

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

DANIELA SOUZA FARIAS ITÁO

**Caracterização do perfil da resposta inflamatória no tecido adiposo perivascular
associada à doença arterial coronariana: um estudo de autópsia**

São Paulo

2022

DANIELA SOUZA FARIAS ITÁO

**Caracterização do perfil da resposta inflamatória no tecido adiposo perivascular
associada à doença arterial coronariana: um estudo de autópsia**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutora em Ciências.

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Kimie Suemoto

São Paulo

2022

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Farias Itáo, Daniela Souza
Caracterização do perfil da resposta inflamatória
no tecido adiposo perivascular associada à doença
arterial coronariana : um estudo de autópsia /
Daniela Souza Farias Itáo. -- São Paulo, 2022.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Claudia Kimie Suemoto.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Macrófagos
3.Linfócitos 4.Tecido adiposo 5.Doença da artéria
coronariana 6.Inflamação

USP/FM/DBD-263/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Folha de Aprovação

Nome: FARIAS ITÁO, Daniela Souza

Título: Caracterização do perfil da resposta inflamatória no tecido adiposo perivascular associada à doença arterial coronariana: um estudo de autópsia

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Eu dedico esta tese de doutorado a todos os familiares dos participantes desta pesquisa.

*No momento de uma das maiores dores da experiência humana, eles transformaram a dor em
compaixão, ajudando a ciência e outras pessoas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo seu amor incondicional, por me guiar e ajudar a trilhar este caminho que me trouxe até aqui, me proporcionando a realização de um grande sonho.

Agradeço aos meus pais, Fátima de Souza Farias e José Carlos de Farias, pelo amor e apoio incondicionais. Eles que me formaram e com quem aprendi a depositar todo meu amor, esforço, determinação e dedicação em tudo o que eu realizo. Obrigada por tudo o que fizeram e fazem por mim e pelo constante apoio.

Ao meu esposo, Leonardo Itáo, pelo amor, auxílio e por ser minha luz. Você sempre ressalta as minhas pequenas e grandes conquistas. Você é capaz de trazer a luz mesmo nos momentos mais difíceis, principalmente nestes últimos dois anos. Eu não teria chegado tão longe sem você e sem nossos filhotes, Kaori e Shaun.

Às minhas irmãs, Juliana e Gabriela Souza Farias, pelo amor, apoio e amizade incondicionais. Obrigada por todo o cuidado e carinho, sempre presentes. Vocês foram essenciais para eu estar aqui.

À minha avó, Elzira Pedrozo de Souza, que por de atrás da sua doçura e dos seus gestos sempre me apoiou com sua fé inabalável.

Aos professores que através do Biobanco para Estudos em Envelhecimento da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (BEE-FMUSP) eu tive a honra de conhecer, aprender e de me inspirar profundamente (Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, Prof. Dr. Ricardo Nitrini, Prof. Dr. Wilson Jacob Filho, Profa. Dra. Lea Grinberg e Profa. Dra. Renata Leite).

À Profa. Dra. Renata Ferretti-Rebustini por me apresentar e me acolher no BEE-FMUSP na equipe de entrevistas clínicas.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva pela colaboração durante todo o projeto desde o mestrado, pelo treinamento das análises morfométricas no tecido adiposo e nas artérias coronárias. Muito obrigada por compartilhar seus ensinamentos, pela disponibilidade e bom humor.

Ao Prof. Dr. Alexandre Brincalpe de Campo e ao mestre Renato Araújo de Andrade do Instituto Federal de São Paulo, com eles eu pude aprender e colaborar no desenvolvimento do software que possibilitou uma parte dos resultados apresentados nesta tese.

À Profa. Dra. Silvia Gelás Lage, pelas suas contribuições e pelo apoio constante durante meu mestrado e doutorado.

Aos Professores dos quais tive a honra de conhecer durante as disciplinas realizadas na pós-graduação na FMUSP, principalmente o Prof. Dr. Júlio Pereira e Profa. Dra. Elia Garcia Caldini, que além do conhecimento, sempre trouxeram o coração e a alma nas aulas.

À Dra. Ana Maria Gonçalves da Silva, do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP, pela generosidade em me acolher em seu laboratório durante uma parte do meu período de doutorado, dividir a bancada durante os experimentos e por me ensinar a técnica de imuno-histoquímica.

Agradeço a todos os atuais técnicos que atuam no BEE-FMUSP, assim como todos os alunos de iniciação científica e de pós-graduação dos quais eu tive a honra de conviver e aprender nestes 12 anos que estive no laboratório.

Aos técnicos do Laboratório de Histotécnica no Departamento de Patologia da FMUSP, especialmente Kelly Bispo e Cassia Arruda. E às técnicas do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP, especialmente Angela Gomes, que sempre torceu pelo trabalho e me auxiliou sempre que precisei.

À Marcia Mitie Nagumo, que se tornou uma grande amiga e sempre muito generosa. Muito obrigada pela sua amizade que sempre foi muito presente, até quando não podíamos nos ver. Obrigada, pelos áudios longos, por sempre torcer pela minha felicidade e por se alegrar com minhas conquistas!

À Maristela Yahagi Estevam, que se tornou uma grande amiga e foi minha companheira de pós-graduação durante meu doutorado, onde dividimos além de aprendizado, apoio, amizade, angústias e principalmente alegria. Agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho. Obrigada por se alegrar com minhas conquistas e me apoiar nos momentos difíceis.

À Profa. Dra. Eliana Toscano, que tive a honra de conhecer recentemente e que mesmo em tão poucos meses se tornou uma amiga querida. Obrigada pelas aventuras quando dividimos a bancada, pelas conversas, pelo apoio, e pela sua amizade tão genuína.

À nova geração da equipe do Laboratório de Patologia Cardiovascular, Andressa Fernandes, Maria Eduarda Braga, Maristella Yahagi Estevam, e Beatriz Carvalho, pela amizade, apoio, trabalho com muita cooperação e alegria.

À geração da equipe do Laboratório de Patologia Cardiovascular que me acompanhou e me auxiliou durante o período do mestrado e que deixou muitas saudades: Aline Nishizawa, Fernanda Marinho Campos e Karen Cristina de Souza Silva.

À Maria Cecília Blumer Grobel, que sempre me auxiliou e nunca deixou faltar material para meus experimentos e à Pérola Lucas, ambas do Laboratório de Patologia Cardiovascular.

Aos colegas orientandos da Profa. Claudia Kimie Suemoto, que formam um time brilhante que eu tenho a honra de fazer parte e de aprender: Alberto Justo, Eliana Toscano, Guilherme Gimenez Junior, Adriana Nancy dos Santos, Naomi Ferreira, Laiss Bertola, Felipe Bozi, Regina Paradela, Aline Ciciliati, Erika Satomi, Sumika Mori Lin, Jonas Gordilho, Maristella Yahagi, Clarissa Willets, Luis Rangel e Natalia Gomes Gonçalves.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste estudo e pela minha bolsa de doutorado.

Ao Professor Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, por me acolher em seu laboratório, pelo treinamento fornecido para a análise das artérias coronárias, pelo conhecimento transmitido ao longo destes anos, pelas histórias sempre recheadas com bom humor, pela sua preocupação genuína com todos que o cercam, e especialmente pelo apoio durante todos estes anos.

Agradeço especialmente a minha Professora Dra. Claudia Kimie Suemoto pela honra de ser sua orientanda. Obrigada por me acolher desde a primeira conversa, por me aceitar em ser sua primeira aluna de pós-graduação, e pela sua generosidade imensurável em compartilhar tudo o que você tem aprendido ao longo dos anos. Agradeço de coração a sua confiança depositada em mim novamente (agora como sua aluna de doutorado), pela jornada que partilhamos juntas e por ter me apoiado e incentivado a voar para lugares onde eu nem tinha imaginado. Com muito carinho, eu guardarei sempre a jornada que trilhamos neste período. Muito obrigada!

RESUMO

Farias Itáio DS. Caracterização do perfil da resposta inflamatória no tecido adiposo perivascular associada à doença arterial coronariana: um estudo de autópsia [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

Introdução: Inflamação no tecido adiposo perivascular (TAP) foi associada com a aterosclerose coronariana em estudos prévios. O aumento da densidade de linfócitos B CD20⁺ e macrófagos CD68⁺ no TAP peri-placa se correlacionou com a porcentagem de obstrução arterial. A densidade dos macrófagos CD68⁺ no TAP peri-placa foi maior nas regiões adjacentes às placas de ateroma instáveis. Entretanto, não foi encontrada associação com linfócitos T CD3⁺. Há resultados controversos de qual é o fenótipo predominante dos macrófagos polarizados no TAP associado com a aterosclerose. Não há estudos sobre a associação entre as linhagens Th1 e Treg no TAP e aterosclerose coronariana em humanos, bem como a investigação com placas instáveis. **Objetivo:** Investigar a associação do perfil da resposta inflamatória no TAP adjacente às placas ateroscleróticas de artérias coronárias e comparar o perfil desta resposta inflamatória com o TAP adjacente à artéria coronária sem aterosclerose e distal às placas (TAP controle) utilizando material de autópsia. **Método:** As artérias coronárias principais foram removidas do coração com o TAP adjacente. A placa aterosclerótica com maior obstrução ou com sinais de instabilidade foram amostradas, assim como o seguimento sem lesão macroscópica e distal a outras placas. Lesões instáveis tiveram preferência às lesões estáveis. Nestas amostras, realizamos as medidas morfométricas, medimos a área dos componentes da placa aterosclerótica e classificamos as placas em estáveis ou instáveis. Os macrófagos polarizados (M1 CD11c⁺ e M2 CD206⁺) e a linhagem dos linfócitos T (Th1 CD4⁺CXCR3⁺ e Tregs CD45RO⁺FoxP3⁺) foram identificados e quantificados com técnica de imuno-histoquímica simples e de dupla marcação. As correlações foram testadas com modelos de regressões ajustadas para erros padrões robustos para medidas repetidas e para possíveis fatores de confusão. **Resultados:** Em 319 amostras de artérias e TAP de 82 indivíduos (média de idade de 69,0±14,4 anos e 50% homens), encontramos que o aumento de macrófagos M1 no TAP peri-placa aumentou 1,95 vezes o risco de trombo [p=0,03]. O perfil pró-inflamatório correlacionou com componentes relacionados à desestabilização (M1: diminuição da capa fibrosa [p=0,006], aumento de lipídio [p=0,01] e maior número de *vasa vasorum* [p=0,01]; Th1: menor tamanho de placa [p=0,02], diminuição de calcificação [p=0,02], maior número de *vasa vasorum* [p=0,03]). O perfil anti-inflamatório se associou com componentes de placa relacionados às placas avançadas e estáveis (M2 e Treg, respectivamente: aumento da placa [p=0,02; p<0,001] e aumento da calcificação [p=0,03; p=0,005]). Linfócitos Treg também se associaram com componentes em placas instáveis: diminuição de colágeno [p=0,001] e aumento de necrose [p=0,005]. Encontramos um aumento de M1 no TAP peri-placa em comparação com o TAP controle associado ao aumento de colágeno [p=0,03] e M2 foi maior no TAP peri-placa em associação com a espessura íntima-média [p=0,02]. **Conclusão:** Encontramos um predomínio do perfil pró-inflamatório, mediado principalmente por macrófagos M1. O perfil pró-inflamatório no TAP peri-placa se associou com componentes de placa de aterosclerose relacionados à desestabilização. O perfil anti-inflamatório teve a maioria das associações com componentes de placa de aterosclerose relacionados à estabilização e lesões crônicas, exceto pelos linfócitos Treg, que também se associaram com componentes relacionados à desestabilização em placas instáveis. A inflamação no TAP foi heterogênea com maior inflamação no TAP adjacente às artérias coronárias com aterosclerose.

Palavras-chave: Aterosclerose. Macrófagos. Linfócitos. Tecido adiposo. Doença da artéria coronariana. Inflamação.

ABSTRACT

Farias Itáio DS. Characterization of the inflammatory response profile in the perivascular adipose tissue associated with coronary artery disease: an autopsy study [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

Introduction: Inflammation in the perivascular adipose tissue (PvAT) was associated with coronary atherosclerosis in previous studies. The increase of B CD20⁺ lymphocyte and the CD68⁺ macrophage density was correlated with the percentage of arterial obstruction and CD68⁺ macrophage density was greater in the regions near unstable atherosclerotic plaques. However, the association with T CD3⁺ lymphocytes was not found. There are controversial results on what macrophage phenotype is predominant in association with atherosclerosis. There were no studies regarding the association between the Th1 and Treg lymphocyte lineages and atherosclerosis in humans, as well as investigations with unstable plaques. **Aim:** To investigate the characterization of inflammatory profile in the PvAT surrounding atherosclerotic plaques in coronary arteries and to compare this inflammatory profile in the periplateau PvAT with PvAT surrounding coronary arteries without atherosclerotic plaques and away from any atherosclerotic plaques (control PvAT) using autopsy material. **Method:** Main coronary arteries were removed from the heart with surrounding PvAT. The atherosclerotic plaque with the greatest arterial obstruction or signs of unstable plaques was sampled. Unstable lesions were preferred over stable lesions. Moreover, one segment of PvAT surrounding coronary arteries without atherosclerotic plaques and away from any atherosclerotic plaques was sampled as control. In coronary arteries, we performed morphometric measures, measured the area of components of the atherosclerotic plaque, and classified the plaques as stable or unstable. The macrophage profile (M1 CD11c⁺ and M2 CD206⁺) and T lymphocytes lineages (Th1 CD4⁺CXCR3⁺ and Tregs CD45RO⁺FoxP3⁺) were identified and quantified using simple and double immunohistochemistry technique. The correlations were tested with regression models adjusted for robust standard errors and possible confounding factors. **Results:** In 319 arteries and PvAT samples from 82 individuals (mean age 69,0±14,4 and 50% male), we found that the increase of M1 macrophage increased 1,95 times the risk of thrombus [p=0,03]. The pro-inflammatory profile was correlated with atherosclerotic components related to destabilization (M1: the decrease of fibrous cap [p=0,006], the increase of lipid [p=0,01], and the greater number of vasa vasorum [p=0,01]; Th1: the decrease in plaque size [p=0,02], the decrease of calcification [p=0,02], and the greater number of vasa vasorum [p=0,03]). The anti-inflammatory profile was associated with atherosclerotic components related to advanced and stable plaques (M2 e Treg, respectively: an increase in plaque size [p=0,02; p<0,001] and the increase of calcification [p=0,03; p=0,005]). Treg lymphocytes were also associated with atherosclerotic components in unstable plaques: the decrease of collagen [p=0,001] and the increase of necrosis [p=0,005]. We found an increase of M1 macrophage in the periplateau PvAT compared to control PvAT associated with the increase of collagen [p=0,03] and M2 macrophage was greatest in the periplateau PvAT in association with intima-media thickness [p=0,02]. **Conclusion:** We found a predominance of the pro-inflammatory profile, mainly by M1 macrophage. The pro-inflammatory profile was associated with atherosclerotic plaque components related to destabilization. The anti-inflammatory profile had the majority of associations with atherosclerotic components related to stabilization and chronic lesions, except for the Treg lymphocyte, which was also associated with atherosclerotic components related to destabilization in unstable plaques. The PvAT inflammation was heterogeneous, with greater inflammation in the PvAT surrounding coronary arteries with atherosclerosis.

