

DANIELI CASTRO OLIVEIRA DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO NÃO-INVASIVA DAS
PROPRIEDADES DA PAREDE ARTERIAL EM
PACIENTES COM SÍNDROME
ANTIFOSFOLÍPIDE PRIMÁRIA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
grau de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Reumatologia

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ferreira Borba Neto

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Aparecido Bortolotto

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Danieli Castro Oliveira de

Avaliação não-invasiva das propriedades da parede arterial em pacientes com síndrome antifosfolípide primária / Danieli Castro Oliveira de Andrade. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Reumatologia.

Orientador: Eduardo Ferreira Borba Neto.

Co-orientador: Luiz Aparecido Bortolotto

Descritores: 1.Síndrome antifosfolípide 2.Aterosclerose 3.Ultra-sonografia
4.Pressão arterial 5.Fatores de risco

USP/FM/SBD-423/07

A tese foi uma etapa prazerosa da minha vida;

já estou pronta para outra.

Dedico esse trabalho ao Victor,
exemplo de médico e pesquisador.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Roberto Oliveira pelo apoio em todas as etapas da minha vida.

À minha mãe, Aparecida pela aceitação de vivermos à distância e de ainda não ter sido avó.

À Prof. Dra. Eloisa Bonfá pela busca incessante pelo aprimoramento da disciplina de Reumatologia da FMUSP e daqueles que a cercam.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Borba pelo extremo compromisso com a Reumatologia, e respeito pelas pacientes com Lupus. A sintonia que desfrutamos ao longo desse trabalho, mostra que esse é o primeiro de muitos.

Ao meu co-orientador Dr. Luiz A. Bortolotto por ter sido tão presente nos momentos que solicitei.

À Cristina Nazareth do ambulatório por toda a ajuda no trato com as pacientes.

À equipe carinhosa do laboratório LIM (Margarete, Cleonice e Eliana), e em especial a Francisca pela ajuda nas coletas.

Aos colegas da Reumatologia que contribuíram para o meu crescimento.

À equipe da secretaria da Reumatologia: Cláudia, Martha, Iná e Fátima.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro dado a este trabalho.

Às pacientes, que me ensinaram muito sobre a vida.

RESUMO

Andrade DCO. Avaliação não-invasiva das propriedades da parede arterial em pacientes com Síndrome Antifosfolípide Primária [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Objetivo: A aterosclerose prematura e acelerada tem sido recentemente reconhecida como um fator adicional de dano vascular nos pacientes com Síndrome Antifosfolípide Primária (SAFP). Esses pacientes podem ser beneficiados com o emprego de métodos para detecção precoce de aterosclerose como a Velocidade de Onda de Pulso (VOP) e o *Echo-tracking (ET)*. Esses métodos têm sido reconhecidos pela capacidade de avaliar de forma não-invasiva a progressão da aterosclerose na parede vascular. Portanto, nosso principal objetivo foi avaliar a aterosclerose prematura nesses pacientes com SAFD.

Pacientes e Métodos: 27 pacientes do sexo feminino com SAFD definida pelos critérios de *Sapporo* e 27 pacientes controles pareadas por sexo, idade e índice de massa corpórea foram selecionadas de forma consecutiva. Todas as pacientes sofreram trombose e foram subdivididas de acordo com o sítio vascular: arterial (n=12) e venoso (n=11). Os critérios de exclusão foram: idade > 55 anos, raça negra, hipertensão descontrolada, uso de corticosteróides e estatinas, diabetes, dislipidemia prévia, gravidez, menopausa, outras trombofilias, colagenoses, doenças vasculares de outras etiologias,

obesidade definido por Índice de massa corpórea (IMC) $>30 \text{ m/kg}^2$ e tabagismo. Todas as pacientes foram submetidas à VOP no leito fêmoro-carotídeo (*Complior*) e *echo-tracking* pelo *Wall Track System* no leito carotídeo para avaliação das propriedades funcionais dos vasos. **Resultados:** Ambos os grupos SAFP e controles não mostraram diferença em relação à idade (41.5 ± 9.3 vs. 41.2 ± 10.2 anos; $p=0.92$) e IMC (22.7 ± 3.4 vs. $22.6 \pm 3.7 \text{ kg/m}^2$; $p=0.91$). Todas as pacientes apresentaram VOP semelhante às controles ($p=0.34$), o espessamento íntima-média (EIM) foi semelhante nos dois grupos ($p=0.29$) assim como os demais parâmetros do *echo-tracking* como o diâmetro carotídeo ($p=0.26$), a distensibilidade ($p=0.92$), os coeficientes de complacência ($p=0.36$) e o módulo elástico ($p=0.78$). A pressão sistólica (PS) das pacientes estava aumentada em relação às controles ($p=0.02$). De acordo com o sítio de trombose, as pacientes com eventos arteriais demonstraram um aumento na VOP em relação àquelas com eventos venosos ($p=0.01$) mesmo com mesmo EIM ($p=0.52$). Ambos resultados não foram influenciados pela idade ou duração de doença. Os níveis de colesterol total ($p=0.002$), LDL ($p=0.02$) e apolipoproteína B ($p=0.03$) foram mais altos nas pacientes com SAFP com eventos arteriais exclusivos.

Na análise multivariada, observamos correlação da VOP com a idade ($r=0.584$; $p=0.001$) e com o diâmetro do vaso (DV) ($r=0.407$; $p=0.04$). Foi observada uma correlação positiva da VOP com o colesterol total ($r=0.507$, $p=0.01$), LDL ($r=0.402$, $p=0.05$), e triglicérides ($r=0.583$, $p=0.003$). O EIM apresentou correlação direta com o DV ($r=0.393$; $p=0.04$) e com a distensibilidade ($r=0.373$, $p=0.05$).

Conclusão: A aterosclerose na SAFP apresenta curso peculiar e de forma precoce. A VOP foi um método mais adequado para detectar a disfunção vascular secundária à rigidez arterial, visto que, não foram detectadas alterações vasculares funcionais pelo ET.

Descritores: 1-Síndrome antifosfolípide 2- aterosclerose 3-ultrasonografia
4-pressão arterial 5-fatores de risco.

SUMMARY

Andrade DCO. *Non-invasive evaluation of arterial wall properties in patients with Primary Antiphospholipid Syndrome.* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Objective: Premature and accelerated atherosclerosis has been recently recognized as an additional vascular damage in Primary Antiphospholipid Syndrome (PAPS). These patients could benefit from non-invasive diagnostic methods to detect atherosclerosis as the Pulse Wave Velocity (PWV) and the Echo-Tracking (ET) device. By precise measurement of arterial stiffness, these methods output an indirect way to evaluate the vascular wall lesion progression. Our main objective was to evaluate premature atherosclerosis in PAPS.**PATIENTS AND METHODS:** 27 female patients with PAPS (*Sapporo* criteria) and 27 age-, body mass index- and sex-matched controls were consecutively selected. All PAPS patients had previous thrombosis and were subdivided according to the type of vascular exclusive event: arterial (n=12) and venous (n=11). Exclusion criteria were: age >55 years, black race, uncontrolled hypertension, smoking, diabetes, previous dyslipidemia, other thrombophilias, vascular and collagen diseases, corticosteroids and statins use, pregnancy, menopause, and obesity defined as body mass index (BMI)>30 m/kg². All subjects underwent the PWV in femoral-carotid bed (*Complior*) and echo-tracking by a Wall Track System in carotid bed to analyze vascular wall functional properties. **RESULTS:** Both groups PAPS and controls did not show

any difference regarding age (41.5 ± 9.3 vs. 41.2 ± 10.2 years; $p=0.92$) and BMI (22.7 ± 3.4 vs. 22.6 ± 3.7 kg/m²; $p=0.91$). All PAPS patients had PWV values similar to controls ($p=0.34$). Intima-media thickness (IMT) was also similar between groups ($p=0.29$) as well as all the other echo tracking parameters such as carotid diameter ($p=0.26$), distensibility ($p=0.92$), compliance coefficients ($p=0.36$), and elastic modulus ($p=0.78$) were similar among groups. A higher systolic blood pressure was observed in PAPS patients than controls ($p=0.02$). According to the site of thrombosis, PAPS patients with exclusive arterial events showed a higher PWV compared to those with venous ($p=0.01$) but had similar IMT ($p=0.52$). Both results were not influenced by age or disease duration. Total cholesterol ($p=0.002$), LDL ($p=0.02$), and apolipoprotein B ($p=0.03$) levels were higher in PAPS with exclusive arterial events compared to those with exclusive venous events.

Multivariate analysis in PAPS showed that PWV was related to age ($r=0.584$; $p=0.001$) and blood vessel diameter (VD) ($r=0.407$; $p=0.04$). Moreover, PWV did also positively correlated with total cholesterol ($r=0.507$, $p=0.01$), LDL ($r=0.402$, $p=0.05$), and triglycerides ($r=0.583$, $p=0.003$). IMT also had a positive correlation with VD ($r=0.393$; $p=0.04$) and distensibility ($r=0.373$; $p=0.05$).

CONCLUSION: Atherosclerosis in PAPS has a peculiar course with an early onset, remarkably in those patients with arterial events. PWV was a sensible method to detect impaired functional vessel related to stiffness since no

significant changes were observed in functional vascular properties by Echo-Tracking (ET) device.

Descriptors: 1-Antiphospholipid syndrome, 2-atherosclerosis, 3-ultrasonography 4- pulse 5- risk factors.

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1-Dados epidemiológicos das pacientes com SAFP e controles **20**

TABELA 2-Valores de velocidade de onda de pulso, *echo-tracking* e parâmetros laboratoriais em pacientes com SAFP e controles **21**

TABELA 3-Idade, IMC, VOP e valores do ET em pacientes com SAFP e controles de acordo com o sítio de trombose exclusivo (arterial ou venoso) **23**

TABELA 4-Correlações entre VOP com idade, IMC, pressão arterial, parâmetros laboratoriais e do ET **24**

TABELA 5-Correlações entre a espessura íntima-média com idade, IMC, VOP, pressão arterial, parâmetros laboratoriais, e do ET **25**

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1-Aferição da velocidade de onda de pulso no leito carótido-femural através do *Complior*. 14

Figura 2-Fórmula usada para cálculo da VOP considerando a distância e o tempo gasto pela onda de pulso. 14

Figura 3-Aferição da espessura íntima-média por *echo-tracking* da carótida com tradução do sinal ultrasonográfico em radiofrequência. 16

Figura 4-*Echo-tracking* da carótida para obtenção do diâmetro arterial. 17

Figura 5-Curva de variação da distensão da carótida que permite o cálculo dos demais parâmetros como distensibilidade e do diâmetro do vaso. 17

LISTA DE ABREVIATURAS

ACL - anti-cardiolipina

AVC - acidente vascular cerebral

CC - coeficiente de complacência

CD - coeficiente de distensibilidade

DMF - dilatação mediada por fluxo

DP - desvio padrão

DV - diâmetro do vaso

EIM - espessamento íntima-média

ELISA - *enzyme linked immuno sorbent assay*

ET - echo-tracking

HDL - *high density lipoprotein*

IGG - imunoglobulina

IMC - índice de massa corpórea

INR - *international normalized ratio*

ITB - índice tornozelo braquial

LAC - anticoagulante lúpico

LDL - *low density lipoprotein*

LES - lúpus eritematoso sistêmico

ME - modulo elástico

PS - pressão sistólica

RPM - rotações por minuto

SAFP - síndrome antifosfolípide primária

VLDL - *very low density lipoprotein*

VOP - velocidade de onda de pulso

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. PACIENTES E MÉTODOS	8
3.1 PACIENTES	9
3.2. COLETA DE SANGUE	10
3.3. EXAMES LABORATORIAIS.....	11
3.3.1 Exames Bioquímicos.....	11
3.3.2 Exames Imunológicos.....	11
3.4. PROTOCOLO DE ESTUDO	12
3.4.1. Velocidade de onda de pulso (VOP).....	12
3.4.2. Echo-tracking da artéria carótida comum.....	15
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
4. RESULTADOS	19
4.1 CORRELAÇÕES ENTRE VOP E ECHO-TRACKING COM PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS NA SAFP.....	20
4.2 MÉTODOS NÃO-INVASIVOS DE ACORDO COM O SÍTIO DE TROMBOSE.....	22
4.3 ASSOCIAÇÃO DA VOP E DO EIM COM OS PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS ..	24
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÕES	31
7. ANEXOS.....	33
7.1- ANEXO 1- PROTOCOLO DE COLETA DOS DADOS DE AMBULATÓRIO ...	34
7.2 ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	35
8. REFERÊNCIAS	38
9. APÊNDICE	44

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A SAFP tem sido reconhecida como uma vasculopatia primária complexa que envolve as células endoteliais, plaquetas, o sistema inflamatório, os anticorpos antifosfolípidos e a cascata da coagulação. (Hunt and Khamashta 2000; Halevy, Radhakrishnan et al. 2002; Raschi, Testoni et al. 2003)

Além das conseqüências dramáticas relacionadas aos eventos trombóticos agudos, a alta morbidade da SAFP tem sido atribuída aos danos cumulativos no leito vascular. De fato, a trombose não só é o principal critério diagnóstico da SAFP, mas tem sido relacionada à aterosclerose precoce em pacientes com doenças auto-imunes como o Lupus Eritematoso Sistêmico (LES). (Bombeli, Karsan et al. 1997; Segal, Kickler et al. 2000; Ekdahl, Bengtsson et al. 2004; Rajagopalan, Somers et al. 2004; Davies RJ 2006; Christodoulou, Sangle et al. 2007)

Apesar de todas as evidências que têm sido demonstradas, poucos estudos avaliaram a aterosclerose na SAFP. (Roman, Salmon et al. 2001; Bilora, Boccioletti et al. 2002; Medina, Casaos et al. 2003; Ames, Sokoll et al. 2004; Ames, Margarita et al. 2005).

