associated with inflammation and vasa vasorum proliferation in patients with early atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(11):2473-2477. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304445.
 25. Moreno PR, Purushothaman K-R, Sirol M, Levy AP, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*. 2006;113(18):2245-2252. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.578955.
 26. Williams JK, Heistad DD. Structure and function of vasa vasorum. *Trends Cardiovasc Med*. 1996;6(2):53-57. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232275?access_num=21232275&link_type=MED&dopt=Abstract.
 27. Scotland R, Vallance P, Ahluwalia A, et al. On the regulation of tone in vasa vasorum. *Cardiovasc Res*. 1999;41(1):237-245. doi:10.1016/s0008-6363(98)00223-5.
 28. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(9):1512-1531. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7670967>. Accessed June 20, 2016.
 29. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, et al. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol*. 2001;16(5):285-292. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11584167>. Accessed June 25, 2016.
 30. Stary H. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1177-1178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807728>.
 31. Libby P, Lichtman AH, Hansson GK, et al. Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans. *Immunity*. 2013;38(6):1092-1104. doi:10.1016/j.immuni.2013.06.009.
 32. Moore KJ, Tabas I, A-Gonzalez N, et al. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145(3):341-355. doi:10.1016/j.cell.2011.04.005.
 33. Ketelhuth DFJ, Hansson GK. Adaptive Response of T and B Cells in

- Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):668-678. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306427.
34. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S24-32. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.016.
 35. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;386(10010):2287-2323. doi:10.1016/S0140-6736(15)00128-2.
 36. José de Ribamar Costa Jr., Stéphane G. Carlier GSM. Novas Modalidades de Imagem em Cardiologia Intervencionista: Histologia Virtual e Elastografia. *Rev Bras Cardiol Invasiva.* 2004;12(4):212-215.
 37. Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, Binder CJ. B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114(11):1743-1756. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301145.
 38. Chetty R, Gatter K. CD3: Structure, Function, and Role of Immunostaining in Clinical Practice. *J Pathol.* 1994;173(4):303-307. doi:10.1002/path.1711730404.
 39. Mesquita Júnior D, Antônio Pereira Araújo J, Tiekō Takao Catelan T, et al. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reum.* 2010;50(5):552-580.
 40. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, et al. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med.* 1998;187(12):2009-2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9625760>.
 41. Meyer TN, Da Silva AL. Resposta celular ao estresse. *Rev Ass Med Bras.* 1999;45(2):181-188.
 42. Campbell KA, Lipinski MJ, Doran AC, Skafien MD, Fuster V, McNamara CA. Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis. *Circ Res.* 2012;110(6):889-900. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.263186.
 43. Gunawardana SC. Benefits of healthy adipose tissue in the treatment of diabetes. *World J Diabetes.* 2014;5(4):420-430. doi:10.4239/wjd.v5.i4.420.
 44. Hassan M, Latif N, Yacoub M. Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol.* 2012;9(12):689-702. doi:10.1038/nrcardio.2012.148.
 45. Brestoff JR, Artis D, Allison MB, et al. Immune Regulation of Metabolic Homeostasis in Health and Disease. *Cell.* 2014;161(1):146-160.

doi:10.1016/j.cell.2015.02.022.

46. World Health Organization. Global Health Observatory - Data repository. Overweight. WHO. <http://apps.who.int/gho/data/node.main.A897A?lang=en>. Published 2015. Accessed June 21, 2016.
47. World Health Organization. Global Health Observatory - Data repository. Obesity. WHO. <http://apps.who.int/gho/data/view.main.680?lang=en>. Published 2015. Accessed June 21, 2016.
48. Ellulu MS, Khaza'ai H, Rahmat A, Patimah I, Abed Y. Obesity can predict and promote systemic inflammation in healthy adults. *Int J Cardiol*. 2016;215:318-324. doi:10.1016/j.ijcard.2016.04.089.
49. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983;67(5):968-977. doi:10.1161/01.cir.67.5.968.
50. Exley MA, Hand L, O'Shea D, Lynch L. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol*. 2014;223(2):R41-R48. doi:10.1530/JOE-13-0516.
51. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*. 2012;58(1):15-23. doi:10.1159/000321319.
52. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-184. doi:10.1172/jci29881.
53. Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, et al. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ Res*. 2008;103(5):467-476. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.177105.
54. McDonnell ME, Ganley-Leal LM, Mehta A, et al. B lymphocytes in human subcutaneous adipose crown-like structures. *Obes (Silver Spring)*. 2012;20(7):1372-1378. doi:10.1038/oby.2012.54.
55. Sacks HS, Fain JN. Human epicardial adipose tissue: a review. *Am Hear J*. 2007;153(6):907-917. doi:10.1016/j.ahj.2007.03.019.
56. Iacobellis G. Epicardial fat: a new cardiovascular therapeutic target. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;27:13-18. doi:10.1016/j.coph.2016.01.004.
57. Parisi V, Rengo G, Perrone-Filardi P, et al. Increased Epicardial Adipose Tissue Volume Correlates With Cardiac Sympathetic Denervation in Patients With Heart Failure Novelty and Significance. *Circ Res*. 2016;118(8):1244-1253. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307765.