Keywords: Atherosclerosis. Macrophage. Lymphocyte. Adipose tissue. Coronary artery disease. Inflammation.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 21 |
| 2.1 Dados Epidemiológicos | 21 |
| 2.2 Anatomia das artérias coronárias | 32 |
| 2.3 Doença Arterial Coronariana | 34 |
| 2.4 Classificação anatomopatológica das placas ateroscleróticas | 35 |
| 2.5 Aterosclerose e Sistema Imune Inato | 53 |
| 2.6 Aterosclerose e o sistema imune adaptativo | 59 |
| 2.7 Doença arterial coronariana e tecido adiposo | 67 |
| 3. OBJETIVOS | 76 |
| 3.1 Objetivo Geral | 76 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 76 |
| 3.3 Hipóteses | 77 |
| 4. MÉTODO | 78 |
| 4.1 Local de coleta de dados | 78 |
| 4.2 Desenho do estudo | 79 |
| 4.3 Casuística | 79 |
| 4.4 Dados Clínicos e Sociodemográficos | 83 |
| 4.5 Amostragem dos Tecidos | 84 |
| 4.6 Avaliação das artérias coronárias | 85 |
| 4.7 Avaliação do perfil da resposta inflamatória no TAP | 95 |
| 4.8 Análise Estatística | 106 |
| 5. RESULTADOS | 109 |
| 5.1 Análise Descritiva da Casuística | 109 |
| 5.2 Macrófagos Polarizados no TAP e Aterosclerose Coronariana | 112 |
| 5.3 Linfócitos T no TAP e Aterosclerose Coronariana | 142 |
| 6. DISCUSSÃO | 159 |
| 6.1 Limitações | 168 |
| 6.2 Pontos Fortes | 170 |
| 7. CONCLUSÕES | 171 |
| 8. FINANCIAMENTOS | 174 |
| 9. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS | 175 |

| | |
|---|------------|
| ANEXOS | 177 |
| Anexo I – Artigo Científico Publicado em Periódico | 177 |
| Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 198 |
| Anexo III – Aprovação do comitê de ética em pesquisa | 197 |
| Anexo IV – Aprovação do Estudo no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo | 201 |
| Anexo V – Entrevista clínica | 202 |
| ANEXO VI – Aprovação do CEP da FMUSP do projeto APA | 216 |
| ANEXO VII - Aprovação do CEP da IFSP do projeto APA | 218 |
| ANEXO VIII - Certificado | 220 |
| ANEXO IX - Certificado | 221 |
| REFERÊNCIAS | 222 |

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) correspondem à doença isquêmica do coração, doenças cerebrovasculares, doenças reumáticas do coração e outras condições.^{1,2} Isoladamente, as DCV são a primeira causa de morte no mundo com 17,9 milhões de óbitos/ano, correspondendo a 32% de todas as causas de óbitos, sendo que 75% dos óbitos ocorrem em países de média e baixa renda.² Dentre as DCV, a doença arterial coronariana (DAC) ou também conhecida como doença isquêmica do coração (DIC), são responsáveis por 16% dos óbitos, liderando as causas de morte³ e desde 2012 são a primeira causa de incapacidade no mundo.⁴ O acidente vascular cerebral (AVC) e DAC são a causa de quatro a cada cinco mortes e um terço das mortes ocorrem prematuramente com idade abaixo de 70 anos.² No Brasil, as DAC lideram a causa de morte desde 2009 e são a segunda causa de morte prematura.⁵ Desse modo, estudos envolvendo DAC são de suma importância.

A aterosclerose é uma doença sistêmica, que envolve o acúmulo de lipídios e inflamação. Desde a década de 90 é demonstrado que a inflamação tem papel chave no desenvolvimento e progressão da DAC.⁶ Os fatores de risco cardiovasculares (como por exemplo tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, hiperlipidemia, diabetes mellitus, doença renal, adiposidade) e o componente genético, modulam a inflamação.⁷⁻⁹ Outro fator de risco emergente para progressão e início precoce da DAC é a inflamação crônica e de baixo grau.¹⁰ Estes fatores de risco causam alterações no endotélio vascular, e promovem a adesão de leucócitos, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, a expressão de moléculas de adesão [e.g. quimiocina atrativa de monócitos-1 (MCP-1) e molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1)], interleucinas (IL) pró-inflamatórias (e.g. IL-6), e penetração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) colesterol no endotélio vascular. Este desequilíbrio proporciona inflamação no vaso e condições propícias para o desenvolvimento da aterosclerose.¹¹

O processo inflamatório é essencial para a progressão da placa aterosclerótica.¹¹ Recentemente, têm sido incorporado o conceito de que o desenvolvimento da aterosclerose não é

um processo contínuo, e sim de fases de quiescência e de progressão desencadeada por processos inflamatórios sistêmicos ou regionais.¹² Consequentemente, estudos que clarifiquem o papel das células imunes relacionadas ao processo inflamatório na aterosclerose são de extrema importância.

Dentre todas as células inflamatórias, os macrófagos são as células mais abundantes na placa aterosclerótica,¹³ e estão presentes desde o início da formação da lesão,⁶ mesmo em fetos quando a mãe é hipercolesterolêmica,¹³ e estão presentes em todos os estágios do desenvolvimento da aterosclerose, o que inclui a desestabilização.¹¹ A desestabilização da placa desencadeia a síndrome arterial coronariana aguda (SCA), que é caracterizada pela formação de erosões, rupturas e trombos nas artérias coronárias.¹⁴ Os macrófagos contribuem para o desenvolvimento destas lesões instáveis através da formação do núcleo necrótico e redução da espessura da capa fibrosa.¹⁵ Os macrófagos têm plasticidade funcional. Macrófagos M1 têm perfil pró-inflamatório,^{13,16} e expressam em sua superfície CD68⁺ e CD11c⁺.^{17,18} Os macrófagos M2 têm uma atuação anti-inflamatória e reparadora, e expressam CD68⁺ e CD206⁺.^{17,18} Os macrófagos M1 promovem a inflamação através da secreção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1-beta (IL-1 β), IL-12, fator de necrose-tumoral alfa (TNF- α), MCP-1, e espécies reativas de oxigênio. Os macrófagos M2 assumem um fenótipo alternadamente ativado, com supressão de inflamação e reparação, que tem como objetivo resolver a inflamação. Macrófagos M2 secretam IL-10 e fator de crescimento-beta. Esta alternância entre os fenótipos é dinâmica de acordo com o ambiente próximo à lesão e da sinalização intracelular. Esta alternância é complexa, alterando o metabolismo e marcadores de superfície do macrófago.^{13,16} Embora o ambiente da placa aterosclerótica em desenvolvimento seja predominantemente pró-inflamatório, devido às altas concentrações de IFN-gama pela presença de células Th1,^{13,19} mais estudos sobre polarização dos macrófagos em seres humanos são necessários para o melhor entendimento do papel dos macrófagos na placa de aterosclerose. Recentemente, a investigação sobre a plasticidade dos macrófagos pode contribuir para o desenvolvimento de possíveis terapias que visam modular a

resposta inflamatória, permitindo a regressão das placas ateroscleróticas e prevenção de complicações.^{13,20}

Os linfócitos T também estão presentes em alto número na lesão aterosclerótica e podem se diferenciar em células T auxiliares (*T helper – Th*) CD4⁺,²¹ que reconhecem antígenos e induzem a imunidade humoral através dos linfócitos B.²² Assim como os macrófagos, os linfócitos T são recrutados desde o início da formação da placa aterosclerótica. Os linfócitos T auxiliares CD4⁺ se diferenciam em linhagens, sendo as linhagens mais investigadas as Th1, Th2 e Th17.²¹ Na placa aterosclerótica há predominância de células Th1^{11,19} e quase todas expressam em sua superfície o receptor de quimiocina CXCR3 (CD183⁺), que se liga às quimiocinas: quimiocina de proteína-10 (CXCL10/IP-10), monocina induzida por interferon-gama (CXCL9/MIG), e a quimiocina atrativa de célula T alfa induzível por interferon (CXCL11/I-TAC).^{6,23,24} Os linfócitos Th1 secretam interferon gama (IFN- γ), assinatura desta classe de linfócitos T, que é altamente aterogênico.^{11,21,22} O IFN- γ , no contexto da aterosclerose, pode inibir a proliferação das células musculares lisas e reduzir a produção de colágeno por estas células. Além disso, estimula o aumento de secreção de metaloproteinases da matriz (MMP), que contribuem para o afinamento da capa fibrosa.^{11,21} As outras linhagens de linfócitos T CD4⁺, como Th2, Th17 e Th19, também são estudadas, mas ainda tem o papel incerto.^{21,25}

Outra linhagem dos linfócitos T CD4⁺ são os regulatórios (Tregs), que expressam em sua membrana CD25⁺ e FoxP3⁺, e têm como função manter a imunotolerância, eliminar células imunes autorreativas e prevenir a inflamação excessiva. Apresentam ação ateroprotetora por suprimir a inflamação dos linfócitos T com atuação pró-inflamatória associada à aterosclerose^{22,25,26} e pacientes com DAC podem ter baixo número destas células, tanto em placas de aterosclerose, quanto na circulação periférica.^{22,25}

O tecido adiposo perivascular (TAP) por ter contato direto com a camada adventícia²⁷ e com o *vasa vasorum*²⁸ pode estar associado com a DAC,²⁹ sendo uma linha de pesquisa que tem se estabelecido nos últimos 10 anos. Estudos *in vitro* e em ratos/camundongos demonstraram uma

infiltração de adipócitos na camada adventícia,³⁰ e também que o TAP tem um perfil pró-inflamatório, devido à secreção reduzida de adiponectina.²⁷ Níveis baixos de adiponectina são associados com a obesidade, diabetes mellitus, resistência insulínica e perda da proteção inflamatória.^{31,32} Dessa forma, o TAP pode participar do desenvolvimento da aterosclerose por contribuir com a inflamação na camada adventícia.²⁷ A camada adventícia é a maior região de acúmulo de linfócitos, e assim pode contribuir para a imunidade inata e adaptativa, regulando a aterosclerose.²⁹

Estudos em humanos demonstraram que o tecido adiposo epicárdico (TAE), mais especificamente o perivascular, está associado com a aterosclerose coronariana.^{18,33-39} Entretanto, esses estudos apresentaram algumas limitações: (1) muitos estudos são cirúrgicos ou com biópsias,^{18,33,36} e não estudaram o TAP, e sim o TAE. Entretanto, sabe-se que o TAP atua diretamente no vaso;²⁸ (2) ainda sobre as amostras cirúrgicas, o ato cirúrgico pode desencadear uma resposta inflamatória, com aumento do número de monócitos e expressão das proteínas de resposta ao choque térmico, principalmente nas revascularizações do miocárdio com uso de circulação extracorpórea;^{40,41} (3) os macrófagos foram as células mais investigadas, e em muitos estudos foi a única célula estudada;^{18,35-39,42} (4) somente dois estudos investigaram linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, mas em material cirúrgico;^{33,36} (5) a contagem destas células inflamatórias foi feita em poucos campos de contagem;^{18,35,36} (6) a maioria dos estudos teve um tamanho de amostra pequeno, e em alguns, a investigação dos macrófagos no TAP não foi a análise principal sendo realizada em uma pequena parte da amostra, reduzindo o poder do estudo de detectar diferenças;^{33,35} (7) Nenhum estudo realizou análise multivariada com ajuste para possíveis fatores de confusão; (8) Nenhum estudo prévio investigou a associação das células inflamatórias no TAP com placas ateroscleróticas instáveis.

A partir destes estudos, houve a pergunta se a inflamação no TAP atua localmente na placa aterosclerótica ou difusamente em todo o tecido adiposo. Para isto, dois estudos compararam um segmento proximal e distal determinados pelo óstio da artéria coronária.^{37,38} Os resultados foram controversos. No primeiro estudo encontraram associação do número de

macrófagos no TAP com o número de macrófagos, linfócitos T e B na placa aterosclerótica e com a porcentagem de obstrução e características de placas ateroscleróticas avançadas.³⁷ Noutro estudo, não encontraram associação.³⁸ No entanto, somente os macrófagos foram investigados no TAP periplaca, e os fragmentos amostrados como controle (distal) não foi determinado localmente pela localização da placa aterosclerótica, mas sim pelo óstio das artérias coronárias.^{37,38}

Dessa forma, a pergunta se a inflamação no TAP é local ou difusa permanece aberta. Os linfócitos T no TAP em humanos não foram investigados em estudos de autópsia, que permitem análises morfométricas, caracterização da placa aterosclerótica e quantificação direta das células inflamatórias. Além disso, estudos de autópsia não desencadeiam inflamação como nos procedimentos cirúrgicos. Finalmente, nenhum estudo investigou a associação entre placas instáveis e inflamação no TAP com medidas morfométricas das células imunes. Para elucidar estas questões, recentemente nós desenvolvemos um estudo intitulado “Associação entre inflamação no tecido adiposo epicárdico e doença arterial coronariana: um estudo clinicopatológico”, tema de mestrado da atual doutoranda, publicado em 2019.⁴³ O estudo obteve financiamento da FAPESP através do Auxílio Regular (2013/00335-3) e bolsa de mestrado (2013/12290-3). A pesquisa teve como objetivo investigar a correlação entre a inflamação do TAP adjacente à placa aterosclerótica (periplaca) com a porcentagem de obstrução arterial e com a presença de placas estáveis e instáveis. Além disso, comparamos a inflamação no TAP periplaca com uma amostra de TAP controle (i.e., sem lesões ateroscleróticas e distal das outras placas).