A disfunção endotelial é o primeiro estágio da aterosclerose e é um importante sinal do seu desenvolvimento. Métodos não-invasivos que avaliam as propriedades funcionais dos vasos são capazes de mensurar a disfunção endotelial de forma indireta pelo aumento na rigidez vascular, são eles: a

dilatação mediada por fluxo (DMF), o índice tornozelo-braquial (ITB), a VOP e o ET. (Chapman, Rand et al. 2003; Shoefeld, Lev et al. 2004)

Vários estudos têm confirmado a importância do aumento da rigidez arterial como um fator independente de aumento no risco cardiovascular. (Arnett, Evans et al. 1994; Hodes, Lakatta et al. 1995; Salomaa, Riley et al. 1995; Blacher, Pannier et al. 1998; Laurent, Boutouyrie et al. 2001) .

Dessa forma, Medina e cols. demonstraram que pacientes com SAFP apresentam mais frequentemente aumento no EIM da carótida e um maior número de eventos arteriais, principalmente ataque isquêmico, mesmo naqueles sem placa de aterosclerose. (Medina, Casaos et al. 2003)

Em estudos prévios, a rigidez arterial determinada pela VOP foi capaz de estratificar o risco para aterosclerose, independente de fatores de riscos tradicionais e apresentou um valor prognóstico nos pacientes com doença coronariana (Boutouyrie, Laurent et al. 1995; Laurent, Boutouyrie et al. 2001; Hughes 2003).

Além disso, um aumento na disfunção arterial foi observada em pacientes com hipertensão e doença coronariana. (Alan, Ulgen et al. 2003).

Considerando a presença de inúmeros fatores pró-ateroscleróticos em SAFP e a escassez de estudos que avaliou a rigidez arterial nessa doença, nosso principal objetivo foi determinar a presença de achados precoces de aterosclerose em pacientes com SAFP através de métodos diagnósticos não-invasivos e estabelecer o papel das manifestações trombóticas nessas lesões vasculares.

Nesse estudo usamos os seguintes métodos para avaliação precoce da aterosclerose: a velocidade de onda de pulso (VOP) carótido-femural, e a avaliação da espessura íntima-média, complacência, distensibilidade e elasticidade da parede arterial através do "*echo-tracking device*".

A VOP aplica-se ao estudo regional da rigidez da parede arterial, à qual é diretamente relacionada: quanto maior a VOP, maior o grau de rigidez da parede. Estudos já demonstraram que há uma forte correlação entre o grau de rigidez arterial e a intensidade do processo aterosclerótico, mensurada através de análise anatomopatológica (Wada, Kodaira et al. 1994). Outro benefício importante, a avaliação da VOP é um método fácil, não-invasivo e confiável para mensurar o grau de aterosclerose da parede de grandes artérias. A aferição da VOP é realizada através de dois transdutores de pressão, colocados à distância sobre artérias de grande calibre que correspondem ao leito aonde se quer avaliar (como, por exemplo, as artérias carótidas e femorais), que detectam a passagem da onda de pulso pelo vaso. A VOP, nesse modelo, é dada pela razão entre a distância entre os transdutores e o tempo decorrido entre a passagem da onda de pulso pelos locais sobre os quais os mesmos estão acoplados.

O "*echo-tracking device*" é um método que se aplica à avaliação local de parâmetros relativos à parede arterial, e foi descrito pela primeira vez na literatura por Hoeks e colaboradores em 1990. Consiste em um método de aferição da espessura íntima-média da parede arterial, do diâmetro do vaso e da variação sistó-diastólica do mesmo, através do processamento de sinais de ultra-som (obtidos em modo M, ou seja, linear), transformados em sinais de

radiofrequência e interpretados por um software específico. A avaliação simultânea da espessura da parede arterial, do seu diâmetro e da sua variação sistó-diastólica, em conjunto com a medida da pressão arterial, torna possível o cálculo da distensibilidade, da complacência e do módulo elástico (uma medida das propriedades elásticas da parede arterial) do segmento arterial analisado. Da mesma forma que para a VOP, há estudos que observaram correlação entre alterações no EIM das artérias carótidas e o risco do desenvolvimento de doença cardiovascular, particularmente infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral, de modo que tal parâmetro pode ser considerado como preditor de maior risco para a ocorrência desses fenômenos; (Bots, Hoes et al. 1997; Hodis, Mack et al. 1998). Da mesma forma, é sabido que indivíduos hipertensos e coronariopatas apresentam redução nos níveis de distensibilidade arterial; (Laurent, Caviezel et al. 1994; Alan, Ulgen et al. 2003). Em mulheres menopausadas com Lupus já foi demonstrada a importância do Lupus como fator isolado relacionado à rigidez arterial. (Brodzski, Bengtsson et al. 2004).

Considerando-se a correlação já bem estabelecida entre a aterosclerose e a inflamação, julgamos de suma importância conhecermos, de forma íntima o que acontece no leito vascular desses pacientes com SAFP, a fim de reduzir o risco cardiovascular que a trombose por si só confere a esses pacientes.

Por meio desse estudo submetemos as pacientes à avaliação não-invasiva da rigidez arterial e correlacionamos com os parâmetros próprios da doença trombótica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Avaliar a rigidez arterial através da velocidade de onda de pulso (VOP) e *echo-tracking* nas pacientes com Síndrome Antifosfolípide Primária (SAFP).

2. Comparar a rigidez arterial das pacientes com Síndrome Antifosfolípide Primária com eventos arteriais e venosos exclusivos através da velocidade da onda de pulso e *echo-tracking*.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Vinte e sete pacientes com SAF primária regularmente seguidas no ambulatório de Reumatologia da Universidade de São Paulo foram consecutivamente selecionadas entre os anos de 2004-2005. Todas as pacientes preenchem os critérios de *Sapporo* (Lockshin, Sammaritano et al. 2000).

Os critérios de exclusão foram: idade \geq 55 anos, raça negra, hipertensão descontrolada (sistólica e diastólica maiores que 140 e 90mmhg, respectivamente), insuficiência cardíaca, doença aórtica, doença coronariana ou cerebrovascular de outra etiologia, trombofilias como deficiência: de proteína C, S, fator V de Leidein, anti-trombina III, outras doenças do colágeno, diabetes mellitus, uso de corticosteróides e estatinas, menopausa, IMC \geq 30 Kg/m², e tabagismo atual. Todas as pacientes estavam em uso regular de anticoagulante e com INR em torno de 3.0 (média de 2.5-3.5) recomendado de acordo com o sítio de trombose. As pacientes com SAFP foram subsequentemente divididas em dois grupos de acordo com a exclusividade no sítio de trombose: arterial ou venosa. Da mesma forma, vinte e sete controles do sexo feminino foram pareadas às pacientes por idade e IMC e foram considerados os mesmos critérios de exclusão.

Os critérios clínicos considerados foram o número e sítio de trombose, tempo desde o último evento de trombose, duração da doença, e medicações em uso durante a seleção.

A participação nesse estudo consistiu em consulta médica, exames laboratoriais e testes não-invasivos cardiovasculares. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e consentimento informado foi obtido de todos os participantes.

3.2. Coleta de sangue

Todos os indivíduos participantes do estudo foram submetidos a coleta de sangue após jejum de 12 horas, no mesmo dia da realização do protocolo. Foram colhidas amostras para a realização das seguintes determinações plasmáticas: colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicérides, apolipoproteína A1, apolipoproteína B, proteína C-reativa, homocisteína e lipoproteína (a). O sangue foi coletado em tubos secos (ou em tubo contendo EDTA, no caso da coleta para dosagem de homocisteína) e centrifugado a 3000 RPM durante 15 minutos. O plasma resultante foi separado e acondicionado em *ependorfs*, sendo armazenado a -70°C para posterior realização das determinações laboratoriais.

3.3. Exames laboratoriais

Todas as determinações laboratoriais foram realizadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, através de protocolo aprovado pelo mesmo sob o código PR-452. Os métodos empregados para tais determinações foram os seguintes:

3.3.1 Exames Bioquímicos:

- Colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicérides: espectrofotometria em aparelho Modular P (Roche Diagnostic, Basileia, Suíça);
- Apolipoproteínas A1 e B: imunoturbidimetria em aparelho Modular P (Roche Diagnostic, Basileia, Suíça);
- Proteína C-reativa: nefelometria em aparelho Nephelometer II (Dade Behring, Alemanha);
- Homocisteína: quimioluminescência em aparelho Immulite 2000 (DPC, Estados Unidos da América);
- Lipoproteína (a): nefelometria, em equipamento BN-100 Nephelometer (Behring, Alemanha).

3.3.2 Exames Imunológicos

- A presença de anticorpos anti-cardiolipina (aCL) IgG e IgM foram analisadas através de ELISA (30). Um resultado positivo foi considerado se maior ou igual a 3 desvios padrão (DP) acima da densidade óptica média para dez soros controles.

- A realização do anticorpo anticoagulante lúpico (LAC) foi de acordo com os *guidelines* da Sociedade Internacional de Hemostasia e Trombose. (Brandt, Triplett et al. 1995)

A realização de todos os exames laboratoriais teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, através do projeto de auxílio-pesquisa número 05/60832-3R

3.4. Protocolo de Estudo

Todas as pacientes e controles foram proibidas de tomar quaisquer bebidas contendo cafeína ou outros estimulantes, bem como de realizar quaisquer atividades físicas no dia da realização dos testes, no sentido de evitar influências de curto prazo sobre os mesmos, conforme recomendação prévia existente na literatura (Van Bortel, Duprez et al. 2002) . Foi permitida a ingestão de refeição leve após a coleta dos exames descritos acima. No início da realização do protocolo, foram aferidos peso e altura das participantes, as quais permaneceram a seguir confortavelmente em repouso na posição supina durante quinze minutos, em sala climatizada com temperatura estável de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.4.1. Velocidade de onda de pulso (VOP)

Após a obtenção dos valores de frequência cardíaca e pressão arterial, a VOP foi determinada usando-se o *Complior* (Colson, França). Trata-se de um dispositivo automático que permite o registro contínuo de ondas de pulso e o cálculo automático da VOP (Asmar, Benetos et al. 1995). Para tanto, as ondas de pulso foram obtidas de forma não-invasiva utilizando-se transdutores de

pressão TY-306-Fukuda, colocados sobre as artérias carótida comum direita e femoral direita. Ambas as ondas de pulso são digitalizadas pelo *Complior* durante a sua aquisição e armazenadas em um *buffer* de memória. Um sistema de pré-processamento automaticamente analisa os ganhos de cada onda de pulso, ajustando-os para que haja equivalência de ambos os sinais. No momento em que o operador observa ondas de pulso de qualidade suficiente na tela do computador, a aquisição pode ser interrompida, permitindo o cálculo, pelo *Complior*, do tempo transcorrido entre as duas ondas de pulso. Esse procedimento foi repetido em pelo menos dez diferentes ciclos cardíacos para cada participante do estudo, sendo que a média dos valores de tempo transcorrido entre as ondas de pulso foi utilizada para a análise final. A distância percorrida pela onda de pulso (denominada "D") foi medida sobre a superfície corporal entre os dois pontos de aquisição das ondas de pulso, enquanto que o tempo transcorrido entre as duas ondas de pulso (denominado "t") foi calculado e fornecido automaticamente pelo *Complior*, permitindo o cálculo da VOP pela fórmula $VOP=D/t$. A validação e a reprodutibilidade desse método foram previamente descritas na literatura, com um coeficiente de repetibilidade intra-observador de 0.935 e um coeficiente de reprodutibilidade inter-observador de 0.890 (Asmar, Benetos et al. 1995) (figuras 1 e 2).