58. Iacobellis G, Ribaldo MC, Assael F, et al. Echocardiographic Epicardial Adipose Tissue Is Related to Anthropometric and Clinical Parameters of Metabolic Syndrome: A New Indicator of Cardiovascular Risk. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-030698>. 2003.
59. Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci*. 2012;122(1):1-12. doi:10.1042/CS20110151.
60. Brown NK, Zhou Z, Zhang J, et al. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(8):1621-1630. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303029.
61. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res*. 2009;104(4):541-549. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182998.
62. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003;108(20):2460-2466. doi:10.1161/01.CIR.0000099542.57313.C5.
63. Konishi M, Sugiyama S, Sato Y, et al. Pericardial fat inflammation correlates with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2010;213(2):649-655. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.007.
64. Hirata Y, Kurobe H, Akaike M, et al. Enhanced inflammation in epicardial fat in patients with coronary artery disease. *Int Hear J*. 2011;52(3):139-142. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646734>.
65. Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(3):248-255. doi:10.1016/j.jacc.2011.01.048.
66. Verhagen SN, Vink A, van der Graaf Y, Visseren FLJ. Coronary perivascular adipose tissue characteristics are related to atherosclerotic plaque size and composition. A post-mortem study. *Atherosclerosis*. 2012;225(1):99-104. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.031.
67. Grosso AF, de Oliveira SF, Higuchi M de L, Favarato D, Dallan LA de O, da Luz PL. Synergistic anti-inflammatory effect: simvastatin and pioglitazone reduce inflammatory markers of plasma and epicardial adipose tissue of coronary patients with metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):47. doi:10.1186/1758-5996-6-47.
68. Dako - Agilent Pathology Solutions. CD45R0 Clone UCHL1. http://www.dako.com/br/ar38/p103050/prod_products.htm?setCountry=true&purl=ar38/p103050/prod_products.htm?undefined&submit=Accept country. Published 2016. Accessed July 25, 2016.
69. Tavora F, Kutys R, Li L, Ripple M, Fowler D, Burke A. Adventitial

- lymphocytic inflammation in human coronary arteries with intimal atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol.* 2010;19(3):e61-e68. doi:10.1016/j.carpath.2009.02.001.
70. Kralova Lesna I, Tonar Z, Malek I, et al. Is the amount of coronary perivascular fat related to atherosclerosis? *Physiol Res.* 2015;64 Suppl 3:S435-43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26680678>. Accessed July 21, 2016.
 71. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, et al. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation.* 2002;105(6):685-690. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839622>.
 72. Suleiman M-S, Zacharowski K, Angelini GD. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. *Br J Pharmacol.* 2008;153(1):21-33. doi:10.1038/sj.bjp.0707526.
 73. Grunfeld C, Scherzer R, Varosy PD, Ambarish G, Nasir K, Budoff M. Relation of coronary artery plaque location to extent of coronary artery disease studied by computed tomographic angiography. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2010;4(1):19-26. doi:10.1016/j.jcct.2010.01.009.
 74. Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, et al. Brain bank of the Brazilian aging brain study group - a milestone reached and more than 1,600 collected brains. *Cell Tissue Bank.* 2007;8(2):151-162. doi:10.1007/s10561-006-9022-z.
 75. de Lucena Ferretti RE, Pasqualucci CAG, Grinberg LT, et al. Banco de encéfalos humanos: uma ferramenta importante para o estudo do envelhecimento cerebral. *O Mundo da Saúde.* 2009;33(1).
 76. Serviço de Verificação de Óbitos da Capital - SVOC. <http://www.svoc.usp.br/>. Published 2015.
 77. Lucas S. The autopsy pathology of sepsis-related death. *Curr Diagnostic Pathol.* 2007;13(5):375–388. doi:10.1016/j.cdip.2007.06.001.
 78. Tsokos M. Postmortem diagnosis of sepsis. *Forensic Sci Int.* 2007;165(2-3):155-164. doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.015.
 79. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-675. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834>. Accessed July 13, 2016.
 80. Suemoto CK, Nitrini R, Grinberg LT, et al. Atherosclerosis and dementia: a cross-sectional study with pathological analysis of the carotid arteries. *Stroke.* 2011;42(12):3614-3615. doi:10.1161/STROKEAHA.111.628156.

81. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* 1985;33(8):845-853. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3894502>.
82. Syrbu SI, Cohen MB. An enhanced antigen-retrieval protocol for immunohistochemical staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol.* 2011;717:101-110. doi:10.1007/978-1-61779-024-9_6.
83. Chagas P, Mazocco L, Piccoli J da CE, et al. Association of alcohol consumption with coronary artery disease severity. *Clin Nutr.* 2016;0(0):III 27-III 31. doi:10.1016/j.clnu.2016.06.017.
84. Yang Y, Liu D-C, Wang Q-M, et al. Alcohol consumption and risk of coronary artery disease: A dose-response meta-analysis of prospective studies. *Nutrition.* 2016;32(6):637-644. doi:10.1016/j.nut.2015.11.013.
85. Kema VH, Mojerla NR, Khan I, Mandal P. Effect of alcohol on adipose tissue: a review on ethanol mediated adipose tissue injury. *Adipocyte.* 2015;4(4):225-231. doi:10.1080/21623945.2015.1017170.
86. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, et al. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes.* 2010;59(7):1648-1656. doi:10.2337/db09-0287.
87. Torres-Castro I, Arroyo-Camarena ÚD, Martínez-Reyes CP, et al. Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose. *Immunol Lett.* 2016;176:81-89. doi:10.1016/j.imlet.2016.06.001.
88. Rehg JE, Bush D, Ward JM. The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. *Toxicol Pathol.* 2012;40(2):345-374. doi:10.1177/0192623311430695.
89. Kaminski DA, Randall TD. Adaptive immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol.* 2010;31(10):384-390. doi:10.1016/j.it.2010.08.001.
90. Kyaw T, Winship A, Tay C, et al. Cytotoxic and proinflammatory CD8+ T lymphocytes promote development of vulnerable atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice. *Circulation.* 2013;127(9):1028-1039. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001347.
91. Zhou J, Dimayuga PC, Zhao X, et al. CD8+CD25+ T Cells Reduce Atherosclerosis in apoE(-/-) Mice. Vol 443.; 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.057.
92. Moro K, Yamada T, Tanabe M, et al. Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+Sca-1+ lymphoid cells. *Nature.*