A metodologia com a padronização e descrição do estudo foi publicada.⁴⁴ Reunimos uma amostra composta por 82 indivíduos, divididos em dois grupos: 54 com placas estáveis e 28 com placas instáveis. Todas as artérias coronárias (artéria coronária direita – CD, tronco da artéria coronária esquerda – TCE/ artéria coronária descendente anterior – DA, e artéria coronária circunflexa – CX) foram avaliadas. Com isso, obtivemos 205 amostras de placas estáveis e 41 instáveis. Encontramos uma correlação positiva entre o aumento da densidade de macrófagos e linfócitos B no TAP periplaca com a porcentagem de obstrução em artérias coronárias. Além

disso, houve um aumento da densidade de macrófagos no TAP periplaca na presença de placas ateroscleróticas instáveis comparado com lesões estáveis. Os resultados se mantiveram quando comparamos o TAP periplaca com o TAP próximo a um seguimento arterial controle (sem lesões ateroscleróticas e distal das placas ateroscleróticas). Todas as análises foram ajustadas para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes, índice de massa corpórea (IMC), tabagismo, sedentarismo e etilismo. Com estes resultados conseguimos demonstrar que a inflamação inata (macrófagos) e humoral (linfócitos B) foi maior no TAP que circunda placa aterosclerótica avançada.⁴³

No entanto, sabemos que as células inflamatórias apresentam diferentes polarizações e linhagens com atuações pró e anti-inflamatórias. A partir destes resultados, o próximo passo é determinar qual é o fenótipo predominante desta inflamação através da investigação de linhagens e polarizações. O perfil da inflamação no TAP e sua associação com características de placas ateroscleróticas avançadas, sejam elas estáveis ou instáveis, ainda foi pouco estudado. Um estudo prévio¹⁸ padronizou e investigou o fenótipo dos macrófagos no TAE obtido em cirurgia, e comparou entre indivíduos com DAC e controles. Encontraram maior proporção de M1/M2 em pacientes com DAC comparado com controles. Entretanto, este estudo apresenta limitações anteriormente descritas e a linhagem dos linfócitos T ainda não foi caracterizada no TAP em humanos associados com a aterosclerose. Outro estudo prévio,³⁹ comparou a densidade de macrófagos CD68⁺, M1 CD11c⁺, M2 CD206⁺, e presença de linfócitos T (CD45⁺) em amostras de TAP de indivíduos submetidos à revascularização do miocárdio e troca valvar (pacientes controles) em uma amostra de 34 indivíduos, e além disso, um segmento controle distal adjacente à artéria não estenosada também foi avaliado. Encontraram que macrófagos de modo geral foram mais frequentes em área com estenose e não encontraram diferença entre linfócitos T. Não encontraram diferença de infiltrados de macrófagos M1 e M2 entre TAP periplaca e distal, e no TAP periplaca os macrófagos M2 foram mais abundantes. E um terceiro estudo, de Gurses e colaboradores,⁴² reuniram uma amostra com 32 pacientes com DAC (18 amostras de pacientes submetidos à revascularização do miocárdio) e controles (14 participantes submetidos a outras

cirurgias cardíacas), dos quais foram amostrados TAE da parede livre do ventrículo esquerdo perto da artéria coronária com lesão. As subpopulações de macrófagos foram detectadas através da técnica de imuno-histoquímica (CD11c⁺ e CD206⁺). A densidade de macrófagos M1 foi maior no grupo com DAC do que nos pacientes controles, e os macrófagos M2 não diferiram entre os grupos. A razão da densidade de macrófagos M1 sobre M2 também foi maior no grupo DAC comparado aos controles, refletindo um fenótipo pró-inflamatório. A densidade de macrófagos M1 também foi superior no TAE do que na amostra de tecido adiposo subcutâneo, coletada na abertura do tórax para o procedimento cirúrgico.

Estes estudos que investigaram a polarização no TAP apresentaram resultados controversos e compararam indivíduos controles com indivíduos que tem DAC com amostras provenientes de cirurgia cardíaca.

Portanto, um novo estudo de autópsia com a caracterização do perfil inflamatório do TAP periplaca e distal a placa com uma avaliação histopatológica da aterosclerose é de suma importância para investigar qual perfil inflamatório no TAP está associado com a aterosclerose, incluindo o tamanho da placa e os componentes da placa aterosclerótica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Dados Epidemiológicos

A prevalência das doenças não transmissíveis (DNT) estão aumentando globalmente. Em 2012 foram responsáveis por 38 milhões de mortes (68% do total de mortes no mundo),⁴⁵ e as estatísticas mais atuais reportadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) reportam que em 2021 foram 41 milhões de mortes (71% do total de mortes no mundo).⁴⁶ Este aumento ocorreu em todas as regiões do mundo (Figura 1).

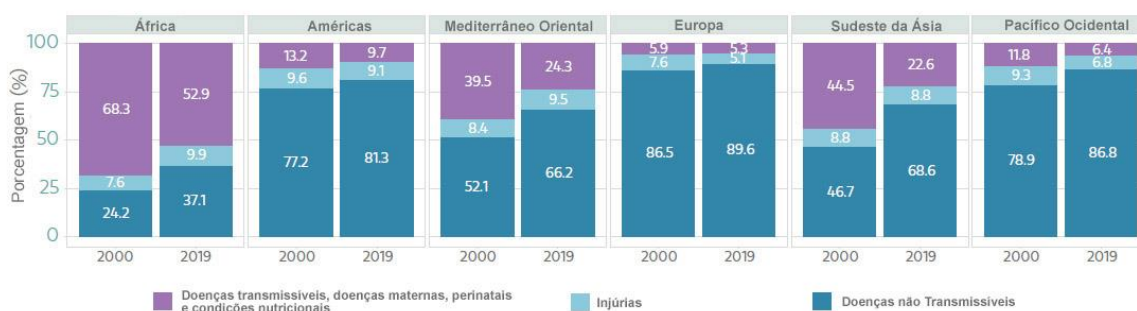


Figura 1. Comparação em porcentagem das doenças não transmissíveis entre os anos 2000 e 2019 nas regiões do mundo. Fonte: Adaptado e traduzido do “*World Health Statistics 2022: monitoring health for the sustainable development goals*”.⁴⁷

As DCV são a principal causa de morte no mundo com 17,9 milhões de óbitos ao ano, que corresponde a 32% dentre todas as causas.² Os óbitos por DCV ocorrem com maior prevalência em países de média e baixa renda (75%),² onde a probabilidade de morrer por DCV, câncer, diabetes e doenças do trato respiratório é grande.⁴⁸ Estudo feito pelo “*Global Burden of Disease*” mostrou que a prevalência de DCV dobrou entre os anos de 1990 e 2019. Em 1990, a prevalência de DCV foi de 271 milhões com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) que variou entre 257 a 285 milhões, e em 2019 foi de 523 milhões com IC de 95% que variou entre 497 a 550 milhões. O mesmo ocorreu com número de óbitos, que em 1990 foi de 12,1 milhões de mortes com IC de 95% que variou entre 11,4 a 12,6 milhões, e em 2019 foi de 18,6 milhões com IC de 95% que variou entre 17,1 a 22,5 milhões (Figura 2).⁴⁹

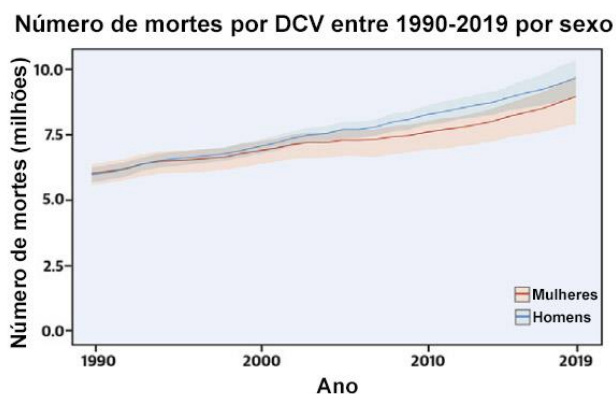


Figura 2. Mortalidade por doenças cardiovasculares no período de 1990 a 2019 no mundo.

Fonte: Adaptado e traduzido de “*Global Burden of Disease Group*”, 2020.⁴⁹

Dentre as DCV, as doenças isquêmicas do coração (DIC) lideram a causa de morte desde o ano de 2000 e permanecem como primeira causa até hoje. Em 2019, segundo a OMS, ocorreram 8,9 milhões de mortes por DIC que corresponde 16% dentre todas as causas de morte no mundo (Figura 3).³ A prevalência de indivíduos acometidos por DIC foi estimada em 197 milhões em 2019.⁴⁹ Projeções futuras estimam um aumento para 137 mortes a cada 100.000 habitantes em 2030 e continuará crescente com 162 óbitos a cada 100.000 habitantes em 2060.⁵⁰

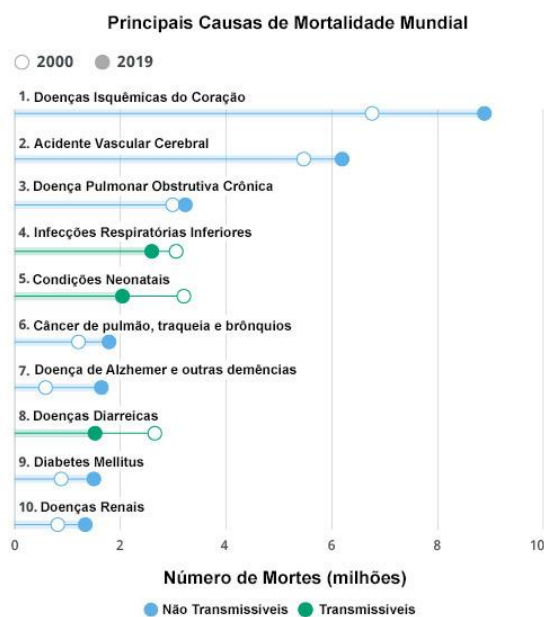


Figura 3. Comparação da prevalência das principais causas de morte mundial entre o ano de 1990 e 2019. Fonte: Adaptado e traduzido da Organização Mundial da Saúde, 2020.³

As DIC também são a primeira causa de incapacidade. DALY (“Disability-Adjusted Life Year”) é uma medida que estima, por causas específicas, os anos de vida saudáveis perdidos por incapacidade.⁵¹ DIC tem tido um crescimento constante de DALY desde 1990, atingindo uma prevalência de 182 milhões com IC de 95% que varia entre 170 a 184 milhões em 2019. Esse crescimento em números absolutos ocorreu na maior parte dos países e ressalta a importância dos sistemas de saúde se preparem para atender estas populações. O crescimento de DALY é maior em homens comparado às mulheres. O aumento de DALY nos homens começa a partir dos 30 anos. Os índices de DALY entre homens e mulheres atingem números semelhantes para homens com 45 a 49 anos e mulheres com 65 a 69 anos, ou seja, em homens os anos perdidos pela incapacidade acontece antes e atinge a fase produtiva.⁴⁹

Além de serem a primeira causa de DALY, as DIC em 2017 se tornaram a primeira causa de anos de vida perdidos (*Years of Life Lost – YLL*). Houve um aumento médio do número de YLL de 17,3% entre 2007 a 2017, como também houve um aumento médio na taxa de YLL a cada 100.000 indivíduos de 3,9% entre 2007 a 2017 (Figura 4).⁵² Projeções futuras para 2040 estimam que as DIC permanecerão em primeiro lugar para anos de vida perdidos (Figura 5).^{52,53}

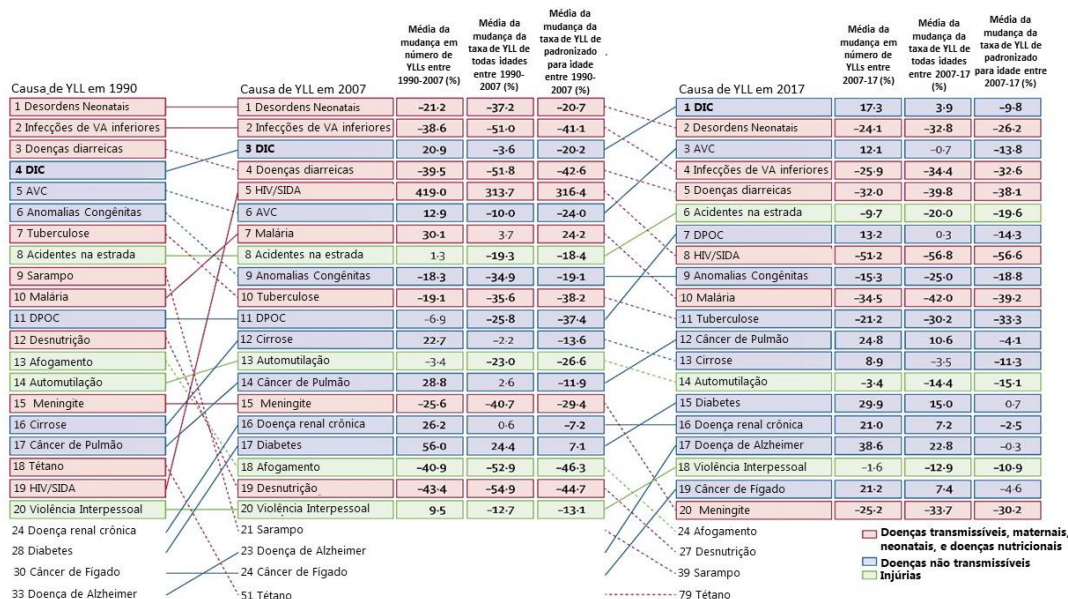


Figura 4. Variação das 20 principais causas de anos de vida perdidos mundialmente no período entre 2007 a 2017. Fonte: Adaptado e traduzido de “Global Burden of Disease Group”, 2018.⁵²