Figura 1 – Aferição da velocidade de onda de pulso no leito carótido-femural através do Complior

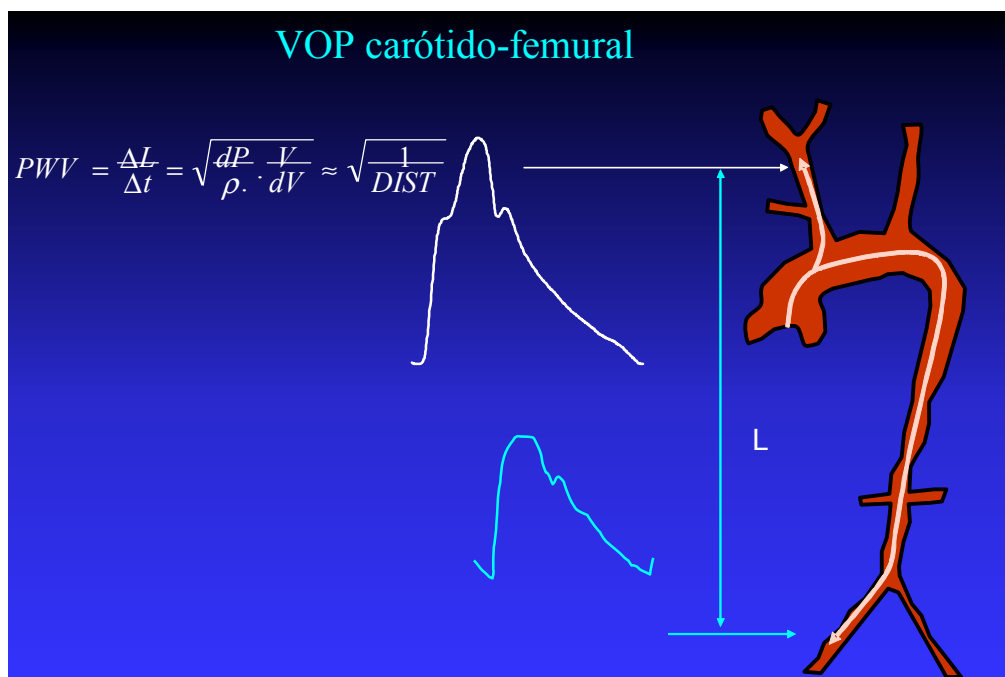


Figura 2 – Fórmula usada para cálculo da VOP considerando a distância e o tempo gastos pela onda de pulso.

3.4.2. *Echo-tracking* da artéria carótida comum

As propriedades da parede vascular da artéria carótida comum foram avaliadas por *echo-tracking* através do *Wall-Track System* (Neurodata, Maastricht; Holanda). Trata-se de um sistema de ultra-som pulsado baseado na análise de sinais de radiofrequência que permite a obtenção contínua dos valores do diâmetro arterial. Tal método já foi descrito, validado e utilizado previamente em estudos clínicos (Hoeks, Brands et al. 1990; Laurent, Caviezel et al. 1994; Hoeks, Willekes et al. 1997). A acurácia desse método é de 30 μm para as medidas do diâmetro arterial diastólico e menor que 1 μm para as variações pulsáteis do diâmetro arterial (ou seja, para as diferenças entre os diâmetros sistólico e diastólico). As medidas foram realizadas na artéria carótida comum direita, dois centímetros abaixo da sua bifurcação, sobre a parede posterior e distante de placa aterosclerótica, caso presente. Duas medidas consecutivas foram realizadas, simultaneamente à determinação da pressão arterial braquial com um esfigmomanômetro. Os valores obtidos usados para análise foram as médias do diâmetro arterial diastólico (" d "), distensão (" Δd ", definida como a diferença entre os diâmetros sistólico e diastólico), EIM e pressão de pulso (" ΔP ", definida como a diferença entre a pressão arterial sistólica e diastólica). Tais parâmetros permitiram o cálculo do coeficiente de distensibilidade (CD), definido como a variação relativa da área de secção transversal do vaso por unidade de pressão, do coeficiente de complacência (CC), definido como a variação absoluta da área de secção transversal do vaso por unidade de pressão, e do módulo elástico (ME), que fornece informações

sobre as propriedades elásticas intrínsecas ao material da parede arterial, conforme as equações abaixo: (Van Bortel, Duprez et al. 2002) (figuras 3,4 e 5)

$$CD = 2.(\Delta d / d) / \Delta P$$

$$CC = \pi.d.\Delta d / 2.\Delta P$$

$$ME = (\Delta P / \Delta d) . (d / EIM)$$

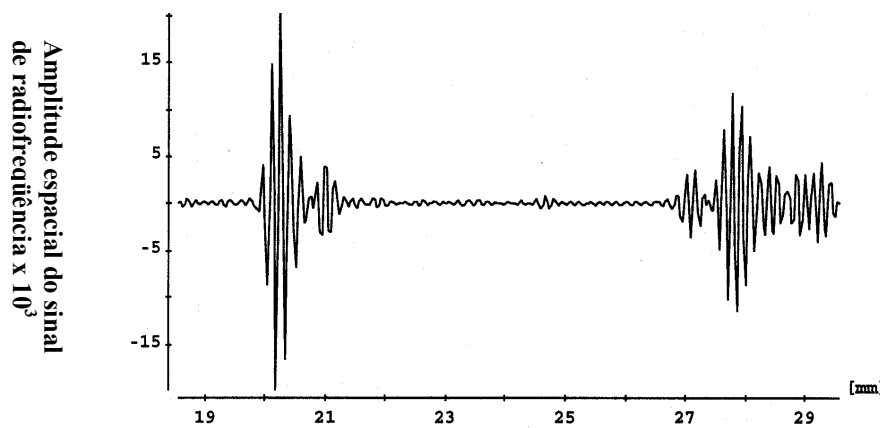


Figura 3-Aferição da espessura íntima-média por echo-tracking da carótida com tradução do sinal ultrasonográfico em radiofrequência.

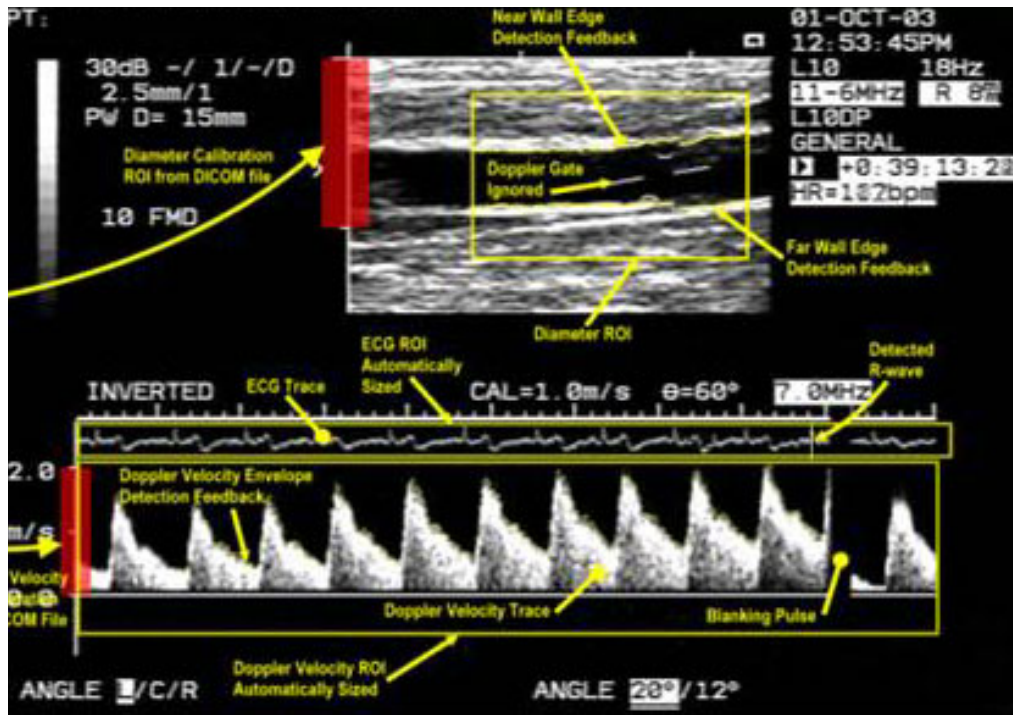


Figura 4- Echo-tracking na carótida para obtenção do diâmetro arterial

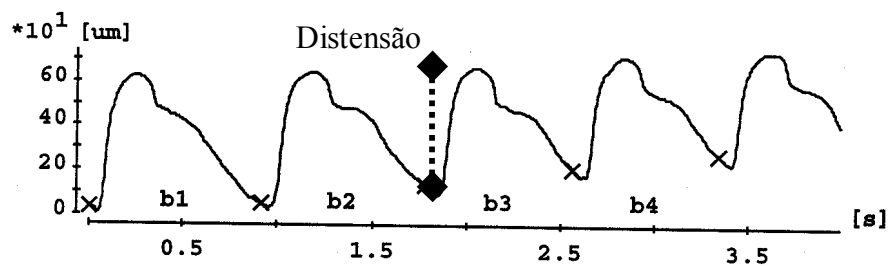


Figura 5 – Curva de variação da distensão da carótida que permite o cálculo dos demais parâmetros como: distensibilidade e diâmetro do vaso.

3.5 Análise estatística

Os resultados serão apresentados na forma de média \pm desvio-padrão. Os dados foram analisados pelo teste t de *Student* ou pelo teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* para avaliar diferenças entre os grupos SAF e controle. Comparações entre proporções foram realizadas através do teste exato de *Fisher*. Correlações entre variáveis numéricas foram calculadas através do teste de correlação linear de *Spearman*. O nível de significância estatística adotado foi $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.RESULTADOS

4.1 Correlações entre VOP e Echo-tracking com parâmetros clínicos e laboratoriais na SAFP

A idade (41.5 ± 9.3 vs. 41.2 ± 10.2 anos, $p=0.92$), raça branca (55.5% vs. 59.25%, $p=1.0$), e IMC (22.7 ± 3.4 vs. 22.6 ± 3.7 kg/m², $p=0.91$) foram semelhantes entre as pacientes com SAFP e os controles, como demonstrado na Tabela 1. As vinte e sete pacientes com SAFP apresentaram em média 2.73 ± 2.03 eventos com um tempo médio de doença de 5.98 ± 4.99 anos e um tempo médio entre o último evento de 6.23 ± 4.99 anos. Eventos exclusivos no leito arterial foram identificados em 12 pacientes com SAFP (44.4%), exclusivos venosos em 11 pacientes (40.8%), e ambos eventos em 4 pacientes (14.8%). Anticorpos anticardiolipina isolados foram detectados em (26%) das pacientes, (37%) apresentavam apenas anticoagulante lúpico, e ambos anticorpos estavam presentes em (37%).

Tabela 1: Dados epidemiológicos das pacientes com SAFP e controles

	SAFP (n=27)	Controles (n=27)	P
Idade (anos)	41.5 ± 9.3	41.2 ± 10.2	0.92
Raça branca (%)	55.5	59.25	1.00
Peso (kg)	59.8 ± 10.6	60.2 ± 11.2	0.89
Altura (m)	1.62 ± 0.08	1.63 ± 0.07	0.68
IMC (kg/m ²)	22.7 ± 3.4	22.6 ± 3.7	0.91
Duração de doença (anos)	5.98 ± 4.99	-	-

Os valores estão expressos em média + desvio padrão ou percentagens
SAFP: Síndrome Antifosfolípide primária; IMC: índice de massa corpórea.

A VOP não foi significativa entre as pacientes e controles ($p=0.34$), conforme demonstrado na tabela 2. O EIM também não foi diferente quando comparados

ambos grupos ($p=0.29$). Além disso, todos os parâmetros do ET como diâmetro da carótida ($p=0.26$), coeficientes de distensibilidade e complacência ($p=0.92$ e $p=0.36$), e o módulo elástico ($p=0.78$) foram similares entre os grupos. As pacientes apresentaram níveis aumentados na pressão sistólica em comparação às controles ($p=0.02$), mas não foi observada significância em relação à pressão diastólica ($p=0.25$) e frequência cardíaca ($p=0.41$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores de velocidade de onda de pulso, echo-tracking e exames laboratoriais em pacientes com SAFP e controles.

	SAFP (n=27)	Controles (n=27)	P
Velocidade de onda de pulso (m/s)	9.07 ± 1.08	9.42 ± 1.47	0.34
Espessamento íntima-média (µm)	650 ± 152	612 ± 109	0.29
Diâmetro diastólico carotídeo (µm)	6566 ± 817	6347 ± 563	0.26
Coef. de distensibilidade (kPa ⁻¹ .10 ³)	23.4 ± 10.5	23.2 ± 9.8	0.92
Coef. de complacência (kPa ⁻¹ .10 ⁻³)	8.23 ± 7.70	7.21 ± 3.19	0.36
Módulo elástico (kPa.10 ³)	1.40 ± 1.30	1.26 ± 0.50	0.78
Pressão arterial sistólica (mmHg)	114.9 ± 13.9	107.2 ± 9.3	0.02
Pressão arterial diastólica (mmHg)	71.3 ± 12.2	68.2 ± 8.5	0.25
Frequência cardíaca (bpm)	84.2 ± 14.2	81.2 ± 12.9	0.41
Colesterol total (mg/dl)	188.0±39.2	154.0 ± 55.1	0.02
HDL (mg/dl)	54.2±18.4	39.0 ± 13.0	<0.01
LDL (mg/dl)	114.5±34.4	91.6 ± 41.5	0.51
VLDL (mg/dl)	19.2± 9.9	23.4 ± 11.7	0.14
Triglicerídeos (mg/dl)	95.9±49.6	116.8 ± 58.2	0.15
Apolipoproteína A1 (mg/dl)	118.7 ± 41.4	149.1 ± 41.0	0.03
Apolipoproteína B (mg/dl)	76.1 ± 23.1	80.9 ± 25.3	0.37
Lipoproteína (a) (mg/dl)	41.6 ± 36.1	52.5 ± 45.7	0.51
Homocisteína (mol/ml)	7.2 ± 4.4	6.7 ± 3.3	0.58
PCR (mg/l)	2.6 ± 2.7	5.3 ± 6.1	0.07

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. SAFP: Síndrome Antifosfolípide primária; PCR: Proteína C Reativa.