- 2010;463(7280):540-544. doi:10.1038/nature08636.
93. Houtkamp MA, de Boer OJ, van der Loos CM, van der Wal AC, Becker AE. Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural organization suggests generation of local humoral immune responses. *J Pathol.* 2001;193(2):263-269. doi:10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH774>3.0.CO;2-N.
 94. Rajsheker S, Manka D, Blomkalns AL, Chatterjee TK, Stoll LL, Weintraub NL. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(2):191-196. doi:10.1016/j.coph.2009.11.005.
 95. Mulligan-Kehoe MJ, Simons M, Galkina E, et al. Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation.* 2014;129(24):2557-2566. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007189.
 96. Higuchi ML, Gutierrez PS, Bezerra HG, et al. Comparison between Adventitial and Intimal Inflammation of Ruptured and Nonruptured Atherosclerotic Plaques in Human Coronary Arteries. *Arq Bras Cardiol.* 2002;79(1):20-24. doi:10.1590/S0066-782X2002001000003.
 97. Mazurek T, Kochman J, Kobylecka M, et al. Inflammatory activity of pericoronary adipose tissue may affect plaque composition in patients with acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation: preliminary results. *Kardiol Pol.* 2014;72(5):410-416. doi:10.5603/KP.a2013.0320.
 98. Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? *Diabetes Care.* 2009;32(6):1068-1075. doi:10.2337/dc08-2280.
 99. Kunimura A, Ishii H, Uetani T, et al. Impact of adipose tissue composition on cardiovascular risk assessment in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2016;251:206-212. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.041.
 100. Bullenkamp J, Dinkla S, Kaski JC, Dumitriu IE. Targeting T cells to treat atherosclerosis: odyssey from bench to bedside. *Eur Hear journal Cardiovasc Pharmacother.* 2016;2(3):194-199. doi:10.1093/ehjcvp/pvw001.
 101. Svensson P-A, Lindberg K, Hoffmann JM, et al. Characterization of brown adipose tissue in the human perirenal depot. *Obesity.* 2014;22(8):1830-1837. doi:10.1002/oby.20765.
 102. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1821-1830. doi:10.1172/JCI19451.

103. Folkesson M, Vorkapic E, Gulbins E, et al. Inflammatory cells, ceramides, and expression of proteases in perivascular adipose tissue adjacent to human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2016. doi:10.1016/j.jvs.2015.12.056.
104. Mauro CR, Ilonzo G, Nguyen BT, et al. Attenuated adiposopathy in perivascular adipose tissue compared with subcutaneous human adipose tissue. *Am J Surg.* 2013;206(2):241-244. doi:10.1016/j.amjsurg.2012.07.032.
105. Randolph GJ. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014;114(11):1757-1771. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.301174.
106. Iacobellis G, Willens HJ. Echocardiographic epicardial fat: a review of research and clinical applications. *J Am Soc Echocardiogr.* 2009;22(12):1311-1318. doi:10.1016/j.echo.2009.10.013.
107. Kobashigawa JA. Potential immunosuppressive effects of statins. *Pediatr Transplant.* 2008;12(4):381-384. doi:10.1111/j.1399-3046.2008.00902.x.
108. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, et al. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0807646>. 2009.
109. Mega JL, Stitzel NO, Smith JG, et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet (London, England).* 2015;385(9984):2264-2271. doi:10.1016/S0140-6736(14)61730-X.
110. Okutsu M, Lira VA, Higashida K, Peake J, Higuchi M, Suzuki K. Corticosterone accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Atherosclerosis.* 2014;232(2):414-419. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.076.
111. Varas-Lorenzo C, Rodriguez LAG, Maguire A, Castellsague J, Perez-Gutthann S. Use of oral corticosteroids and the risk of acute myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2007;192(2):376-383. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.019.
112. Cardiovascular Inflammation Reduction Trial - Inflammation Imaging Study (CIRT). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02576067>. Published 2016. Accessed July 25, 2016.
113. Ridker PM, Thuren T, Zalewski A, Libby P. Interleukin-1 β inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: Rationale and Design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J.* 2011;162(4):597-605. doi:10.1016/j.ahj.2011.06.012.
114. STABILITY Investigators, White HD, Held C, et al. Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease. *N Engl J Med.*

2014;370(18):1702-1711. doi:10.1056/NEJMoa1315878.

115. Shah PK, Chyu K-Y, Dimayuga PC, Nilsson J. Vaccine for Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(25):2779-2791. doi:10.1016/j.jacc.2014.10.018.
116. Ferretti Re, Damin A, Bruck S, et al. Post-Mortem diagnosis of dementia by informant interview. *Dement Neuropsychol.* 2010;4(2):138-144. http://www.demneuropsychol.com.br/detalhe_artigo.asp?id=218.
117. Farias DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, et al. Abstract 14851: Inflammation in the Perivascular Adipose Tissue is Associated With Coronary Artery Disease: An Autopsy Study. *Circulation.* 2015;132(Suppl 3).
118. Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, et al. Perivascular Adipose Tissue Inflammation and Coronary Artery Disease: An Autopsy Study Protocol. *JMIR Res Protoc.* 2016. doi:<http://dx.doi.org/10.2196/resprot.6340>.