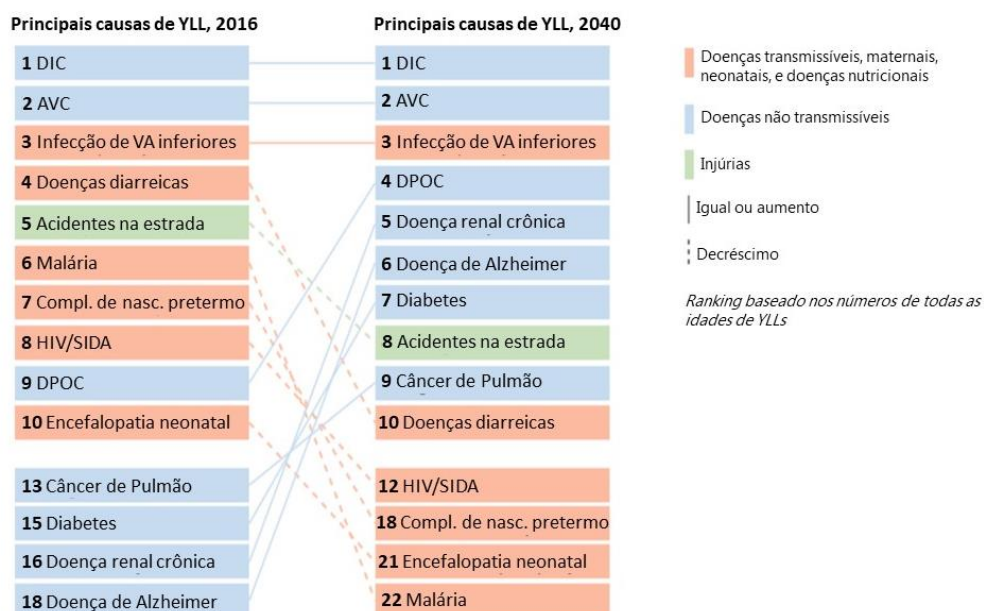


Figura 5. Projeções para 2040 para as 20 principais causas de anos de vida perdidos (YLL). Fonte: Adaptado e traduzido de “*Global Burden of Disease Group*”, 2018.⁵²

O Brasil é um dos países que mais contribuem para a elevada prevalência de mortalidade por DCV mundialmente com 184 mortes a cada 100.000 indivíduos. A Ucrânia tem um destaque com o primeiro lugar com uma taxa de 1.020 mortes a cada 100.000 indivíduos. Essa taxa é mais que o dobro da Polônia que ocupa o segundo lugar com 455 mortes a cada 100.000. O Brasil está atrás da Alemanha (249), Cazaquistão (355), Cuba (350), China (322), Estados Unidos da América (292), Fiji (390), Egito (266), Indonésia (251), Argentina (225), Austrália (210) e Índia (185) (Figura 6). A taxa de mortalidade por DIC no Brasil comparado com o cenário mundial apresenta tendência semelhante às DCV, com um platô entre 1990 a 2019 com aproximadamente 79 mortes a cada 100.000. Além disso, o Japão, Angola e África do Sul entraram na lista como os países que mais contribuíram para a mortalidade mundial por DIC entre 1990 e 2019 (Figura 7).⁵⁴

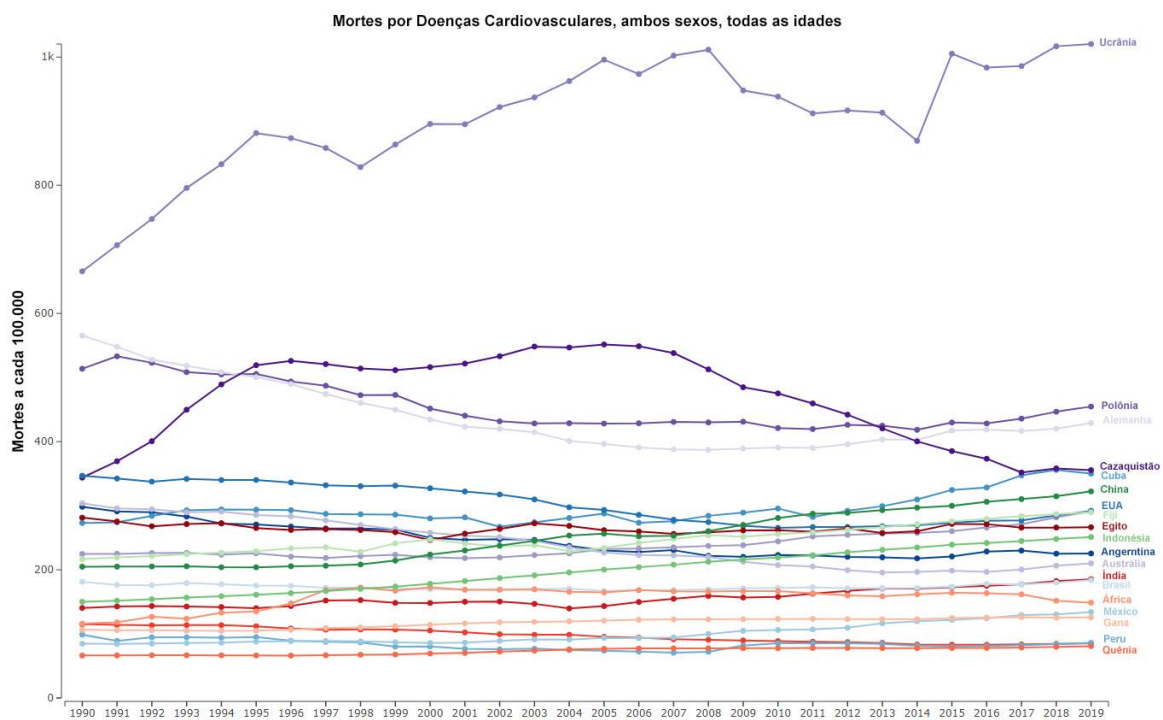


Figura 6. Gráfico de tendência da taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares entre os anos de 1990 a 2019. Fonte: Adaptado e traduzido de “*Global Burden of Disease Group*”, 2020.⁵⁴

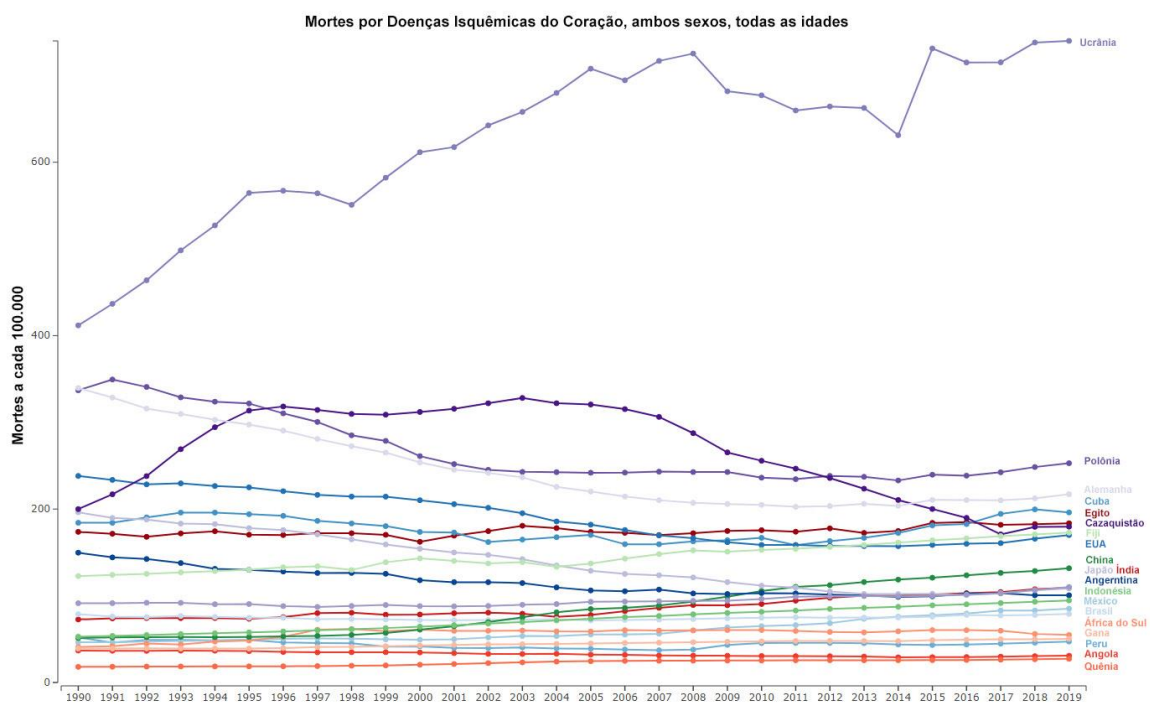


Figura 7. Gráfico de tendência da taxa de mortalidade por doenças isquêmicas do coração entre 1990 a 2019. Fonte: Adaptado e traduzido de “*Global Burden of Disease Group*”, 2020.⁵⁴

No Brasil, as DIC são responsáveis por 12,1% das causas de óbito (IC de 95%=11,2 a 12,7%).^{54,55} Embora a taxa de mortalidade por DIC tenha mantido um platô,⁵⁴ os números absolutos aumentaram expressivamente no período entre 2009 a 2019, com 15.305 e 18.604 óbitos, respectivamente.⁵⁶ Centros internacionais de análise em dados de saúde apontam que no período de 2009 a 2019, o aumento foi de 18%. É importante ressaltar que dentro destas causas de óbito, incluem as mortes por causa violenta (Figura 8).⁵⁷

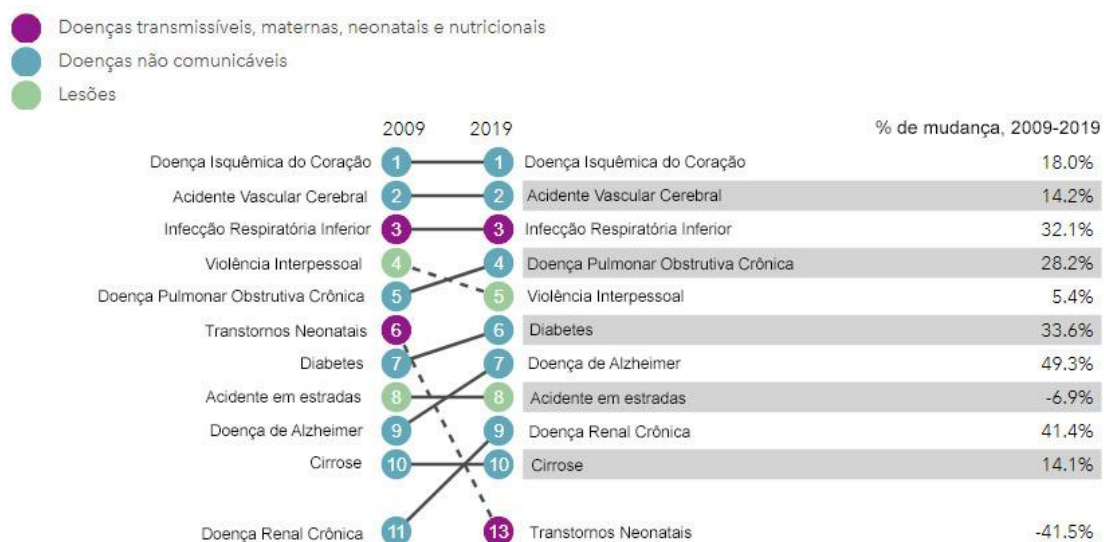


Figura 8. Variação das 10 principais causas de morte no Brasil no período de 2009 a 2019. Fonte: *Institute for Health Metrics and Evaluation by Global Burden of Disease Group*, Universidade de Washington, EUA.⁵⁷

Além disso, óbitos por doenças isquêmicas do coração subiram de terceira para segunda posição como causa de morte prematura. Este crescimento foi de 15,4% no período entre 2007 a 2017 no Brasil (Figura 9).⁵



Figura 9. Principais causas de morte prematura no Brasil no período de 2007 a 2017. Fonte: *Institute for Health Metrics and Evaluation by Global Burden of Disease Group*, Universidade de Washington, EUA.⁵

As informações mais atualizadas sobre mortalidade no Brasil mostram que no ano de 2019 tivemos um total de 95.557 óbitos por IAM e 18.604 por DIC. A região Sudeste teve a maior prevalência de mortes, seguida da região Nordeste e Sul (Tabela 1).

Tabela 1. Números absolutos de óbitos por infarto e doenças isquêmicas do coração período de 2019-2020 segundo Sistemas de Informações sobre Mortalidade, DATASUS, 2022.

| Números Absolutos de Óbitos | Total | Norte | Nordeste | Sudeste | Sul | Centro-Oeste |
|-----------------------------------|----------------|-------|----------|---------|--------|--------------|
| 2019 | | | | | | |
| . IAM | 95557 | 5450 | 27046 | 44332 | 12532 | 6207 |
| . Infarto recorrente do miocárdio | 200 | 11 | 113 | 43 | 27 | 6 |
| . DIC | 18.604 | 417 | 3.482 | 9.850 | 3.609 | 1.246 |
| . Outras DIC | 2.560 | 134 | 572 | 1.324 | 335 | 195 |
| Total 2019 | 116.921 | | | | | |
| 2020 | | | | | | |
| . IAM | 90.465 | 5.562 | 25.057 | 41.702 | 11.852 | 6.292 |
| . Infarto recorrente do miocárdio | 156 | 14 | 79 | 37 | 19 | 7 |
| . DIC | 15.427 | 371 | 3.396 | 6.789 | 3.611 | 1.260 |
| . Outras DIC | 2.868 | 131 | 734 | 1.498 | 298 | 207 |
| Total 2020 | 108.916 | | | | | |

IAM: infarto agudo do miocárdio; DIC: doenças isquêmicas do coração.