Colesterol total ($p=0.02$), HDL ($p=0.002$), e apolipoproteína A1 ($p=0.03$) foram mais baixos nos pacientes com SAFP em relação aos controles, mas não houve diferença significativa entre os grupos em relação à lipoproteína, PCR e níveis de homocisteína (Tabela 2)

4.2 Métodos não-invasivos de acordo com o sítio de trombose

Doze pacientes com eventos arteriais exclusivos apresentaram idade e IMC semelhantes aos pacientes com eventos venosos exclusivos (Tabela 3).

Interessantemente, a VOP foi significativamente maior nas pacientes com eventos arteriais do que naquelas apenas com eventos venosos (9.56 ± 0.94 vs. 8.55 ± 0.70 m/s, $p=0.01$), conforme demonstrado na tabela 3. Entretanto, as médias das pressões sistólicas e diastólicas foram semelhantes entre os grupos assim como a frequência cardíaca. O EIM também não foi diferente quando comparados os grupos ($p=0.52$).

O diâmetro carotídeo, a distensibilidade, o coeficiente de complacência e o módulo elástico também não foram diferentes entre os grupos (tabela 3).

As pacientes com eventos arteriais e venosos exclusivos foram semelhantes em relação ao número de eventos (1.9 ± 1.4 vs. 2.9 ± 1.9 , $p=0.21$), tempo de doença (6.1 ± 5.1 vs. 4.9 ± 4.8 anos, $p=0.45$), e o tempo desde o último evento (6.1 ± 4.7 vs. 6.3 ± 5.8 anos, $p=0.84$).

Os níveis de colesterol total ($p=0.002$), LDL ($p=0.02$) e apolipoproteína B ($p=0.03$) foram mais altos nas pacientes com SAFP com eventos arteriais exclusivos em relação àquelas com eventos venosos exclusivos, e ainda foi observado aumento no HDL ($p=0.001$) e na apolipoproteína A1 ($p=0.003$). Não

foram observadas diferenças significativas em relação à lipoproteína, PCR e níveis de homocisteína. (tabela 3)

Tabela 3-Idade, IMC, VOP, valores do ET e exames laboratorias em pacientes com SAFP de acordo com o sítio de trombose (arterial ou venoso exclusivo).

	Arterial (n=12)	Venoso (n=11)	P
Idade (anos)	44.1 ± 7.0	39.3 ± 9.9	0.23
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	24.6 ± 4.1	25.5 ± 3.1	0.78
Velocidade de onda de pulso (m/s)	9.56 ± 0.94	8.55 ± 0.70	0.01
Espessura íntima-média (µm)	683 ± 171	636 ± 140	0.52
Diâmetro diastólico carotídeo (µm)	6856 ± 956	6334 ± 552	0.25
Coef. de distensibilidade(kPa ⁻¹ .10 ⁻³)	21.3 ± 9.9	24.8 ± 9.4	0.40
Coef. de complacência (kPa ⁻¹ .10 ⁻³)	8.30 ± 5.06	7.93 ± 3.80	0.92
Módulo Elástico (kPa.10 ³)	1.64 ± 1.84	1.13 ± 0.52	0.83
Pressão arterial sistólica (mmHg)	120.3 ± 17.0	112.0 ± 10.2	0.11
Pressão arterial diastólica (mmHg)	73.2 ± 12.3	72.8 ± 9.6	0.92
Frequência cardíaca (bpm)	80.8 ± 12.0	85.4 ± 16.7	0.51
Colesterol total (mg/dl)	187.1 ± 36.5	118.0 ± 49.6	<0.01
HDL (mg/dl)	46.8 ± 7.8	30.5 ± 12.3	<0.01
LDL (mg/dl)	113.0 ± 33.1	68.3 ± 38.0	0.02
VLDL (mg/dl)	27.3 ± 12.7	19.2 ± 9.2	0.64
Triglicérides (mg/dl)	137.0 ± 63.1	95.0 ± 45.4	0.05
Apolipoproteína A1 (mg/dl)	143.5 ± 12.1	91.6 ± 45.4	<0.01
Apolipoproteína B (mg/dl)	86.9 ± 24.5	64.3 ± 15.1	0.03
Lipoproteína (a) (mg/dl)	63.4 ± 50.8	40.0 ± 37.8	0.35
Homocisteína (µmol/ml)	6.3 ± 2.9	7.1 ± 3.9	0.83
PCR (mg/l)	4.6 ± 5.4	6.0 ± 7.0	0.52

Os valores estão expressos em média ± desvio padrão. IMC: Índice de massa corpórea; VOP: velocidade de onda de pulso; ET: echo-tracking; PCR: Proteína C Reativa

4.3 Associação da VOP e do EIM com os parâmetros clínicos e laboratoriais

A VOP foi positivamente relacionada à idade ($r=0.584$, $p=0.001$) e ao diâmetro do vaso ($r=0.407$, $p=0.04$) (Tabela 4). Além disso, a VOP foi positivamente correlacionada aos níveis de colesterol total ($r=0.507$, $p=0.01$), LDL ($r=0.402$, $p=0.05$), e triglicérides ($r=0.583$, $p=0.003$). Entretanto, não foram observadas correlações significativas com outros parâmetros clínicos e laboratoriais, incluindo a homocisteína e PCR (Tabela 4).

Tabela 4 - Correlações entre VOP com idade, IMC, pressão arterial, parâmetros laboratoriais e do ET.

	VOP	
	r	P
Idade	0.584	0.001
IMC	0.105	0.60
EIM	0.296	0.13
Pressão arterial sistólica	0.360	0.06
Pressão arterial diastólica	0.232	0.24
Diâmetro diastólico carotídeo	0.407	0.04
Distensibilidade	-0.080	0.69
Colesterol Total	0.507	0.01
HDL	0.287	0.18
LDL	0.402	0.05
VLDL	0.570	0.004
Triglicérides	0.583	0.003
Apolipoproteína A1	0.397	0.06
Apolipoproteína B	0.380	0.07
Lipoproteína (a)	-0.094	0.66
Homocisteína	0.043	0.84

IMC: Índice de Massa Corpórea; VOP: Velocidade de Onda de Pulso;
EIM: Espessamento Íntima-Média; ET: *Echo-tracking*

Conforme demonstrado na tabela 5, o EIM apresenta uma correlação positiva com o diâmetro do vaso ($r=0.393$, $p=0.04$) e com a distensibilidade ($r=0.373$, $p=0.05$). Não houve nenhuma outra correlação entre o EIM e os parâmetros laboratoriais (Tabela 5).

Tabela 5 - Correlações entre o espessamento da íntima-média com VOP, idade, IMC, pressão arterial, parâmetros laboratoriais e do ET.

	EIM	
	R	P
idade	0.039	0.85
IMC	0.105	0.60
VOP	0.296	0.13
Pressão arterial sistólica	0.046	0.82
Pressão arterial diastólica	0.04	0.82
Diâmetro do vaso	0.393	0.04
Distensibilidade	0.373	0.05
Colesterol total	0.203	0.35
HDL	-0.172	0.43
LDL	0.146	0.51
VLDL	0.397	0.06
Triglicérides	0.392	0.06
Apolipoproteína A1	-0.078	0.72
Apolipoproteína B	0.219	0.31
Lipoproteína (a)	0.108	0.62
Homocisteína	-0.128	0.56
PCR	0.030	0.89

IMC: Índice de Massa Corpórea; VOP: Velocidade de Onda de Pulso;

EIM: Espessamento Íntima-Média; ET: *Echo-tracking*; PCR: Proteína C Reativa

5. DISCUSSÃO

5.DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo que demonstrou através de VOP e ET que pacientes com SAFP com eventos arteriais apresentam aumento na rigidez arterial.

A grande vantagem desse estudo foi a apurada seleção das pacientes com SAFP, que permitiu que fosse evidenciada a importância da progressão da rigidez vascular em pacientes com eventos arteriais exclusivos.

Todos os outros fatores relacionados à doença por si só como: duração da doença, número de eventos, tempo desde a última trombose e a frequência de anticorpos antifosfolípidos foram avaliados. Os fatores de risco tradicionais como diabetes mellitus, dislipidemia previa, obesidade, menopausa e tabagismo foram todos excluídos (Benetos, Waeber et al. 2002) para que não pudessem interferir com o aumento na rigidez arterial. Por essa restrição na seleção, nossas pacientes com SAFP apresentaram níveis mais baixos de colesterol total de HDL e apolipoproteína A1 em relação às controles, já demonstrado em estudos prévios. (Becarevic, Singh et al. 2007; de Souza, Silva et al. 2007).

Por esse mesmo motivo, pacientes com pressão descontrolada e da raça negra foram excluídos pela importante influência que podem exercer na VOP (Hashimoto, Chonan et al. 2002).

Devido ao princípio que, a onda de pulso propaga mais rapidamente nas artérias rígidas, a medida da VOP é considerada o melhor método para avaliação da rigidez arterial. (Guerin, Blacher et al. 2001; Benetos, Adamopoulos et al. 2002; Safar, Levy et al. 2003).

Já foi demonstrado que esse método não-invasivo pode também determinar a progressão da aterosclerose. (Farrar, Bond et al. 1991; Wang, Tsai et al. 2005). Recentemente, *Manzi e cols.* demonstraram que no Lupus a VOP é uma medida confiável para detectar alterações compatíveis com dano vascular precoce. (Selzer, Sutton-Tyrrell et al. 2001)

Além disso, foi demonstrada uma forte associação entre o dano anatômico na parede do vaso e as propriedades vasculares funcionais do endotélio em pacientes com Lupus, enfatizando a importância desses métodos diagnósticos capazes de avaliar as propriedades dinâmicas funcionais da parede arterial. (Selzer, Sutton-Tyrrell et al. 2004).

De forma interessante, demonstramos no presente estudo que pacientes com Síndrome Antifosfolípide Primária com trombose arterial apresentaram uma maior VOP que aquelas pacientes com trombose venosa exclusiva. Esse grupo com eventos artérias exclusivos apresentou níveis mais altos de triglicérides, colesterol total e LDL do que o grupo com eventos venosos exclusivos, entretanto ainda dentro do limite de normalidade. Não houve diferença em relação à idade, IMC e PS entre os dois grupos, fatores implicados como promotores de rigidez arterial.

Notadamente, outros fatores específicos da doença como frequência de anticorpo antifosfolípide, duração de doença, número e tempo desde o último evento trombótico não estiveram relacionados à VOP.

O local da trombose poderia ser um possível fator relacionado ao aumento da VOP em pacientes com eventos arteriais visto que a maioria deles

sofreu acidente vascular cerebral (AVC). Confirmando essa hipótese, a rigidez arterial já foi identificada com um fator independente de AVC (Laurent, Katsahian et al. 2003; Laurent and Boutouyrie 2005).

No presente estudo, a VOP nas pacientes com SAFP foi positivamente correlacionada à idade, triglicérides, e níveis de colesterol total e LDL, conforme também observado na população normal em outros estudos. (Giral, Atger et al. 1994; Wilkinson, Prasad et al. 2002)

A disfunção endotelial é o primeiro estágio da rigidez arterial, previamente à DMF Charakida M 2006; Stalc, Poredos et al. 2006) e o ITB (Baron, Khamashta et al. 2005; Christodoulou, Zain et al. 2006) foram utilizados em pacientes com SAFP para identificar estágios iniciais de aterosclerose. Essas alterações funcionais ocorrem de forma antecipada em relação às alterações estruturais vasculares.

Nesse estudo, não foi observado um aumento no EIM nas pacientes. De forma contrária, estudos anteriores demonstraram esse aumento, entretanto não houve exclusão dos fatores de risco tradicionais (Ames, Margarita et al. 2005; Jimenez, Garcia-Criado et al. 2005) e o envelhecimento vascular não foi considerado (Medina, Casaos et al. 2003) . De fato, variações no EIM podem ser explicados pela idade e aumento na PS.

Interessantemente, estudos prévios demonstraram a associação íntima entre DV e idade em indivíduos expostos a remodelamento vascular contínuo (Glagov, Bassiouny et al. 1997; Sasaki, Yamano et al. 2002; Prandoni, Bilora et al. 2003). No nosso estudo demonstramos a associação entre VOP, EIM e DV. Anteriormente já foi demonstrada a associação entre o aumento no

diâmetro aórtico, envelhecimento e a degeneração dos elementos elásticos da parede da aorta.(Vasan, Larson et al. 1995; Bella, Wachtell et al. 2002) A consequência do processo de degeneração vascular é o aumento na rigidez arterial, chamada arteriosclerose. Nossos achados sugerem que as pacientes com SAFP são expostas a um contínuo processo de envelhecimento vascular caracterizado por arteriopatia da camada média dos vasos. (Christodoulou, Sangle et al. 2007)

Esse estudo demonstrou claramente que a VOP é um método sensível, não-invasivo para detectar rigidez arterial precoce na SAF primária, particularmente naqueles indivíduos com eventos arteriais. O valor diagnóstico da avaliação da rigidez arterial necessita ser confirmado em estudos longitudinais para melhor determinação dos fatores de risco e do papel da doença.