Fonte: Dados tabulados do Banco de Dados do Sistema Único de Saúde – DATASUS, Ministério da Saúde, 2022.⁵⁶

Embora em números absolutos tenha tido um decréscimo de óbitos entre 2019 e 2020 em DIC de maneira geral e o mesmo também foi observado no mesmo período em números absolutos de internações no SUS (Sistema Único de Saúde), houve um aumento expressivo entre 2020 e 2021 (Tabela 2).⁵⁶ A pandemia ocasionada pela doença do coronavírus 19 (COVID-19) pode explicar a diminuição observada no ano de 2020 comparada com 2019, porque gerou uma causa de morte competitiva com as DCV. Esta competitividade pode ter sido por dois fatores: (1) antecipação de mortes pela COVID-19 que seriam ocasionadas pelas DCV e (2) migração da mortalidade por DCV como comorbidade ao invés de causa básica. Esta migração foi estimada em torno de 77%. A redução da internação hospitalar também pode ser explicada pela atuação pela COVID-19, porque no início da epidemia instalada em março de 2020 no Brasil, houve menos internações hospitalares onde tratamentos de emergência eram necessários, incluindo IAM.⁵⁸

Tabela 2. Números absolutos de internações no sistema único de saúde por infarto e doenças isquêmicas do coração no período de 2019-2021, segundo Sistemas de Informações sobre Mortalidade – DATASUS, 2022.

| Números Absolutos de internações no SUS | Total | Norte | Nordeste | Sudeste | Sul | Centro-Oeste |
|--|----------------|--------------|-----------------|----------------|------------|---------------------|
| 2019 | | | | | | |
| . IAM | 131.199 | 5.312 | 26.510 | 64.849 | 24.445 | 10.083 |
| . DIC | 157.533 | 5.058 | 24.499 | 67.080 | 50.060 | 10.836 |
| Total 2019 | 288.732 | | | | | |
| 2020 | | | | | | |
| . IAM | 130.441 | 5.226 | 24.618 | 64.384 | 25.183 | 11.050 |
| . DIC | 126.417 | 4.134 | 21.282 | 54.109 | 37.329 | 9.563 |
| Total 2020 | 256.858 | | | | | |
| 2021 | | | | | | |
| . IAM | 262.601 | 10.725 | 51.810 | 121.057 | 57.612 | 21.397 |
| . DIC | 121.787 | 4.513 | 23.064 | 53.142 | 31.712 | 9.447 |
| Total 2021 | 384.388 | | | | | |

IAM: infarto agudo do miocárdio; DIC: doenças isquêmicas do coração.

Fonte: Dados tabulados do Banco de Dados do Sistema Único de Saúde – DATASUS, Ministério da Saúde, 2022.⁵⁹

Embora os dados de óbitos do ano de 2021, até esta data, não estejam disponíveis, os dados de internação hospitalar pelo SUS evidenciam um aumento expressivo de internações por DIC e IAM. Este aumento já era esperado e pode continuar a se refletir nos próximos anos, devido à falta de acompanhamento e de controle de fatores de risco associados às DCV e DIC como HAS e diabetes⁵⁸ uma vez que 97,5% (IC 95%= 91,1% a 96,2%) das mortes por DIC são atribuíveis aos fatores de risco.⁵⁴

Além da alta morbimortalidade no Brasil, as DIC representam a segunda causa de incapacidade por DALY entre todas as causas (incluindo as doenças transmissíveis, DNT e causas violentas) perdendo só para violência.⁵⁷ As DICs ocuparam 5,7% do total de todas as causas de incapacidade em 2019, com IC de 95% que variou entre 5,1% a 6,3%.⁵⁴ Dentro desse índice inclui fatores de risco, como diabetes.⁵⁴ Adicionalmente, observamos um crescimento de 13% de DALY combinado com óbito entre período de 2009 a 2019 para DIC (Figura 10).⁵

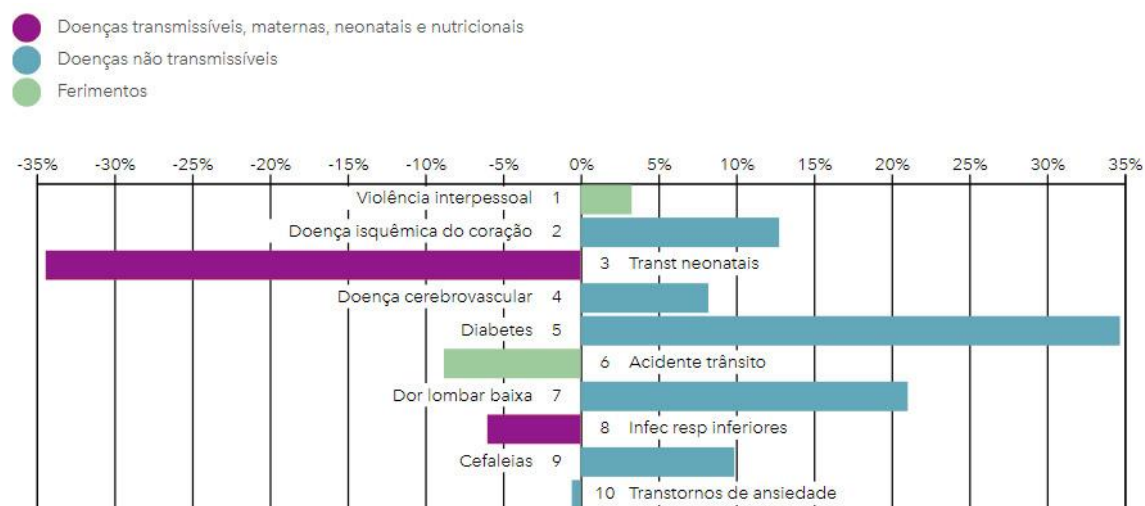


Figura 10. Principais causas de anos de vida perdidos por morte combinado com incapacidade no Brasil entre o período de 2009 a 2019. Fonte: *Institute for Health Metrics and Evaluation by Global Burden of Disease Group*, Universidade de Washington, EUA.⁵⁷

Fatores de risco como diabetes, dislipidemia, HAS, tabagismo e obesidade são responsáveis pela alta prevalência e incidência de DCV e DAC.¹⁴ Na figura 11, podemos observar os fatores de riscos que mais contribuem para causa de morte e incapacidade juntos no Brasil.

Todos os fatores de risco citados, exceto tabagismo, tiveram aumento expressivo de prevalência entre 2009 a 2019.⁵⁷

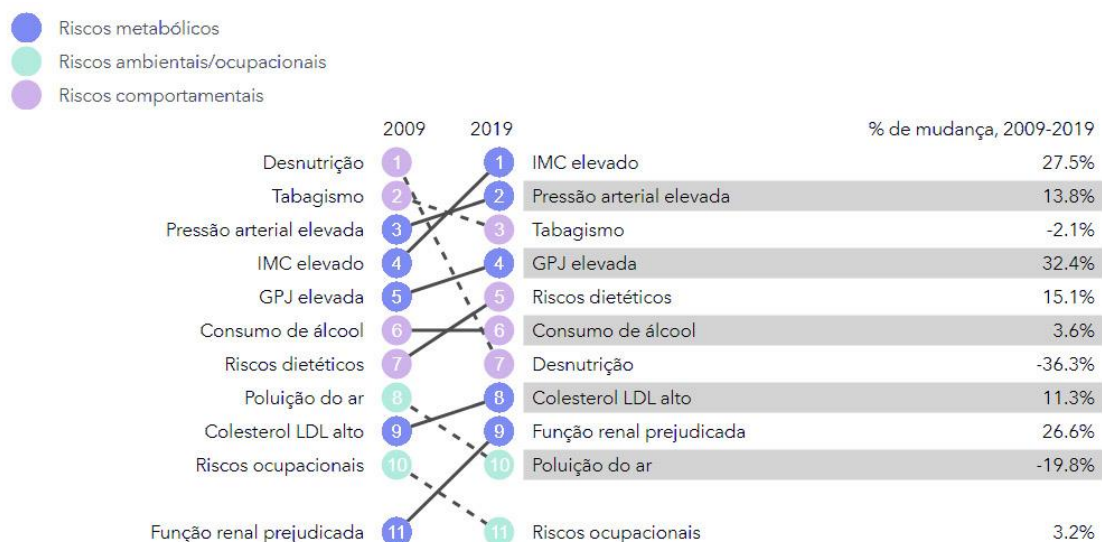


Figura 11. Fatores de risco que mais contribuem para causa de morte e incapacidade no Brasil.

Fonte: *Institute for Health Metrics and Evaluation by Global Burden of Disease Group*, Universidade de Washington, EUA.⁵⁷

Os fatores de riscos podem ser agrupados em metabólicos (obesidade e LDL colesterol), riscos comportamentais (tabagismo, dieta inadequada, e consumo de álcool) e riscos ambientais (riscos ocupacionais e poluição do ar). Quando analisamos o quanto que estes fatores contribuem diretamente para mortes por DIC, os riscos metabólicos são responsáveis por 10,4% do total de mortes. Taxa que aumentou de 2017 para 2019: 62,1 para 67,9 mortes a cada 100.000 habitantes (IC de 95%= 60,4 a 74,2). Os riscos comportamentais foram responsáveis por 7,5% do total de mortes em 2019 com uma taxa de 49,1 mortes a cada 100.000 habitantes (IC de 95%= 43,2 a 54,7). A taxa de contribuição do risco comportamental às DICs diminuiu, pois em 2017 era de 62,3. Finalmente, os riscos ambientais foram responsáveis por 1,8% do total de mortes para DIC com uma taxa de 12,0 mortes a cada 100.000 habitantes (IC de 95%= 8,6 a 15,2) (Figura 10).⁵⁴

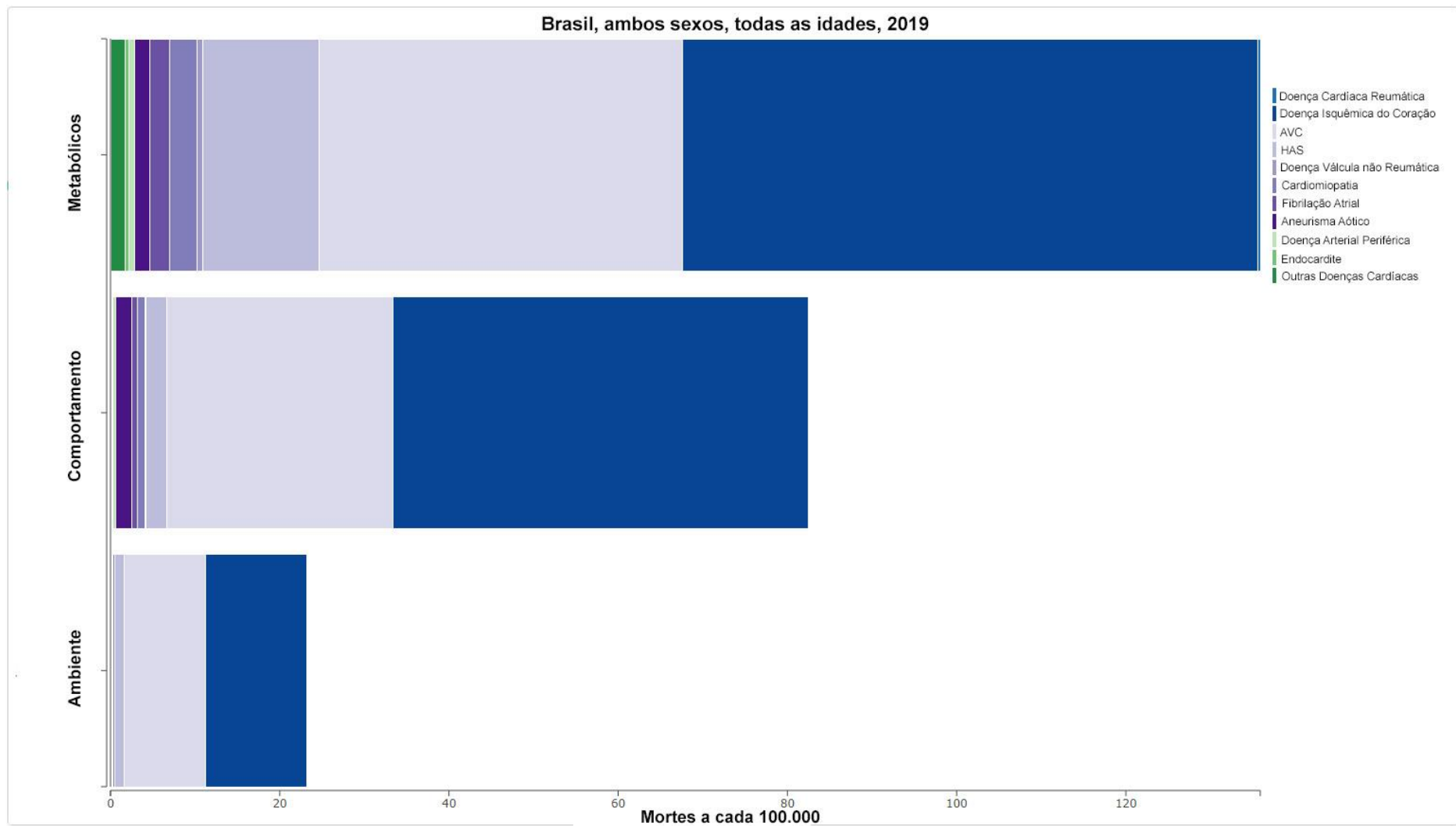


Figura 12. Risco atribuível dos fatores de risco agrupados para a mortalidade das doenças isquêmicas do coração no Brasil em 2019. Fonte: Adaptado e traduzido *Institute for Health Metrics and Evaluation by Global Burden of Disease Group*, Universidade de Washington, EUA.⁵⁴