6. CONCLUSÕES

6.CONCLUSÕES

A velocidade de onda de pulso (VOP) das pacientes com SAFP foi semelhante à das controles. Os parâmetros do *echo-tracking* não foram capazes de identificar as alterações funcionais da parede vascular entre as pacientes com SAFP e controles.

As pacientes com SAFP e eventos arteriais exclusivos apresentaram maior velocidade de onda de pulso (VOP) do que as pacientes com eventos venosos exclusivos. Não houve diferença nos parâmetros do *echo-tracking* quando as pacientes foram subdivididas de acordo com o leito de trombose.

7. ANEXOS

7.1- ANEXO 1- PROTOCOLO DE COLETA DOS DADOS DE AMBULATÓRIO

Protocolo SAFP

Nome:

Tel:

Registro:

Idade:

Raça

D.N:

DX:

Tdx:

Eventos Clínicos:

TVP:

TEP:

T.Art:

AVC:

Aborto:

P.P:

Outros:

Drogas em uso / Tempo de uso / Dose atual:

AAS: /

Marevan: /

Heparina:

C.E: /

Outros:

Sorologia:

	data								
Acl G									
Acl M									
Aço									
B2m									

	data								
Acl G									
Acl M									
Aço									
B2m									

Data do evento trombótico

TAP									
PTTK									

Coagulograma atual: TAP:

PTTK:

Peso:

Altura:

p.a:

VOP:

7.2 ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO PACIENTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE:
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE(.....):

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Avaliação não invasiva das propriedades da parede arterial em pacientes com Síndrome Antifosfolípide.

PESQUISADOR: **Danieli Castro Oliveira de Andrade**

CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **106408**

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Reumatologia do HC- FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses.

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

A doença Síndrome Antifosfolípide pode afetar o coração e os vasos sanguíneos dos pacientes. O envelhecimento dos vasos pode acontecer antes do tempo e por isso devemos fazer exames para prevenir o problema. Os exames que fazemos nesse estudo são de coleta de sangue para dosar a gordura, de ultrassom para medir o endurecimento dos vasos e avaliação do pulso dos vasos do pescoço e da virilha. Quando for coletado o sangue poderá acontecer pequeno arroxamento no local da coleta, mas nenhum dos outros exames vai te causar dor ou te furar. Assim vamos saber se você precisa tratar algum outro problema que a doença pode causar.

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

A qualquer momento você poderá tirar dúvidas a respeito das avaliações e dos resultados do estudo. Se, por acaso, você resolver desistir de participar da pesquisa, não haverá qualquer punição ou prejuízo à continuidade do tratamento médico. A sua identidade será preservada. Todas as informações obtidas durante o estudo serão escritas em fichas numeradas e apenas o pesquisador terá acesso a elas. Se houver qualquer problema ou dúvida, você poderá entrar em contato com Dra. Danieli Castro O. De Andrade pelo telefone 3069-6384 (que é o telefone do ambulatório onde você recebe o tratamento médico).

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra. Danieli Castro O. de Andrade

Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Ambulatório de Reumatologia- Prédio dos Ambulatórios- 5º andar- Sala 4^A

Telefone:30696384

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2004 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

8. REFERÊNCIAS

Referências

- Alan, S., M. S. Ulgen, et al. (2003). "Relation between coronary artery disease, risk factors and intima-media thickness of carotid artery, arterial distensibility, and stiffness index." Angiology 54(3): 261-7.
- Ames, P. R., A. Margarita, et al. (2005). "Premature atherosclerosis in primary antiphospholipid syndrome: preliminary data." Ann Rheum Dis 64(2): 315-7.
- Ames, P. R., K. Sokoll, et al. (2004). "Atherosclerosis in primary antiphospholipid syndrome." Ann Rheum Dis 63(5): 610-1; author reply 610-11.
- Arnett, D. K., G. W. Evans, et al. (1994). "Arterial stiffness: a new cardiovascular risk factor?" Am J Epidemiol 140(8): 669-82.
- Asmar, R., A. Benetos, et al. (1995). "Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies." Hypertension 26(3): 485-90.
- Baron, M. A., M. A. Khamashta, et al. (2005). "Prevalence of an abnormal ankle-brachial index in patients with primary antiphospholipid syndrome: preliminary data." Ann Rheum Dis 64(1): 144-6.
- Becarevic, M., S. Singh, et al. (2007). "Lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) in primary antiphospholipid syndrome." Clin Biochem 40(5-6): 317-20.
- Bella, J. N., K. Wachtell, et al. (2002). "Relation of left ventricular geometry and function to aortic root dilatation in patients with systemic hypertension and left ventricular hypertrophy (the LIFE study)." Am J Cardiol 89(3): 337-41.
- Benetos, A., C. Adamopoulos, et al. (2002). "Determinants of accelerated progression of arterial stiffness in normotensive subjects and in treated hypertensive subjects over a 6-year period." Circulation 105(10): 1202-7.
- Benetos, A., B. Waeber, et al. (2002). "Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications." Am J Hypertens 15(12): 1101-8.
- Bilora, F., V. Boccioletti, et al. (2002). "Are antiphospholipid antibodies an independent risk factor for atherosclerosis?" Clin Appl Thromb Hemost 8(2): 103-13.
- Blacher, J., B. Pannier, et al. (1998). "Carotid arterial stiffness as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in end-stage renal disease." Hypertension 32(3): 570-4.
- Bombeli, T., A. Karsan, et al. (1997). "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant." Blood 89(7): 2429-42.

Bots, M. L., A. W. Hoes, et al. (1997). "Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study." Circulation 96(5): 1432-7.

Boutouyrie, P., S. Laurent, et al. (1995). "Common carotid artery stiffness and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients." Hypertension 25(4 Pt 1): 651-9.

Brandt, J. T., D. A. Triplett, et al. (1995). "Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH." Thromb Haemost 74(4): 1185-90.

Brodzki, J., C. Bengtsson, et al. (2004). "Abnormal mechanical properties of larger arteries in postmenopausal women with systemic lupus erythematosus." Lupus 13(12): 917-23.

Chapman, J., J. H. Rand, et al. (2003). "Non-stroke neurological syndromes associated with antiphospholipid antibodies: evaluation of clinical and experimental studies." Lupus 12(7): 514-7.

Charakida M, H. J., Sangle S *et al.* (2006). "Preclinical atherosclerotic phenotype in patients with primary antiphospholipid syndrome " Rheumatology (Oxford).

Christodoulou, C., S. Sangle, et al. (2007). "Vasculopathy and arterial stenotic lesions in the antiphospholipid syndrome." Rheumatology (Oxford).

Christodoulou, C., M. Zain, et al. (2006). "Prevalence of an abnormal ankle-brachial index in patients with antiphospholipid syndrome with pregnancy loss but without thrombosis: a controlled study." Ann Rheum Dis 65(5): 683-4.

Davies RJ, S. S., Khamashta MA, D'Cruz DP (2006). "Antiphospholipid (Hughes) syndrome and atheroma." Lupus 15(S1): 55-58

de Souza, A. W., N. P. Silva, et al. (2007). "Impact of hypertension and hyperhomocysteinemia on arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome." Lupus 16(10): 782-7.

Ekdahl, K. N., A. A. Bengtsson, et al. (2004). "Thrombotic disease in systemic lupus erythematosus is associated with a maintained systemic platelet activation." Br J Haematol 125(1): 74-8.

Farrar, D. J., M. G. Bond, et al. (1991). "Anatomic correlates of aortic pulse wave velocity and carotid artery elasticity during atherosclerosis progression and regression in monkeys." Circulation 83(5): 1754-63.

Giral, P., V. Atger, et al. (1994). "A relationship between aortic stiffness and serum HDL3 cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic, symptom-free men. The PCVMETRA Group (Groupe de Prevention Cardiovasculaire en Medecine du Travail)." J Cardiovasc Risk 1(1): 53-8.

Glagov, S., H. S. Bassiouny, et al. (1997). "Mechanical determinants of plaque modeling, remodeling and disruption." Atherosclerosis 131 Suppl: S13-4.

Guerin, A. P., J. Blacher, et al. (2001). "Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure." Circulation 103(7): 987-92.

Halevy, D., J. Radhakrishnan, et al. (2002). "Thrombotic microangiopathies." Crit Care Clin 18(2): 309-20, vi.

Hashimoto, J., K. Chonan, et al. (2002). "Pulse wave velocity and the second derivative of the finger photoplethysmogram in treated hypertensive patients: their relationship and associating factors." J Hypertens 20(12): 2415-22.

Hodes, R. J., E. G. Lakatta, et al. (1995). "Another modifiable risk factor for cardiovascular disease? Some evidence points to arterial stiffness." J Am Geriatr Soc 43(5): 581-2.

Hodis, H. N., W. J. Mack, et al. (1998). "The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events." Ann Intern Med 128(4): 262-9.

Hoeks, A. P., P. J. Brands, et al. (1990). "Assessment of the distensibility of superficial arteries." Ultrasound Med Biol 16(2): 121-8.

Hoeks, A. P., C. Willekes, et al. (1997). "Automated detection of local artery wall thickness based on M-line signal processing." Ultrasound Med Biol 23(7): 1017-23.

Hughes, G. R. (2003). "Migraine, memory loss, and "multiple sclerosis ". Neurological features of the antiphospholipid (Hughes') syndrome." Postgrad Med J 79(928): 81-3.

Hunt, B. J. and M. A. Khamashta (2000). "Antiphospholipid antibodies and the endothelium." Curr Rheumatol Rep 2(3): 252-5.

Jimenez, S., M. A. Garcia-Criado, et al. (2005). "Preclinical vascular disease in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome." Rheumatology (Oxford) 44(6): 756-61.

Laurent, S. (2006). "Surrogate measures of arterial stiffness: do they have additive predictive value or are they only surrogates of a surrogate?" Hypertension 47(3): 325-6.

Laurent, S. and P. Boutouyrie (2005). "Arterial stiffness and stroke in hypertension: therapeutic implications for stroke prevention." CNS Drugs 19(1): 1-11.

Laurent, S., P. Boutouyrie, et al. (2001). "Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients." Hypertension 37(5): 1236-41.

Laurent, S., B. Caviezel, et al. (1994). "Carotid artery distensibility and distending pressure in hypertensive humans." Hypertension 23(6 Pt 2): 878-83.

Laurent, S., S. Katsahian, et al. (2003). "Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension." Stroke 34(5): 1203-6.

Lemogoum, D., L. Van Bortel, et al. (2006). "Ethnic differences in arterial stiffness and wave reflections after cigarette smoking." J Hypertens 24(4): 683-9.

Lockshin, M. D., L. R. Sammaritano, et al. (2000). "Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome." Arthritis Rheum 43(2): 440-3.

Medina, G., D. Casaos, et al. (2003). "Increased carotid artery intima-media thickness may be associated with stroke in primary antiphospholipid syndrome." Ann Rheum Dis 62(7): 607-10.

Prandoni, P., F. Bilora, et al. (2003). "An association between atherosclerosis and venous thrombosis." N Engl J Med 348(15): 1435-41.

Rajagopalan, S., E. C. Somers, et al. (2004). "Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity." Blood 103(10): 3677-83.

Raschi, E., C. Testoni, et al. (2003). "Endothelium activation in the anti-phospholipid syndrome." Biomed Pharmacother 57(7): 282-6.

Roman, M. J., J. E. Salmon, et al. (2001). "Prevalence and relation to risk factors of carotid atherosclerosis and left ventricular hypertrophy in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibody syndrome." Am J Cardiol 87(5): 663-6, A11.

Safar, M. E., B. I. Levy, et al. (2003). "Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases." Circulation 107(22): 2864-9.

Salomaa, V., W. Riley, et al. (1995). "Non-insulin-dependent diabetes mellitus and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness indexes. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study." Circulation 91(5): 1432-43.

Sasaki, R., S. Yamano, et al. (2002). "Vascular remodeling of the carotid artery in patients with untreated essential hypertension increases with age." Hypertens Res 25(3): 373-9.

Segal, J., T. Kickler, et al. (2000). "Tissue factor activity in patients with systemic lupus erythematosus: association with disease activity." J Rheumatol 27(12): 2827-32.

Selzer, F., K. Sutton-Tyrrell, et al. (2001). "Vascular stiffness in women with systemic lupus erythematosus." Hypertension 37(4): 1075-82.

Selzer, F., K. Sutton-Tyrrell, et al. (2004). "Comparison of risk factors for vascular disease in the carotid artery and aorta in women with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum 50(1): 151-9.

Shoenfeld, Y., S. Lev, et al. (2004). "Features associated with epilepsy in the antiphospholipid syndrome." J Rheumatol 31(7): 1344-8.

Stalc, M., P. Poredos, et al. (2006). "Endothelial function is impaired in patients with primary antiphospholipid syndrome." Thromb Res 118(4): 455-61.

Van Bortel, L. M., D. Duprez, et al. (2002). "Clinical applications of arterial stiffness, Task Force III: recommendations for user procedures." Am J Hypertens 15(5): 445-52.

Vasan, R. S., M. G. Larson, et al. (1995). "Echocardiographic reference values for aortic root size: the Framingham Heart Study." J Am Soc Echocardiogr 8(6): 793-800.