2.2 Anatomia das artérias coronárias

As artérias em condições normais apresentam uma estrutura trilaminar, das quais fazem parte a túnica íntima, média e adventícia (Figura 11).⁶⁰

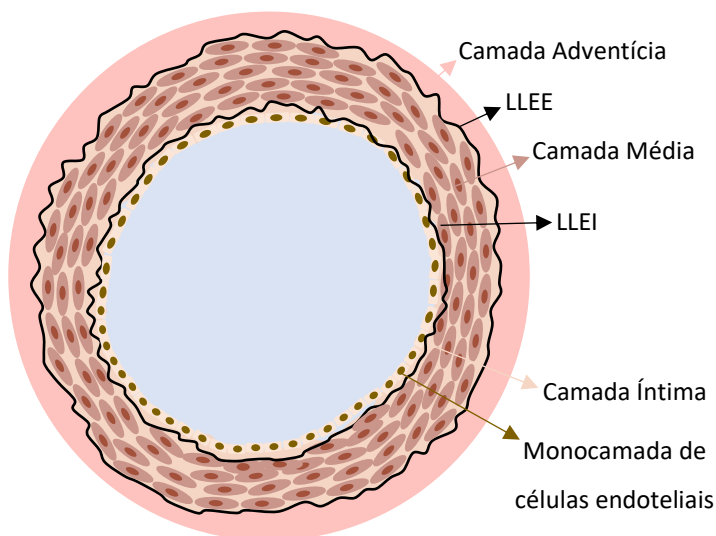


Figura 13. Representação gráfica de uma artéria em condições de normalidade. LLEE: Lâmina Limitante Elástica Externa; LLEI: Lâmina Limitante Elástica Interna. Fonte: Arquivo Pessoal.

2.2.1 Camada íntima

A camada íntima é a região da parede arterial entre a superfície endotelial (camada única de células endoteliais adjacente à lâmina basal) e a margem da camada média.^{9,60,61} A lâmina limitante elástica interna (LLEI), geralmente considerada parte da camada média,⁶¹ é a estrutura que faz fronteira entre a camada íntima e média,^{60,61} que pode estar ausente em algumas regiões de transição arterial como bifurcações, ramos e curvaturas.⁶¹

As células endoteliais participam da homeostase vascular através de várias propriedades. A primeira é a capacidade antitrombótica, isto é, a capacidade de manter o sangue em estado líquido devido à liberação de moléculas proteoglicanas de heparan sulfato em sua superfície. Estas moléculas são cofatores da antitrombina III que podem ativar e inativar a trombina. A segunda

propriedade está em sua capacidade de ativar componentes fibrinolíticos caso haja formação de trombos através de mecanismos que formam a enzima plasmina que possui ação fibrinolítica.⁶⁰

Estudo de autópsia investigou a espessura da camada íntima normal em artérias coronárias de crianças com até 5 anos de idade (n=63). O espessamento da camada íntima foi encontrado inclusive na primeira semana de vida com dois padrões contínuos e complementares entre si: (1) excêntrico, encontrado próximo às bifurcações ocupando metade da parede da artéria de forma crescente até atingir várias vezes a espessura da camada da artéria. A coronária descendente anterior apresentou a maior frequência de espessamento máximo. Este espessamento diminuiu gradualmente, afinando ao longo da artéria; (2) difuso, encontrado com mais frequência nos locais onde não havia espessamento excêntrico. Os espessamentos excêntricos e difusos são respostas às alterações hemodinâmicas e não são patológicas.⁶²

2.2.2 Camada Média

A túnica média apresenta camadas concêntricas de células musculares lisas (CML) mais desenvolvidas envolvidas com matriz extracelular ricas em elastina. A camada média armazena a energia cinética proveniente da sístole do ventrículo esquerdo pelas grandes artérias. As CML geralmente não se proliferam e as taxas de morte celular destas células são baixíssimas em condições normais, desse modo, há um equilíbrio tanto de proliferação quanto de morte celular.⁶⁰

2.2.3 Camada Adventícia

A camada adventícia é constituída por fibrilas de colágeno em um arranjo mais frouxo comparado à camada íntima,⁶⁰ por um tecido conjuntivo,⁶³ e na parte mais externa há terminações nervosas e *vasa vasorum*.^{60,63} O *vasa vasorum* são pequenas artérias e veias, que pode ser encontrado na parede de várias artérias, incluindo as artérias coronárias.^{64,65} Além destas estruturas temos a presença de fibroblastos e mastócitos em proporções mais esparsas quando comparada a outras camadas.⁶⁰ A camada adventícia está estruturalmente conectada com o tecido adiposo perivascular, por não ter estruturas que formem fronteiras e separem as duas estruturas.⁶³

2.3 Doença Arterial Coronariana

A DAC é quase sempre causada por aterosclerose coronariana, que pode ter ou não a presença de trombose e vasoespasmos. A aterosclerose pode causar angina estável, e também desencadear a formação de trombose arterial, com importante papel na patogênese da SCA. A SCA inclui: infarto com ou sem supra desnivelamento de segmento ST no eletrocardiograma e angina instável, caracterizado dor precordial desencadeada em repouso. A morte súbita é também outra manifestação fatal da aterosclerose em DAC.⁶⁶

A aterosclerose é uma doença sistêmica, que pode ser definida como uma resposta imune e inflamatória causada por lipídios ricos em LDL colesterol em artérias de médio e grande calibre levando ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas multifocais.^{12,66}

A DAC é considerada atualmente uma epidemia. A diminuição das doenças infecciosas proporcionou um aumento da sobrevivência na população e conseqüentemente aumento das doenças não transmissíveis. Entretanto, as lesões já foram identificadas em múmias egípcias há mais de 100 anos. A participação de células na aterogênese já tem sido reportada desde o início do século passado, quando a DAC foi considerada uma doença proliferativa. Somente na metade do século passado foi descoberto a participação dos lipídios no desenvolvimento da aterosclerose.⁶⁰

A formação das placas de aterosclerose se inicia com lesões focais, mas o porquê da predileção de formação de lesões em alguns locais é ainda um grande desafio, por envolver muitos fatores de risco.⁷ As regiões proximais das artérias têm um predomínio de formação de lesões, e deste modo, infere-se que a origem seja hidrodinâmica, pelo fato de que artérias com poucas ramificações não desenvolvem muitas placas de aterosclerose.⁶⁰ Dessa forma, há uma hipótese de que distúrbios de fluxo podem predispor o desenvolvimento da aterosclerose. A força de cisalhamento pode aumentar a expressão de genes que parecem proteger contra a aterosclerose. Estes genes aumentam a síntese de óxido nítrico (além de potente vasodilatador, também resiste à ativação inflamatória pelas células endoteliais) e da enzima superóxido dismutase (tem capacidade de reduzir o estresse oxidativo). Já um fluxo com turbilhonamento laminar limita a

expressão do regulador endotelial chamado “proteína de interação com a tioredoxina”, que em condições normais diminui a inflamação por uma série de vias^{6,60}.

2.4 Classificação anatomopatológica das placas ateroscleróticas

A classificação das lesões ateroscleróticas ganhou força no fim nos anos 80 e início dos anos 90 com as publicações do autor Herbert C. Stary vinculadas à *American Heart Association (AHA)*. Este autor estudou e descreveu desde o início da formação das placas ateroscleróticas até as lesões agudas e crônicas.^{61,67,68} Em 2000, a classificação foi atualizada porque a versão antiga trazia a ideia de uma progressão linear com desfecho em placas instáveis, capazes de desencadear uma SCA (Figura 14).^{67,68} Após um grande debate científico que contestou esta progressão linear através de publicações,⁶⁹ uma nova proposta foi publicada.⁷⁰

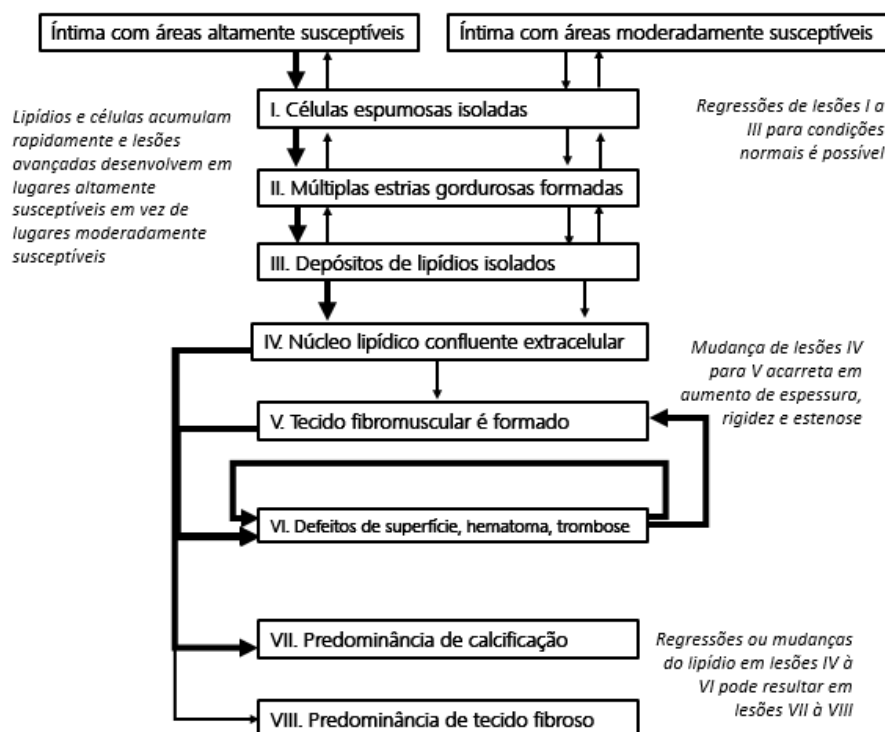


Figura 14. Classificação das placas de aterosclerose proposta pela *American Heart Association* em 2000, elaborado por Stary. Fonte: Adaptado e traduzido da classificação *American Heart Association*.⁷⁰

Entretanto, a autora Renu Virmani, através de pesquisas anatomopatológicas detalhadas das placas de aterosclerose em artérias coronárias,⁷¹⁻⁷⁵ propôs em 2016 uma nova classificação que apresenta novos elementos como placas ateroscleróticas cicatrizadas, remoção da classificação IV e V que foram substituídas por uma nova classificação (Tabela 3).⁷⁶

Tabela 3. Classificação anatomopatológica de placas ateroscleróticas.

| Tipo da Lesão | Subtipo da Lesão | Descrição morfológica |
|---|--|---|
| Lesões intimais não-ateroscleróticas | Espessamento Intimal | Acúmulo natural de CML com ausência de lipídios, células espumosas e trombose. |
| | Xantoma Intimal | Acúmulo superficial de células espumosas sem a formação de um núcleo necrótico, formação de capa fibrosa ou trombose. |
| Lesões Ateroscleróticas Progressivas | Espessamento Intimal Patológico | Placa enriquecida com CML, com matriz com hialuronano e proteoglicanos e um acúmulo focal de lipídio extracelular. Trombose está ausente. |
| | Fibroateroma | Durante a <i>necrose inicial</i> : infiltração de macrófagos focal nas áreas de núcleos lipídios com uma capa fibrosa suprajacente. Durante a <i>necrose tardia</i> : perda da matriz e extensos detritos celulares com uma capa fibrosa suprajacente. Calcificação pode ou não estar presente. Trombose está ausente. |
| | Hemorragia intraplaca ou placa fissurada | Grande núcleo necrótico (>10% da área da placa) com hemorragia e a placa aterosclerótica apresenta angiogênese. O núcleo necrótico se comunica com |

| | | |
|---------------------------------|--|---|
| | | o lúmen através de uma fissura. Rompimento mínimo sem a presença de óbvia de trombose |
| | Fibroateroma de capa fina | Uma fina capa fibrosa (<65 µm) infiltrada por macrófagos e linfócitos, com raras ou ausentes CML e um núcleo necrótico relativamente grande (>10% da área da placa). Hemorragia intraplaca e/ou fibrina podem estar presentes. Trombose está ausente. |
| | Ruptura de Placa | Fibroateroma de capa fina com interrupção da capa. Trombose está presente e pode ou não ser oclusiva. O trombo no lúmen se comunica com o núcleo necrótico. |
| Lesões Agudas com trombo | Erosão de Placa | Pode ocorrer tanto em espessamento intimal patológico, quanto em fibroateromas. Trombose é presente, e, pode ou não ser oclusiva. Não há comunicação entre o trombo e o núcleo necrótico. |
| | Nódulo Calcificado | Erupção (descamativa) do nódulo calcificado unido a uma placa fibrocalcificada, com um núcleo necrótico mínimo ou ausente. Frequentemente a trombose não é oclusiva. |
| Lesões Cicatrizadas | Placas cicatrizadas que sofreram ruptura, erosão, ou processo agudo por nódulo calcificado | Lesões cicatrizadas são compostas de CML, proteoglicanos e colágeno do tipo III com ou sem ruptura da capa fibrosa subjacente, núcleo necrótico, ou nódulo calcificado. Estas lesões podem conter áreas grandes de calcificação com poucas células inflamatórias e ter um pequeno ou ausente núcleo necrótico. A placa fibrótica ou fibrocalcificada rica em colágeno é associada com |

uma estenose luminal significativa. Trombose está ausente.

CML: célula muscular lisa. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.1 Lesões Não Ateroscleróticas

O espessamento intimal difuso^{60,62} ou espessamento intimal adaptativo,⁷⁵ não está necessariamente associado ao acúmulo de lipídios ou aterosclerose e pode ocorrer em artérias de seres humanos com o envelhecimento (Figura 15). Neste espessamento, a camada íntima torna-se mais complexa com colágeno intersticial do tipo I e III, e as CML produzem matriz extracelular, constituinte da íntima arterial.⁶⁰ As células inflamatórias são poucas ou ausentes.⁷⁵ Este acúmulo de CML, ocorre na ausência de lipídios, células espumosas e trombose.⁷⁶ Alguns locais são mais propensos a desenvolver este espessamento, mesmo na ausência de aterosclerose.⁶⁰ O espessamento difuso ocorreu mais em locais onde não havia espessamento excêntrico, foi semelhante entre os sexos, portanto, são consideradas respostas às alterações hemodinâmicas e não são patológicas.⁶²

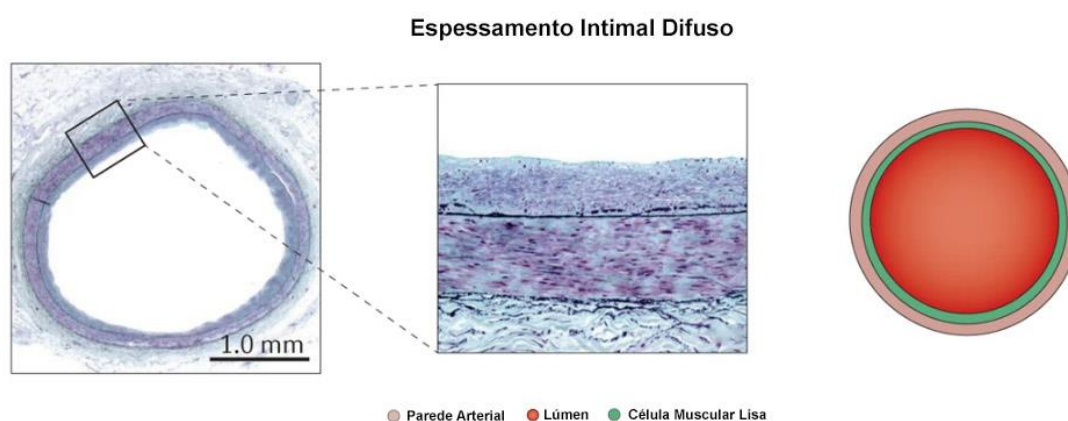


Figura 15. Espessamento intimal difuso ou adaptativo. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.2 Lesões iniciais

O principal mecanismo da formação de uma placa de aterosclerose é decorrente da exposição a uma dieta rica em lipídios. Esta hiperlipidemia favorece o acúmulo subendotelial na camada íntima arterial de lipoproteínas na parede do endotélio devido ao comprometimento da função endotelial.^{12,15,77} Estas lipoproteínas, uma vez no espaço subendotelial, sofrem oxidação, e assim tornam-se partículas de lipoproteínas modificadas (os fosfolipídios são oxidados e acrescentados aldeídos pela oxidação da lipoproteína).¹⁵ As enzimas responsáveis por essa oxidação são as proteases e lipases, que agregam e aumentam os proteoglicanos. Além disso, as oxidações podem ser desencadeadas por mioloperoxidase, lipoxigenase e espécies reativas de oxigênio. O LDL oxidado (oxLDL) é capaz de ativar a resposta imune inata⁷⁸ através da ativação das células endoteliais,¹⁵ que quando ativadas expressam moléculas de adesão de leucócitos VCAM-1 (molécula de adesão vascular) e também de quimiocinas.^{77,78} A indução de VCAM-1 pode ocorrer também por citocinas inflamatórias, como IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).^{6,10,15}

A VCAM-1 é responsável pela adesão precoce de leucócitos no endotélio vascular, principalmente de monócitos e linfócitos T por diapedese.^{6,10,15} Em condições normais, o endotélio resiste a esta aderência dos leucócitos,^{6,15} e, aparentemente, ratos geneticamente modificados para desenvolverem hipercolesterolemia (ApoE^(-/-)) e para ter menor expressão/atividade de VCAM-1, mostraram redução da formação de lesões ateroscleróticas.⁶

O monócito recrutado da corrente sanguínea se diferencia em macrófago por estimulação de mediadores como o estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF),^{77,78} produzido pelas células endoteliais e outras células presentes.⁷⁸ Os macrófagos, por sua vez, expressam receptores de varredura denominados como *scavenger* (CD36) que se ligam às partículas de lipoproteínas modificadas e internalizam estas lipoproteínas.^{6,15,60,78}

Esta fagocitose do oxLDL sobrecarrega a célula e compromete a sua capacidade de eliminação destas moléculas. Desse modo, o macrófago começa a acumular colesterol em seu interior, e ao longo do tempo, os macrófagos ficam repletos de partículas de colesterol e com isso adquirem a característica aparência de "células de espuma".^{6,15,60,78} A presença de células de espuma são compatíveis com a classificação I da proposta de Stary.⁶⁷ As células de espuma podem se replicar através da estimulação do M-CSF, da IL-3 e estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF).⁶⁰ Estudos recentes mostram que as CML vasculares quando expostas aos lipídios também podem se diferenciar e fagocitar assim como os macrófagos, mas com uma capacidade fagocitária reduzida.^{12,79}

Desta forma, os macrófagos são as células imunes mais numerosas na placa de aterosclerose.⁷⁸ Os macrófagos promovem uma inflamação no interior da placa de ateroma e contribuem para o desenvolvimento das lesões através da secreção de muitas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, eicosanoides (fator ativador de plaquetas), e espécies reativas de oxigênio.⁶⁰ Em lesões iniciais os macrófagos sofrem apoptose, com reconhecimento e posterior remoção de macrófagos eficientes. Este é um processo protetor (anti-inflamatório), desencadeado pela IL-10, que elimina as células antes que os danos da membrana levem a um extravasamento de conteúdo celular tóxico.¹⁵

2.4.2.1. Estrias Gordurosas ou Xantoma Intimal

As células espumosas podem evoluir para estrias gordurosas (lesões II da classificação de Stary), denominadas de xantoma intimal (classificação Yahagi),⁶⁹ lesões mais distintas e definidas do que as lesões I (Figura 16). Nesta fase, as CML começam a migrar da camada média para dentro da camada íntima em resposta às quimiocinas secretadas pelos macrófagos na placa de ateroma.⁶⁰ Em condições normais, as CML apresentam funções importantes como o controle de fluxo sanguíneo pela contração e o relaxamento, mas quando há aterosclerose são responsáveis pelo vasoespasm, que compromete ainda mais o fluxo sanguíneo. As CML auxiliam na construção da matriz extracelular arterial através da síntese dos principais componentes da matriz

extracelular: colágeno e sulfato glicosaminoglicanos.^{60,80,81} As CML podem se proliferar e migrar contribuindo para formações de lesões na camada íntima. A morte das CML podem desestabilizar a placa de aterosclerose ou propiciar a formação de aneurismas por propiciar o remodelamento.⁶⁰

Nas estrias gordurosas ou xantoma intimal, a maioria dos lipídios se encontram em macrófagos e CML. Os macrófagos são em maior número, principalmente próximos à superfície endotelial.⁶⁷ Nesta fase, há a presença de células espumosas sem a presença de núcleo necrótico, capa fibrosa ou trombose (Figura 16).⁷⁶ No espaço extracelular, há poucos lipídios, algumas partículas de lipoproteínas e proteoglicanos. As estrias gordurosas podem ocorrer em áreas distantes da superfície da camada íntima. Nas artérias coronárias, estas lesões podem surgir no início da adolescência e localizam-se na mesma região de lesões I em crianças. A progressão destas lesões está associada a forças mecânicas que atuam em áreas específicas das artérias e podem desencadear um afluxo e acúmulo precoce de lipídios em pessoas que apresentam níveis altos de lipoproteínas plasmáticas. Quando este aumento ocorre no período da adolescência ou em adultos jovens, há um aumento na quantidade de estrias gordurosas. Indivíduos com níveis elevados de lipoproteínas aterogênicas como o colesterol, casos de hipercolesterolemia familiar ou indivíduos de meia-idade podem ter um avanço acelerado para lesões avançadas, mesmo em locais não propensos, ou seja, em regiões não proximais ou longe de bifurcações.⁶⁷

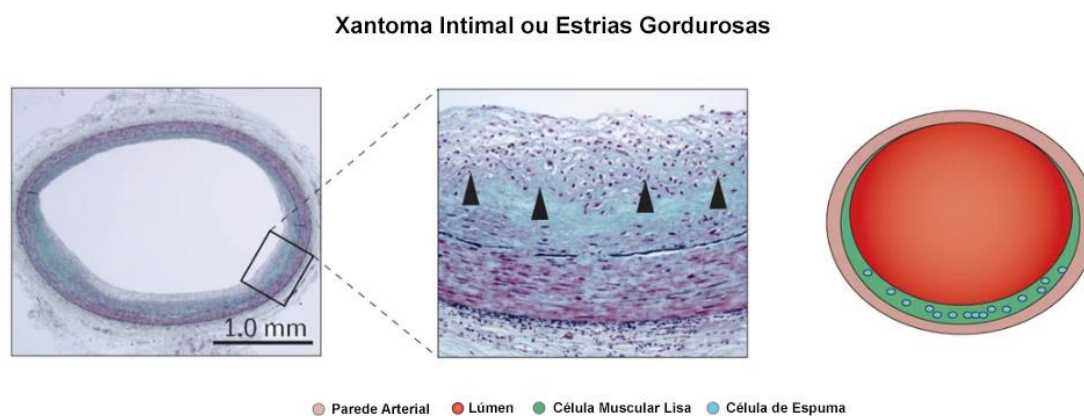


Figura 16. Xantoma intimal ou estrias gordurosas. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.3 Lesões Ateroscleróticas Progressivas

2.4.3.1 Espessamento Intimal Patológico

A fase intermediária da lesão, a lesão III da classificação da AHA, já tem a formação de um pré-ateroma microscopicamente visível,⁶⁷ que também pode ser denominado como espessamento intimal patológico (Figura 17).^{69,76} Nesta fase, a lesão apresenta tipicamente um acúmulo extracelular de lipídios entre as camadas de CML, geralmente no mesmo local onde ocorre o espessamento adaptativo da camada íntima. Estes lipídios se localizam abaixo da camada de macrófagos e das células espumosas.^{67,76} O acúmulo de lipídios é bem delimitado, maciço e as confluências ainda não se desenvolveram, mas este acúmulo de lipídios desarranja a estrutura das CML.⁶⁷ As porções de lipídios não apresentam CML viáveis e podem conter poucas estruturas finas de cristais de colesterol livres derivadas diretamente do LDL plasmático.⁷⁶ Um estudo de imagem recente demonstrou que em lesões precoces (estenose menor do que 30%) há presença da *vasa vasorum*, além de macrófagos.⁸² Em artérias normais, o *vasa vasorum* pode ser encontrado na camada adventícia, exceto em arteríolas, vênulas e artérias intracerebrais.⁶⁵ A atividade nervosa simpática atua no *vasa vasorum*, ajudando a regular o fluxo de sangue. As substâncias que agem na vasoconstrição do vaso, como o tromboxano A₂, norepinefrina e angiotensina II parecem não atuar no *vasa vasorum*, exceto pela endotelina-1 e adenosina que desencadeiam vasoconstrição.⁸³ Dessa forma, o *vasa vasorum* pode fornecer proteção neural contra a isquemia durante a atividade simpática sustentada.⁶⁴

O espessamento intimal patológico pode permanecer estável por um período, permanentemente, ou ainda progredir. Nas lesões iniciais, as mudanças na composição da matriz ou desarranjo da arquitetura da camada íntima são mínimas, ou ausentes. A camada média não está doente e a adventícia não é afetada.⁶⁷

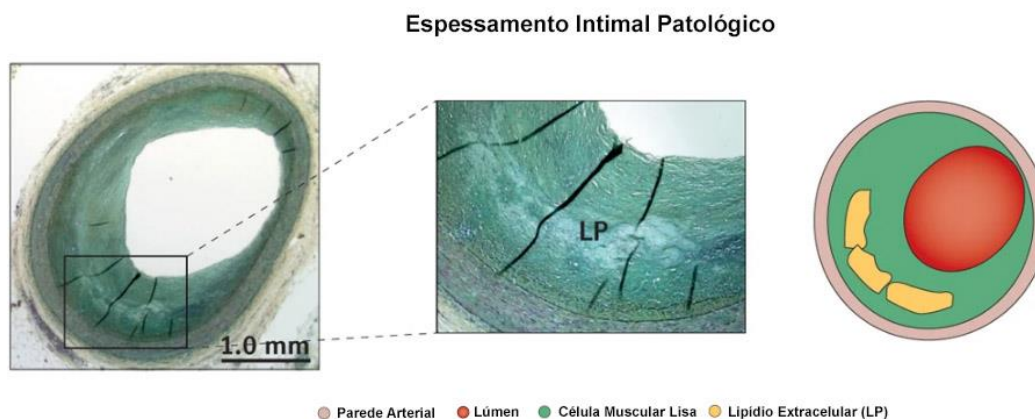


Figura 17. Espessamento Intimal Patológico. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.3.2 Fibroateroma

A primeira lesão a ser classificada como avançada pelos critérios histológicos é a formação do ateroma, que corresponde às lesões IV e V da classificação da *AHA*.⁶⁸ Mas é atualmente denominada apenas como fibroateroma, que pode ser subdividido em **inicial e tardio** conforme o estágio da necrose baseado na extensão da matriz formada por proteoglicanos.⁷⁶ Estas lesões podem ser observadas a partir da terceira década de vida, e apresentam risco potencial de desenvolvimento de trombo e/ou morte súbita.⁶⁹

As lesões de fibroateroma são a primeira lesão avançada devido ao desarranjo que o núcleo lipídico causa na camada íntima, com possível visualização macroscópica. Isto ocorre por meio da confluência das várias porções lipídicas, e acredita-se que o aumento deste núcleo é devido ao afluxo de lipídios através do plasma.^{76,84} Dessa forma, apresentam um núcleo lipídico grande e bem definido, com a inclusão de minérios,^{67,68} gerado pela calcificação de organelas e de algumas CML.^{68,69}