Wada, T., K. Kodaira, et al. (1994). "Correlation of ultrasound-measured common carotid artery stiffness with pathological findings." Arterioscler Thromb 14(3): 479-82.

Wang, M. C., W. C. Tsai, et al. (2005). "Stepwise increase in arterial stiffness corresponding with the stages of chronic kidney disease." Am J Kidney Dis 45(3): 494-501.

Wilkinson, I. B., K. Prasad, et al. (2002). "Increased central pulse pressure and augmentation index in subjects with hypercholesterolemia." J Am Coll Cardiol 39(6): 1005-11.

9. APÉNDICE

Premature Vascular Stiffness in Primary Antiphospholipid Syndrome

Danieli C.O Andrade¹, Luiz A. Bortolotto², Eloisa Bonfá¹, Eduardo F. Borba¹

¹Danieli Castro O. de Andrade, M.D., Research Fellow; Eloisa Bonfá, M.D., Ph.D., Full Professor; Eduardo F. Borba, M.D., Ph.D., Assistant Professor: Rheumatology Division of São Paulo University, São Paulo, SP, Brazil.

²Luiz A. Bortolotto, M.D., Ph.D., Assistant Professor: Heart Institute of São Paulo University, São Paulo, SP, Brazil.

Address correspondence:

Danieli Castro O. de Andrade, M.D.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Disciplina de Reumatologia

Av. Dr. Arnaldo 455, 3^o andar, Sala 3133, São Paulo – SP – Brazil.

CEP: 01246-903. FAX: 55-11-30617490

E-mail: reumato@usp.br

Abstract

Objective: Premature and accelerated atherosclerosis has been recently recognized as an additional vascular damage in Primary Antiphospholipid Syndrome (PAPS). These patients could benefit from non-invasive diagnostic methods to detect atherosclerosis as the Pulse Wave Velocity (PWV) and the *Echo-Tracking* (ET) device. By precise measurement of arterial stiffness, these methods output an indirect way to evaluate the vascular wall lesion progression. Our main objective was to evaluate premature atherosclerosis in PAPS.

PATIENTS AND METHODS: 27 female patients with PAPS (*Sapporo* criteria) and 27 age-, body mass index- and sex-matched controls were consecutively selected. All PAPS patients had previous thrombosis and were subdivided according to the type of vascular exclusive event: arterial (n=12) and venous (n=11). Exclusion criteria were: black race, uncontrolled hypertension, smoking, diabetes, previous dyslipidemia, other thrombophilias, vascular and collagen diseases, corticosteroids and statins use pregnancy, menopause, and obesity (BMI>30 m/kg²). All subjects underwent the PWV in femoral-carotid bed (*Complior*) and *echo-tracking* by a Wall Track System in carotid bed to analyze vascular wall functional properties.

RESULTS: Both groups PAPS and controls did not show any difference regarding age (41.5 ± 9.3 vs. 41.2 ± 10.2 years; p=0.92) and BMI (22.7 ± 3.4 vs. 22.6 ± 3.7 kg/m²; p=0.91). All PAPS patients had PWV values similar to controls (p=0.34). Intima-media thickness was also similar between groups (p=0.29) as well as all the other echo tracking parameters such as carotid

diameter ($p=0.26$), distensibility ($p=0.92$), compliance coefficients ($p=0.36$), and elastic modulus ($p=0.78$) were similar among groups. A higher systolic blood pressure was observed in PAPS patients than controls ($p=0.02$). According to the site of thrombosis, PAPS patients with exclusive arterial events showed a higher PWV compared to those with venous ($p=0.01$) but had similar intima-media thickness ($p=0.52$). Both results were not influenced by age or disease duration. Multivariate analysis in PAPS showed that PWV was related to age ($r=0.584$; $p=0.001$) and blood vessel diameter (VD) ($r=0.407$; $p=0.04$). Moreover, PWV did also positively correlated with total cholesterol ($r=0.507$, $p=0.01$), LDL ($r=0.402$, $p=0.05$), and triglycerides ($r=0.583$, $p=0.003$). IMT had a positive correlation with blood vessel diameter (VD) ($r=0.393$; $p=0.04$) and distensibility ($r=0.373$; $p=0.05$).

CONCLUSION: Atherosclerosis in PAPS has a peculiar course with an early onset, remarkably in those patients with arterial events. PWV was a sensible method to detect impaired functional vessel related to stiffness since no significant changes were observed in mechanical vascular properties by Echo-Tracking (ET) device.

Descriptors: 1-Antiphospholipid syndrome, 2-atherosclerosis, 3-ultrasonography, 4- pulse, 5- risk factors.

Running title: Early atherosclerosis detection in PAPS

Introduction

Primary Antiphospholipid Syndrome (PAPS) is now recognized as a systemic vasculopathy involving complex interaction between endothelial cells, platelets, inflammation, antiphospholipid antibodies, and coagulation cascades.(Hunt and Khamashta 2000; Halevy, Radhakrishnan et al. 2002; Raschi, Testoni et al. 2003) Besides the hazardous consequences of acute thrombotic events, the high PAPS morbidity can also be due to its chronic cumulative damage in vascular bed.

In fact, thrombosis is considered the main feature of PAPS and has been implicated to accelerated atherosclerosis in autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus. (Bombeli, Karsan et al. 1997; Segal, Kickler et al. 2000; Ekdahl, Bengtsson et al. 2004; Rajagopalan, Somers et al. 2004; Davies RJ 2006; Christodoulou, Sangle et al. 2007)

Despite all these evidences, there are few studies that addressed atherosclerosis in PAPS.(Roman, Salmon et al. 2001; Bilora, Boccioletti et al. 2002; Medina, Casaos et al. 2003; Ames, Sokoll et al. 2004; Ames, Margarita et al. 2005)

Endothelial dysfunction is the first stage of atherosclerosis and seems to be a sensitive marker for its development. Functional vessel properties can be dynamically evaluated by new methods such as flow mediated dilation (FMD), ankle-brachial index (ABI), pulse wave velocity (PWV), and ultrasonic echo tracking that provide a reliable evaluation of arterial stiffness .(Chapman, Rand et al. 2003; Shoenfeld, Lev et al. 2004)

There is a growing body of evidence that increased arterial stiffness is directly associated with cardiovascular morbidity and should be considered as an independent risk factor for cardiovascular event. (Arnett, Evans et al. 1994; Hodes, Lakatta et al. 1995; Salomaa, Riley et al. 1995; Blacher, Pannier et al. 1998; Laurent, Boutouyrie et al. 2001) In fact, Medina *et al.* showed that PAPS patients have a high prevalence of increased carotid IMT which was also related to the number of arterial events, especially stroke, even in those without atherosclerotic plaques.(Medina, Casaos et al. 2003) In previous studies, vascular stiffness determined by PWV identified the degree of vascular injury independent of traditional risk factors, provided risk stratification for atherosclerosis and had a prognostic values in patients with coronary artery disease .(Boutouyrie, Laurent et al. 1995; Laurent, Boutouyrie et al. 2001; Hughes 2003; Laurent 2006). In addition wall arteries dysfunction have been demonstrated to be reduced in patients with hypertension and coronary disease.(Laurent, Caviezel et al. 1994; Alan, Ulgen et al. 2003)

Considering the presence of multiple pro-atherosclerotic factors in PAPS but lack of studies that evaluated arterial stiffness in this disease, our main objective was to determine pre-atherosclerotic lesions in PAPS patients by non-invasive methods and establish to role of thrombotic manifestations in these vascular lesions.

Patients and Methods

Twenty-seven primary APS patients regularly followed at the Rheumatology Division of the University of São Paulo were consecutively selected between 2004-2005. All patients fulfilled the *Sapporo* diagnostic criteria (Lockshin, Sammaritano et al. 2000). Exclusion criteria were age \geq 55 years, black race, uncontrolled arterial hypertension (systolic and diastolic blood pressure \geq 140 and 90 mmHg, respectively), previous dyslipidemia, cardiac insufficiency, aortic disease, coronary or cerebrovascular disease of another etiology, other thrombophilias or collagen diseases, diabetes mellitus, corticosteroid and statin use, body mass index \geq 30 Kg/m², and current smoking. All patients were on regular warfarin anticoagulation with international normalized ratio around 3.0 (range 2.5-3.5) recommended for the site of thrombosis. PAPS patients were subsequently divided in exclusive arterial and exclusive venous groups according to thrombotic event. Twenty-seven normal controls age, sex and BMI-matched were selected according to the same exclusion criteria.

Clinical data were obtained by extensive chart review and consists of site and number of thrombosis, time since last event, disease duration, and drugs in current use.

Participation in this study consisted of an interview, laboratory and non-invasive cardiovascular exams. All patients provided written informed consent, and the study was approved by the medical institutional review board.

Study protocol:

All patients and controls were not allowed to drink beverages containing caffeine or any stimulant, or to perform any physical activity on the protocol day in order to avoid short-term influences on the tests, as previously recommended (Van Bortel, Duprez et al. 2002). All subjects were allowed to have a light meal 2 to 3 hours before undergoing the tests. At the beginning of the protocol height and weight were assessed, and then subjects comfortably rested in supine position for 15 minutes in an acclimatized room (with stable temperature at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Pulse Wave Velocity (PWV): After heart rate and blood pressure determinations, PWV was determined using the Complior* (Colson, France) as an automatic device which allowed on-line pulse wave recording and also automatic PWV calculation (Asmar, Benetos et al. 1995). Briefly, common carotid artery and femoral artery pressure waveforms were recorded non-invasively using a TY-306-Fukuda pressure-sensitive transducer (Fukuda, Tokyo, Japan). The two pressure waveforms were digitized at the sample acquisition (frequency of 500 Hz) and then stored in a memory buffer. A preprocessing system automatically analyzed the gain in each waveform and adjusted it for equality of the two signals. Details of this procedure have been previously published (Asmar, Benetos et al. 1995). When the operator observed a pulse waveform of sufficient quality on the computer screen, digital register was stopped and then

the delay time between the two pressure upstrokes was calculated. This procedure of measurement was repeated in over at least 10 different cardiac cycles and the mean was used for final analysis. The distance traveled by the pulse wave was measured over the body surface as the distance between the two recording sites (D), while pulse transit time (t) was automatically determined by Complior* which calculated PWV as $PWV=D/t$. The validation and reproducibility of this automatic method have been previously described, with an intra-observer repeatability coefficient of 0.935 and an inter-observer reproducibility coefficient of 0.890 (Asmar, Benetos et al. 1995).

Common carotid echo-tracking: The vessel wall properties of the common carotid artery (CCA) were assessed by a pulsed ultrasound echo-tracking system (Wall-Track System; Neurodata, Maastricht; The Netherlands), based on the radiofrequency signal analysis that has been described, validated and used in previous clinical studies (Hoeks, Brands et al. 1990; Laurent, Caviezel et al. 1994; Hoeks, Willekes et al. 1997). The accuracy of the system is 30 μm for the diastolic diameter measurement and $<1 \mu\text{m}$ for the pulsatile change in diameter (difference between systolic and diastolic diameters). Measurements were performed in the right CCA, 2 cm below bifurcation, at the posterior wall and far from an atherosclerotic plaque if present. Two consecutive measurements were performed in parallel with brachial arterial pressure determination using a sphygmomanometer. The mean values of arterial diastolic diameter (d), distension (Δd , defined as the difference between systolic and diastolic diameter), intima-media thickness (IMT), and pulse pressure (ΔP , defined as

the difference between systolic and diastolic arterial pressure) were used for analysis. These parameters allowed calculation of the distensibility coefficient (DC) (defined as the relative change in cross-sectional area of the vessel per unit of pressure), the compliance coefficient (CC) (defined as the absolute change in cross-sectional area of the vessel per unit of pressure), and the elastic incremental modulus (Einc) (which gives information on the intrinsic properties of the arterial wall biomaterial), according to the following equations:(Van Bortel, Duprez et al. 2002)

$$DC = 2.(\Delta d / d) / \Delta P$$

$$CC = \pi.d.\Delta d / 2.\Delta P$$

$$Einc = (\Delta P / \Delta d) . (d / IMT)$$

Laboratory evaluation

All PAPS patients and controls were in their usual diet and were fasting for at least 12 hours at the beginning of the study. Blood samples were obtained immediately before PWV and echo-tracking for baseline biochemical analysis. Plasma total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL) and triglycerides (TG) were measured by spectrophotometry on a Modular P analyzer (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland). Apolipoproteins A1 and B were assayed by immunoturbidimetry on the same analyzer. C-

reactive protein was determined on a Nephelometer II (Dade Behring, Germany), Apolipoprotein (a) was assayed on a Nephelometer BN-100 (Dade Behring, Germany) and homocysteine was measured on an Immulite 2000 analyzer (DPC, USA).

Serum immunological analysis

Presence of IgG and IgM anticardiolipin antibodies (aCL) was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay as described elsewhere (30). A positive result was defined as greater than or equal to 3 SD above the mean optical density (OD) for ten normal control sera. Lupus anticoagulants (LA) was performed according to the guidelines of International Society for Thrombosis and Hemostasis.(Brandt, Triplett et al. 1995)

Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm SD. Data were analyzed by Student's T-test or Mann-Whitney's U-test to evaluate differences between PAPS and controls. Comparisons between proportions were calculated using Fisher's exact test. Correlations between numeric variables were calculated using Spearman's rank correlation test. Statistical significance was set as $p < 0.05$.

Results

Distribution of age (41.5 ± 9.3 vs. 41.2 ± 10.2 years, $p=0.92$), white race (55.5% vs. 59.25%, $p=1.0$), and body mass index (BMI) (22.7 ± 3.4 vs. 22.6 ± 3.7 kg/m², $p=0.91$) was similar in PAPS patients and controls, as shown in Table 1. The twenty-seven PAPS had a mean number of 2.73 ± 2.03 events in a mean disease duration of 5.98 ± 4.99 years with a mean time since last event of 6.23 ± 4.99 years. Exclusive arterial events were identified in twelve PAPS patients (44.4%), exclusive venous in eleven (40.8%), both events in four patients (14.8%). Isolated positive anticardiolipin antibodies were detected in (26%) PAPS patients, (37%) had only lupus anticoagulant, and both tests in (37%).

Pulse wave velocity (PWV) was not significantly different between PAPS patients and controls ($p=0.34$), as shown in Table 2. Intima-media thickness was also not different in the comparison of these groups ($p=0.29$). Additionally, all the echo-tracking parameters such as carotideal diameter ($p=0.26$), distensibility, compliance coefficients ($p=0.92$ and $p=0.36$), and elastic modulus ($p=0.78$) were similar among groups. In contrast, PAPS patients had a higher mean systolic blood pressure compared to controls ($p=0.02$) but no significance was found regarding mean diastolic blood pressure ($p=0.25$) and heart rate ($p=0.41$) as shown in Table 2. Total cholesterol ($p=0.02$), HDL ($p=0.002$), and apolipoprotein A1 ($p=0.03$) levels were lower in PAPS compared to controls but no significant differences were detected among groups regarding all the other lipoproteins, CRP, and homocysteine levels (Table 2).

Non-invasive methods according to the site of thrombosis

Twelve patients with exclusive arterial events had similar age and BMI compared to eleven exclusive venous PAPS patients (Table 3). Importantly, pulse wave velocity (PWV) was significantly higher in the arterial group compared to the exclusive venous group (9.56 ± 0.94 vs. 8.55 ± 0.70 m/s, $p=0.01$), as shown in Table 3. In contrast, the mean systolic and diastolic blood pressures were similar among groups as well as mean heart rate. Intima-media thickness was also not different in comparison of these groups ($p=0.52$).

Moreover, carotid diameter, distensibility, compliance coefficients, and elastic modulus were also not different among the two groups (Table 3). Arterial and venous PAPS patients were similar regarding mean number of events (1.9 ± 1.4 vs. 2.9 ± 1.9 , $p=0.21$), disease duration (6.1 ± 5.1 vs. 4.9 ± 4.8 years, $p=0.45$), and time since last event (6.1 ± 4.7 vs. 6.3 ± 5.8 years, $p=0.84$). Total cholesterol ($p=0.002$), LDL ($p=0.02$), and apolipoprotein B ($p=0.03$) levels were higher in PAPS with exclusive arterial events compared to those with exclusive venous events and also higher HDL ($p=0.001$), and apolipoprotein A1 ($p=0.003$). No significant differences were detected among groups regarding all the other lipoproteins, CRP, and homocysteine levels (Table 3).

Association of PWV and intima-media thickness (IMT) with clinical and laboratorial parameters

PWV had a positive significant correlation with age ($r=0.584$, $p=0.001$) and blood vessel diameter ($r=0.407$, $p=0.04$) (Table 4). Moreover, PWV did also positively correlated with total cholesterol ($r=0.507$, $p=0.01$), LDL ($r=0.402$, $p=0.05$), and triglycerides ($r=0.583$, $p=0.003$). In contrast, no significant correlations were found with all other clinical and laboratorial parameters, including homocysteine and C-reactive protein (Table 4).

As shown in Table 5, intima-media thickness (IMT) had a positive significant correlation with blood vessel diameter ($r=0.393$, $p=0.04$) and distensibility ($r=0.373$, $p=0.05$). There were no further correlations between IMT and laboratorial parameters. (table 5).

Discussion

This is the first study that demonstrated arterial stiffness in PAPS patients with exclusive arterial events by PWV.

The great advantage of this study was the accurate selection of our PAPS patients that was also able to distinguish the progression of stiffness according to the site of thrombosis. Moreover, all other factors related to the PAPS itself such as disease duration, number of events, time since last thrombosis, and the type of antiphospholipid antibody were also evaluated. Traditional risk factors such as diabetes mellitus, dyslipidemia, obesity, menopause, and smoking were also excluded (Benetos, Waeber et al. 2002) in order to avoid their impact on arterial stiffness. Due to these restricted criteria, our PAPS patients had significant lower total cholesterol but also lower HDL and apolipoprotein A1 levels compared to controls, in accordance to previous studies (Becarevic, Singh et al. 2007; de Souza, Silva et al. 2007).

Importantly, arterial hypertension was an exclusion criteria since it is well-known its direct effect on arterial stiffness increasing PWV (Hashimoto, Chonan et al. 2002). For the same reason, black race was also excluded because of its influence in PWV (Lemogoum, Van Bortel et al. 2006)

Since pulse wave travels faster in stiffer arteries, the measurement of PWV is considered the best surrogate to evaluate arterial stiffness (Guerin, Blacher et al. 2001; Benetos, Adamopoulos et al. 2002; Safar, Levy et al. 2003). In fact, this noninvasive method can also determine the progression of atherosclerosis (Farrar, Bond et al. 1991; Wang, Tsai et al. 2005). Recently,

Manzi et al showed in SLE that PWV was a reliable technique to detect changes compatible with early vascular damage.(Selzer, Sutton-Tyrrell et al. 2001) Moreover, it was also demonstrated a striking discrepancy between anatomical arterial wall damage and functional endothelial vascular properties in SLE patients, reinforcing the importance of methods to evaluate functional arterial wall dynamic properties (Selzer, Sutton-Tyrrell et al. 2004).

In the present study, PAPS with exclusive arterial thrombosis demonstrated higher PWV than those with exclusive venous events. This arterial PAPS group presented higher levels of triglycerides, total and LDL cholesterol, although within normal ranges, but similar age, BMI, and SBP compared to the venous group. Remarkably, other specific disease factors such duration of disease, number and time since last thrombotic event did not affected PWV. The site of thrombosis could be a possible explanation for enhanced PWV in arterial PAPS since most of them had stroke. Supporting this hypothesis, aortic stiffness has been identified as an independent predictor of stroke (Laurent, Katsahian et al. 2003; Laurent and Boutouyrie 2005). Interestingly, in the present study, PWV in PAPS was positively related to age, triglycerides, total and LDL cholesterol levels as also observed in normal population (Giral, Atger et al. 1994; Wilkinson, Prasad et al. 2002)

Endothelial dysfunction is the first stage of arterial stiffness and flow mediated dilation (FMD) (Charakida M 2006; Stalc, Poredos et al. 2006) and ankle-brachial index (ABI) (Baron, Khamashta et al. 2005; Christodoulou, Zain et al. 2006) have been previously used in PAPS to identify early stages of atherosclerosis. Indeed, functional changes occur before the structural damage

of the vessel wall. In the present study, increased intima-media thickness (IMT) was not observed in PAPS in contrast to other studies that did not excluded traditional risk factors (Ames, Margarita et al. 2005; Jimenez, Garcia-Criado et al. 2005) or aging. (Medina, Casaos et al. 2003)

Previous studies have demonstrated that IMT was closely related with blood vessel diameter and age in subjects that were continuously exposed to vessel remodeling (Glagov, Bassiouny et al. 1997; Sasaki, Yamano et al. 2002; Prandoni, Bilora et al. 2003). In the present study, IMT and PWV were positively associated to blood vessel diameter. The increase in aortic diameter is due to a breakdown of the elastic elements on its wall that occurs in aging (Vasan, Larson et al. 1995; Bella, Wachtell et al. 2002). This vessel degenerative process leads to an increase in arterial stiffness, termed arteriosclerosis. Our findings suggest that PAPS patients are exposed to a continuous process of vessel aging characterized by a medium wall arteriopathy.(Christodoulou, Sangle et al. 2007)

This study clearly demonstrated that PWV is a sensitive non-invasive method to detect early vessel stiffness in PAPS, particularly in those with arterial events. The predictive value of measuring arterial stiffness in PAPS must be confirmed in longitudinal studies in order to ascertain the role of this disease and risk factors.

Table 1: Epidemiological Data of PAPS and control groups.

	PAPS (n=27)	Control (n=27)	p
Age (years)	41.5 ± 9.3	41.2 ± 10.2	0.92
White race (%)	55.5	59.25	1.00
Weight (kg)	59.8 ± 10.6	60.2 ± 11.2	0.89
Height (m)	1.62 ± 0.08	1.63 ± 0.07	0.68
BMI (kg/m ²)	22.7 ± 3.4	22.6 ± 3.7	0.91
Disease duration (years)	5.98 ± 4.99	-	-

Values are expressed in mean ± SD or percentage.

BMI = body mass index.

Table 2: Pulse wave velocity, echo-tracking features, and laboratorial parameters between PAPS and control groups.

	PAPS (n=27)	Control (n=27)	P
Pulse wave velocity (m/s)	9.07 ± 1.08	9.42 ± 1.47	0.34
Intima-media thickness (µm)	650 ± 152	612 ± 109	0.29
Carotid diastolic diameter (µm)	6566 ± 817	6347 ± 563	0.26
Distensibility coefficient (kPa ⁻¹ .10 ⁻³)	23.4 ± 10.5	23.2 ± 9.8	0.92
Compliance coefficient (kPa ⁻¹ .10 ⁻³)	8.23 ± 7.70	7.21 ± 3.19	0.36
Elastic incremental modulus (kPa.10 ³)	1.40 ± 1.30	1.26 ± 0.50	0.78
Systolic blood pressure (mmHg)	114.9 ± 13.9	107.2 ± 9.3	0.02
Diastolic blood pressure (mmHg)	71.3 ± 12.2	68.2 ± 8.5	0.25
Heart rate (bpm)	84.2 ± 14.2	81.2 ± 12.9	0.41
Total cholesterol (mg/dl)	188.0 ± 39.2	154.0 ± 55.1	0.02
HDL (mg/dl)	54.2 ± 18.4	39.0 ± 13.0	0.002
LDL (mg/dl)	114.5 ± 34.4	91.6 ± 41.5	0.51
VLDL (mg/dl)	19.2 ± 9.9	23.4 ± 11.7	0.14
Triglycerides (mg/dl)	95.9 ± 49.6	116.8 ± 58.2	0.15
Apolipoprotein A1 (mg/dl)	118.7 ± 41.4	149.1 ± 41.0	0.03
Apolipoprotein B (mg/dl)	76.1 ± 23.1	80.9 ± 25.3	0.37
Lipoprotein(a) (mg/dl)	41.6 ± 36.1	52.5 ± 45.7	0.51
Homocysteine (µmol/ml)	7.2 ± 4.4	6.7 ± 3.3	0.58
C-reactive protein (mg/l)	2.6 ± 2.7	5.3 ± 6.1	0.07

Values are expressed in mean ± SD.

Table 3: Age, body mass index, pulse wave velocity, laboratorial parameters and echo-tracking features in PAPS groups according to the site of thrombosis (exclusive arterial and venous).

	Arterial (n=12)	Venous (n=11)	p
Age (years)	44.1 ± 7.0	39.3 ± 9.9	0.23
Body mass index (kg/m ²)	24.6 ± 4.1	25.5 ± 3.1	0.78
Pulse wave velocity (m/s)	9.56 ± 0.94	8.55 ± 0.70	0.01
Íntima-media thickness (µm)	683 ± 171	636 ± 140	0.52
Carotid diastolic diameter (µm)	6856 ± 956	6334 ± 552	0.25
Distensibility coefficient (kPa ⁻¹ .10 ⁻³)	21.3 ± 9.9	24.8 ± 9.4	0.40
Compliance coefficient (kPa ⁻¹ .10 ⁻³)	8.30 ± 5.06	7.93 ± 3.80	0.92
Elastic modulus (kPa.10 ³)	1.64 ± 1.84	1.13 ± 0.52	0.83
Systolic blood pressure (mmHg)	120.3 ± 17.0	112.0 ± 10.2	0.11
Diastolic blood pressure (mmHg)	73.2 ± 12.3	72.8 ± 9.6	0.92
Heart rate (bpm)	80.8 ± 12.0	85.4 ± 16.7	0.51
Total cholesterol (mg/dl)	187.1 ± 36.5	118.0 ± 49.6	0.002
HDL (mg/dl)	46.8 ± 7.8	30.5 ± 12.3	0.001
LDL (mg/dl)	113.0 ± 33.1	68.3 ± 38.0	0.02
VLDL (mg/dl)	27.3 ± 12.7	19.2 ± 9.2	0.64
Triglycerides (mg/dl)	137.0 ± 63.1	95.0 ± 45.4	0.05
Apolipoprotein A1 (mg/dl)	143.5 ± 12.1	91.6 ± 45.4	0.003
Apolipoprotein B (mg/dl)	86.9 ± 24.5	64.3 ± 15.1	0.03
Lipoprotein(a) (mg/dl)	63.4 ± 50.8	40.0 ± 37.8	0.35
Homocysteine (µmol/ml)	6.3 ± 2.9	7.1 ± 3.9	0.83
C-reactive protein (mg/l)	4.6 ± 5.4	6.0 ± 7.0	0.52

Values are expressed in mean ± SD.

Table 4: Correlations among pulse wave velocity (PWV) with age, body mass index (BMI), blood pressure, laboratorial, and Echo-Tracking parameters.

	PWV	
	r	p
Age	0.584	0.001
BMI	0.105	0.60
IMT	0.296	0.13
Systolic blood pressure	0.360	0.06
Diastolic blood pressure	0.232	0.24
Carotid Diameter	0.407	0.04
Distensibility	-0.080	0.69
Disease duration	0.090	0.65
Number of events	-0.001	0.99
Time since last event	-0.076	0.71
Total cholesterol	0.507	0.01
HDL	0.287	0.18
LDL	0.402	0.05
VLDL	0.570	0.004
Triglycerides	0.583	0.003
Apolipoprotein A1	0.397	0.06
Apolipoprotein B	0.380	0.07
Lipoprotein(a)	-0.094	0.66
Homocysteine	0.043	0.84
C-reactive protein	-0.153	0.48

BMI = Body Mass Index; IMT = Íntima-Média Thickness

Table 5: Correlations among intima-media thickness (IMT) with age, body mass index (BMI), pulse wave velocity (PWV), blood pressure, laboratorial, and Echo-Tracking parameters.

	IMT	
	R	p
Age	0.039	0.85
BMI	0.105	0.60
PWV	0.296	0.13
Systolic blood pressure	0.046	0.82
Diastolic blood pressure	0.040	0.82
Carotid Diameter	0.393	0.04
Distensibility	0.373	0.05
Disease duration	-0.191	0.34
Number of events	0.155	0.43
Time since last event	-0.160	0.43
Total cholesterol	0.203	0.35
HDL	-0.172	0.43
LDL	0.146	0.51
VLDL	0.397	0.06
Triglycerides	0.392	0.06
Apolipoprotein A1	-0.078	0.72
Apolipoprotein B	0.219	0.31
Lipoprotein(a)	0.108	0.62
Homocysteine	-0.128	0.56
C-reactive protein	0.030	0.89

BMI = Body mass index; IMT = Intima-Media Thickness

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Creusa Maria Roveri Dal Bó, MSc for performing the statistical analysis. We are indebted to Central Laboratory (HC-FMUSP) for performing the laboratorial analysis and to Francisca Souza.

References

- Alan, S., M. S. Ulgen, et al. (2003). "Relation between coronary artery disease, risk factors and íntima-media thickness of carotid artery, arterial distensibility, and stiffness index." Angiology 54(3): 261-7.
- Ames, P. R., A. Margarita, et al. (2005). "Premature atherosclerosis in primary antiphospholipid syndrome: preliminary data." Ann Rheum Dis 64(2): 315-7.
- Ames, P. R., K. Sokoll, et al. (2004). "Atherosclerosis in primary antiphospholipid syndrome." Ann Rheum Dis 63(5): 610-1; author reply 610-11.
- Arnett, D. K., G. W. Evans, et al. (1994). "Arterial stiffness: a new cardiovascular risk factor?" Am J Epidemiol 140(8): 669-82.
- Asmar, R., A. Benetos, et al. (1995). "Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement. Validation and clinical application studies." Hypertension 26(3): 485-90.
- Baron, M. A., M. A. Khamashta, et al. (2005). "Prevalence of an abnormal ankle-brachial index in patients with primary antiphospholipid syndrome: preliminary data." Ann Rheum Dis 64(1): 144-6.
- Becarevic, M., S. Singh, et al. (2007). "Lipoprotein (a) and apolipoprotein (a) in primary antiphospholipid syndrome." Clin Biochem 40(5-6): 317-20.
- Bella, J. N., K. Wachtell, et al. (2002). "Relation of left ventricular geometry and function to aortic root dilatation in patients with systemic hypertension and left ventricular hypertrophy (the LIFE study)." Am J Cardiol 89(3): 337-41.
- Benetos, A., C. Adamopoulos, et al. (2002). "Determinants of accelerated progression of arterial stiffness in normotensive subjects and in treated hypertensive subjects over a 6-year period." Circulation 105(10): 1202-7.
- Benetos, A., B. Waeber, et al. (2002). "Influence of age, risk factors, and cardiovascular and renal disease on arterial stiffness: clinical applications." Am J Hypertens 15(12): 1101-8.
- Bilora, F., V. Boccioletti, et al. (2002). "Are antiphospholipid antibodies an independent risk factor for atherosclerosis?" Clin Appl Thromb Hemost 8(2): 103-13.
- Blacher, J., B. Pannier, et al. (1998). "Carotid arterial stiffness as a predictor of cardiovascular and all-cause mortality in end-stage renal disease." Hypertension 32(3): 570-4.
- Bombeli, T., A. Karsan, et al. (1997). "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant." Blood 89(7): 2429-42.

Boutouyrie, P., S. Laurent, et al. (1995). "Common carotid artery stiffness and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients." Hypertension 25(4 Pt 1): 651-9.

Brandt, J. T., D. A. Triplett, et al. (1995). "Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH." Thromb Haemost 74(4): 1185-90.

Chapman, J., J. H. Rand, et al. (2003). "Non-stroke neurological syndromes associated with antiphospholipid antibodies: evaluation of clinical and experimental studies." Lupus 12(7): 514-7.

Charakida M, H. J., Sangle S *et al.* (2006). "Preclinical atherosclerotic phenotype in patients with primary antiphospholipid syndrome " Rheumatology (Oxford).

Christodoulou, C., S. Sangle, et al. (2007). "Vasculopathy and arterial stenotic lesions in the antiphospholipid syndrome." Rheumatology (Oxford).

Christodoulou, C., M. Zain, et al. (2006). "Prevalence of an abnormal ankle-brachial index in patients with antiphospholipid syndrome with pregnancy loss but without thrombosis: a controlled study." Ann Rheum Dis 65(5): 683-4.

Davies RJ, S. S., Khamashta MA, D'Cruz DP (2006). "Antiphospholipid (Hughes) syndrome and atheroma." Lupus 15(S1): 55-58

de Souza, A. W., N. P. Silva, et al. (2007). "Impact of hypertension and hyperhomocysteinemia on arterial thrombosis in primary antiphospholipid syndrome." Lupus 16(10): 782-7.

Ekdahl, K. N., A. A. Bengtsson, et al. (2004). "Thrombotic disease in systemic lupus erythematosus is associated with a maintained systemic platelet activation." Br J Haematol 125(1): 74-8.

Farrar, D. J., M. G. Bond, et al. (1991). "Anatomic correlates of aortic pulse wave velocity and carotid artery elasticity during atherosclerosis progression and regression in monkeys." Circulation 83(5): 1754-63.

Giral, P., V. Atger, et al. (1994). "A relationship between aortic stiffness and serum HDL3 cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic, symptom-free men. The PCVMETRA Group (Groupe de Prevention Cardiovasculaire en Medecine du Travail)." J Cardiovasc Risk 1(1): 53-8.

Glagov, S., H. S. Bassiouny, et al. (1997). "Mechanical determinants of plaque modeling, remodeling and disruption." Atherosclerosis 131 Suppl: S13-4.

Guerin, A. P., J. Blacher, et al. (2001). "Impact of aortic stiffness attenuation on survival of patients in end-stage renal failure." Circulation 103(7): 987-92.

Halevy, D., J. Radhakrishnan, et al. (2002). "Thrombotic microangiopathies." Crit Care Clin 18(2): 309-20, vi.

Hashimoto, J., K. Chonan, et al. (2002). "Pulse wave velocity and the second derivative of the finger photoplethysmogram in treated hypertensive patients: their relationship and associating factors." J Hypertens 20(12): 2415-22.

Hodes, R. J., E. G. Lakatta, et al. (1995). "Another modifiable risk factor for cardiovascular disease? Some evidence points to arterial stiffness." J Am Geriatr Soc 43(5): 581-2.

Hodis, H. N., W. J. Mack, et al. (1998). "The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events." Ann Intern Med 128(4): 262-9.

Hoeks, A. P., P. J. Brands, et al. (1990). "Assessment of the distensibility of superficial arteries." Ultrasound Med Biol 16(2): 121-8.

Hoeks, A. P., C. Willekes, et al. (1997). "Automated detection of local artery wall thickness based on M-line signal processing." Ultrasound Med Biol 23(7): 1017-23.

Hughes, G. R. (2003). "Migraine, memory loss, and "multiple sclerosis ". Neurological features of the antiphospholipid (Hughes') syndrome." Postgrad Med J 79(928): 81-3.

Hunt, B. J. and M. A. Khamashta (2000). "Antiphospholipid antibodies and the endothelium." Curr Rheumatol Rep 2(3): 252-5.

Jimenez, S., M. A. Garcia-Criado, et al. (2005). "Preclinical vascular disease in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome." Rheumatology (Oxford) 44(6): 756-61.

Laurent, S. (2006). "Surrogate measures of arterial stiffness: do they have additive predictive value or are they only surrogates of a surrogate?" Hypertension 47(3): 325-6.

Laurent, S. and P. Boutouyrie (2005). "Arterial stiffness and stroke in hypertension: therapeutic implications for stroke prevention." CNS Drugs 19(1): 1-11.

Laurent, S., P. Boutouyrie, et al. (2001). "Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients." Hypertension 37(5): 1236-41.

Laurent, S., B. Caviezel, et al. (1994). "Carotid artery distensibility and distending pressure in hypertensive humans." Hypertension 23(6 Pt 2): 878-83.
Laurent, S., S. Katsahian, et al. (2003). "Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension." Stroke 34(5): 1203-6.

Lemogoum, D., L. Van Bortel, et al. (2006). "Ethnic differences in arterial stiffness and wave reflections after cigarette smoking." J Hypertens 24(4): 683-9.

Lockshin, M. D., L. R. Sammaritano, et al. (2000). "Validation of the Sapporo criteria for antiphospholipid syndrome." Arthritis Rheum 43(2): 440-3.

Medina, G., D. Casaos, et al. (2003). "Increased carotid artery intima-media thickness may be associated with stroke in primary antiphospholipid syndrome." Ann Rheum Dis 62(7): 607-10.

Prandoni, P., F. Bilora, et al. (2003). "An association between atherosclerosis and venous thrombosis." N Engl J Med 348(15): 1435-41.

Rajagopalan, S., E. C. Somers, et al. (2004). "Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity." Blood 103(10): 3677-83.

Raschi, E., C. Testoni, et al. (2003). "Endothelium activation in the antiphospholipid syndrome." Biomed Pharmacother 57(7): 282-6.

Roman, M. J., J. E. Salmon, et al. (2001). "Prevalence and relation to risk factors of carotid atherosclerosis and left ventricular hypertrophy in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibody syndrome." Am J Cardiol 87(5): 663-6, A11.

Safar, M. E., B. I. Levy, et al. (2003). "Current perspectives on arterial stiffness and pulse pressure in hypertension and cardiovascular diseases." Circulation 107(22): 2864-9.

Salomaa, V., W. Riley, et al. (1995). "Non-insulin-dependent diabetes mellitus and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness indexes. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study." Circulation 91(5): 1432-43.

Sasaki, R., S. Yamano, et al. (2002). "Vascular remodeling of the carotid artery in patients with untreated essential hypertension increases with age." Hypertens Res 25(3): 373-9.

Segal, J., T. Kickler, et al. (2000). "Tissue factor activity in patients with systemic lupus erythematosus: association with disease activity." J Rheumatol 27(12): 2827-32.

Selzer, F., K. Sutton-Tyrrell, et al. (2001). "Vascular stiffness in women with systemic lupus erythematosus." Hypertension 37(4): 1075-82.

Selzer, F., K. Sutton-Tyrrell, et al. (2004). "Comparison of risk factors for vascular disease in the carotid artery and aorta in women with systemic lupus erythematosus." Arthritis Rheum 50(1): 151-9.

Shoenfeld, Y., S. Lev, et al. (2004). "Features associated with epilepsy in the antiphospholipid syndrome." J Rheumatol 31(7): 1344-8.

Stalc, M., P. Poredos, et al. (2006). "Endothelial function is impaired in patients with primary antiphospholipid syndrome." Thromb Res 118(4): 455-61.

Van Bortel, L. M., D. Duprez, et al. (2002). "Clinical applications of arterial stiffness, Task Force III: recommendations for user procedures." Am J Hypertens 15(5): 445-52.

Vasan, R. S., M. G. Larson, et al. (1995). "Echocardiographic reference values for aortic root size: the Framingham Heart Study." J Am Soc Echocardiogr 8(6): 793-800.

Wang, M. C., W. C. Tsai, et al. (2005). "Stepwise increase in arterial stiffness corresponding with the stages of chronic kidney disease." Am J Kidney Dis 45(3): 494-501.

Wilkinson, I. B., K. Prasad, et al. (2002). "Increased central pulse pressure and augmentation index in subjects with hypercholesterolemia." J Am Coll Cardiol 39(6): 1005-11.