As lesões com **fibroateromas iniciais** (Figura 18) são uma transição das porções de acúmulo de lipídios para necrose.⁷⁶ A necrose se desenvolve porque as células espumosas deste núcleo lipídico sofrem apoptose^{76,84} e o lipídio contido nelas se torna um núcleo necrótico,^{78,84}

que possui uma textura macia capaz de desestabilizar a placa. Este núcleo não apresenta vascularização,⁸⁴ há aumento de cristais de colesterol,^{76,78} apresenta baixa densidade de células, não apresenta colágeno para sustentar a placa e com isso leva ao desarranjo da matriz extracelular.⁷⁶

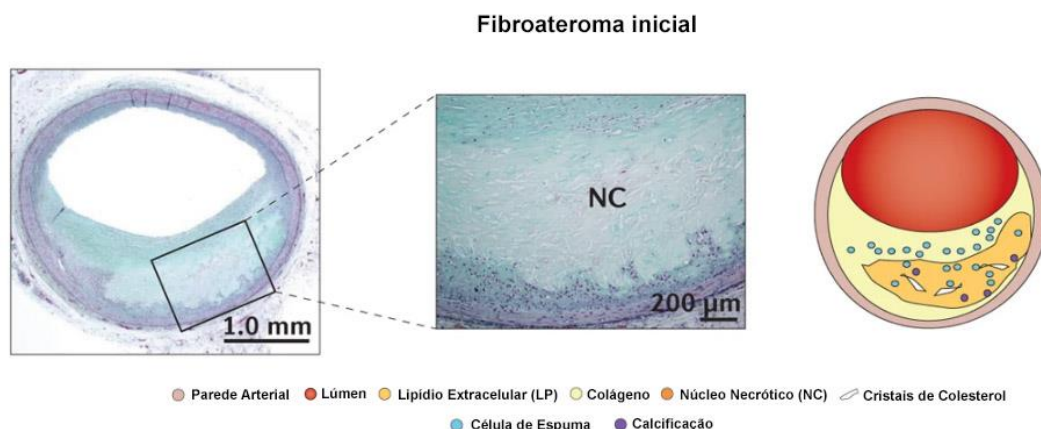


Figura 18. Fibroateroma Inicial. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

As lesões de **fibroateromas tardias** (Figura 19) apresentam: pouca matriz extracelular⁷² com aumento de tecido conjuntivo fibroso, colágeno e de CML.⁶⁸ Essas lesões têm maior número de fissuras de colesterol, pouca ou esparsa calcificação,⁷² e angiogênese em volta do núcleo necrótico, que se torna 35% menor em área.^{68,69,71,72} Os macrófagos e linfócitos, que aumentam nesta fase,⁷² podem estar associados aos capilares e algumas micro-hemorragias (hemorragia intraplaca) podem ocorrer em volta destes capilares e do conteúdo lipídico^{68,69,71} até a superfície subendotelial.⁶⁸ Na periferia do núcleo lipídico, observam-se CML com ou sem inclusões de gotículas de lipídios, e pequenos capilares ao redor podem estar presentes. Entre estas duas regiões há uma camada rica em proteoglicanos, infiltração de células inflamatórias e CML, além da presença de *vasa vasorum*.^{68,69} Na presença de aterosclerose, o *vasa vasorum* pode se estender a partir da camada adventícia, onde são mais abundantes, até a camada média-íntima com a função de promover nutrição.⁶⁵ Entretanto, em alguns casos, podem surgir a partir do lúmen, especialmente quando há trombose ou artérias recanalizadas.⁶⁵ Nas artérias coronárias, o *vasa vasorum* pode se originar a partir de segmentos bifurcados dos vasos epicárdicos, e sua presença está associada com hipóxia, inflamação e ativação do receptor tipo *toll-like*. São frequentes

quando a camada íntima tem uma espessura de 500 μm ,⁶⁴ mas, recentemente, foram encontrados em lesões com menor espessura.⁸² Além disso, está associado com a presença de infiltrados inflamatórios na placa aterosclerótica e núcleo lipídico.⁶⁴

Lesões neste grau não apresentam estreitamento luminal importante.⁶⁸ Estas lesões causam espessamento da parede arterial, mas não obstruem o lúmen, devido ao remodelamento positivo.⁶⁰ O estreitamento luminal pode ocorrer mais nas lesões avançadas depois que a capacidade de compensar com o remodelamento vascular se esgota, o que ocorre quando a área da lesão ocupa cerca de 40% da área da LLEI.⁷⁵

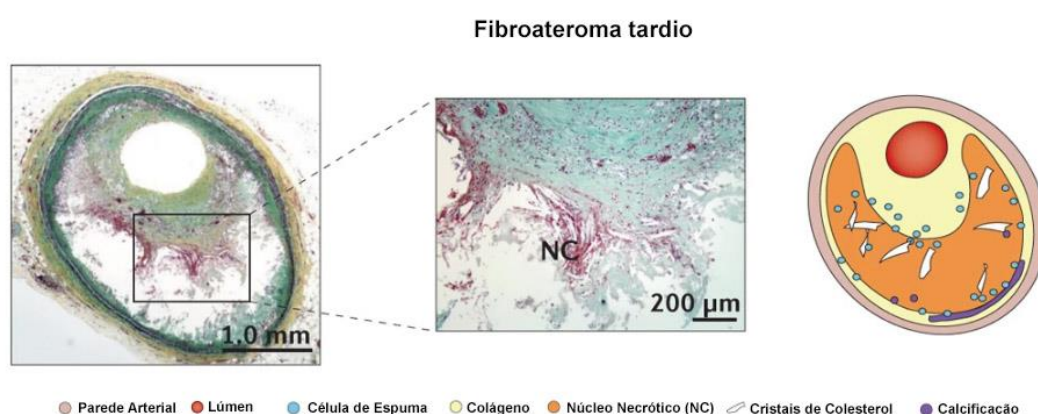


Figura 19. Fibroateroma tardio. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

O núcleo necrótico é recoberto por uma capa fibrosa fina^{69,71} formada por CML em uma matriz com colágeno tipo I e III e proteoglicanos entre as CML, com infiltração variável de macrófagos e linfócitos.^{69,71,76} A capa fibrosa fina, espessura $<65 \mu\text{m}$, é considerada como uma placa vulnerável com grandes chances de se romper^{69,72} devido à sua fragilidade para rompimento. A média da espessura da capa em placas rotas foi de $23 \pm 19 \mu\text{m}$, sendo que 95% das capas mensuradas têm menos de 64 μm . A capa fina diferencia-se do início da sua formação pela escassa presença de colágeno e de CML espaçadas e isoladas,^{68,69} (que parecem ter um papel importante na estabilização da placa de aterosclerose)⁷² matriz extracelular e infiltração de células inflamatórias.⁶⁹ Embora os defeitos de superfície não estejam presentes, esta lesão apresenta uma grande importância clínica, pois é propensa à formação de fissuras que podem desestabilizar a placa aterosclerótica.

As microcalcificações dos fibroateromas têm tamanho entre $\geq 0,5 \mu\text{m}$ à $\leq 15 \mu\text{m}$, e geralmente envolvem o núcleo, ao redor da matriz de colágeno. Estas microcalcificações podem avançar nas próximas fases das lesões, formando pequenas porções de calcificação, que posteriormente, podem formar nódulos de calcificação acompanhado de deposição de fibrina, que resultam em protusão do lúmen.⁷⁵ As microcalcificações, encontradas nesta fase, são prejudiciais à placa de ateroma e podem predizer a ruptura da mesma.⁷⁵

A presença destas alterações desorganiza e deforma a camada íntima, além da camada média subjacente e adventícia, e conseqüentemente leva à deformidade arterial, que predispõe a eventos isquêmicos.^{67,68}

Tabela 4. Comparação entre os componentes da placa aterosclerótica de fibroateroma inicial e tardio.

| Componentes da Placa de Aterosclerose | Fibroateromas Iniciais | Fibroateromas tardios |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| Angiogênese | X | ↑ |
| Densidade de células inflamatórias | ↓ | ↑ |
| Colágeno | ↓ | ↑ |
| Cristais de Colesterol | ↓ | ↑ |
| Chance de hemorragia | ↓ | ↑ |

X: ausência; ↑: aumento; ↓: diminuição

2.4.4 Placas Vulneráveis: Fibroateroma de Capa Fina

As placas ateroscleróticas vulneráveis se caracterizam por poderem potencialmente se romper (Figura 20).^{66,76} As características determinantes para a ruptura são o tamanho do núcleo necrótico rico em lipídio recoberto por uma capa fibrosa fina infiltrada por macrófagos. Outras características também são apontadas, como: placa de grande tamanho, remodelamento positivo que atenua a obstrução do lúmen, neovascularização, hemorragia de placa, inflamação na camada adventícia e pontos de calcificação e densidade de macrófagos na capa fibrosa.⁶⁶

Entretanto, o termo de placas vulneráveis associadas à capa fibrosa fina têm sido debatido, pois estudos recentes em humanos vivos têm mostrado que placas com esta característica não tem sido associadas com trombose aguda.¹²

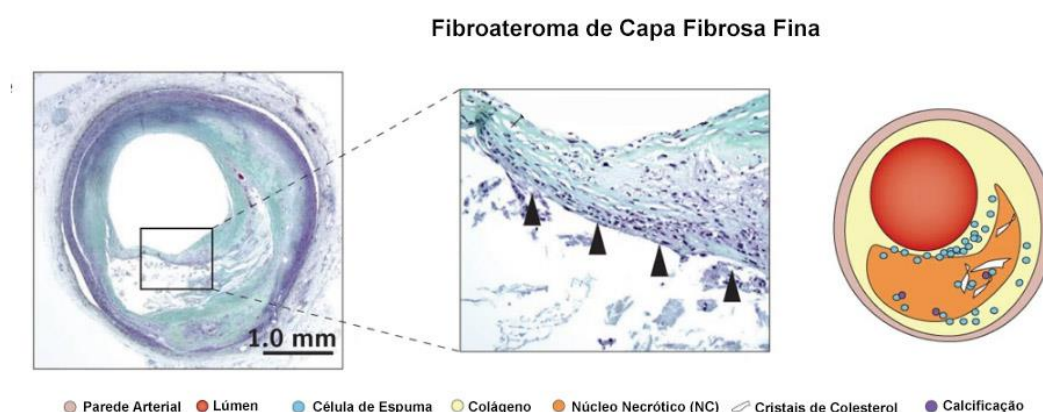


Figura 20. Fibroateroma de capa fibrosa fina. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.5 Lesões Instáveis

As lesões instáveis podem ocorrer a partir de três processos: ruptura, erosão e nódulo calcificado.^{69,73} Apresentam defeitos de superfície do endotélio, hematoma, hemorragia e/ou depósitos trombóticos e são classificadas como lesões VI da *AHA*.⁶⁸ Essas lesões podem se expressar clinicamente como SCA.⁷⁴ Morfologicamente, a parte interna da lesão pode apresentar características de lesões tipo IV ou V (fibroateroma),⁶⁸ das quais 83% apresentam espessura de capa fibrosa fina que culminaram em ruptura.⁸⁵

2.4.5.1 Erosão

As erosões representam aproximadamente 40% dos casos de trombose em artérias coronárias seguida de morte súbita. Estas lesões são mais frequentes em mulheres e homens jovens (idade inferior a 50 anos) e está associado ao tabagismo, principalmente em mulheres que estão em processo de pré-menopausa.⁶⁹ A lesão por erosão é determinada quando não há evidência de ruptura no segmento que apresenta o trombo,⁷³ após os cortes transversais da artéria (Figura

21).⁷³ Geralmente, o endotélio está ausente no local desta lesão e a camada íntima interrompida revela um baixo grau de inflamação,⁶⁹ mas há controversas.⁶⁶

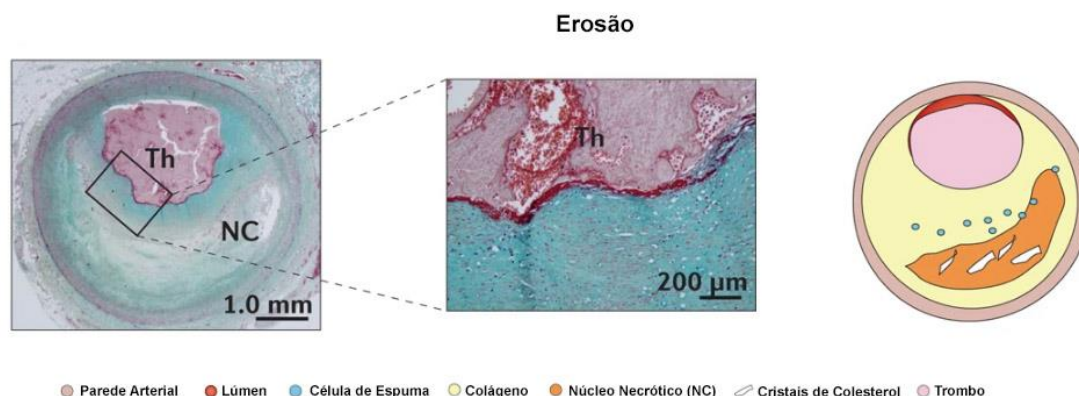


Figura 21. Fibroateroma com trombo adjacente sugerindo lesão instável por erosão. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.5.2 Hemorragia de Placa

Hemorragia na placa de aterosclerose pode ocorrer tanto em placas com capa fibrosa fina, quanto capas fibrosas espessas,⁷² e sua presença contribui para o aumento do núcleo necrótico. Alguns autores sugerem que as hemorragias intraplaca ocorrem devido à ruptura de *vasa vasorum*^{65,73} ou de fissuras na placa de ateroma. As fissuras podem ocorrer nas regiões mais frágeis, como os ombros da placa de ateroma, onde a espessura da capa fibrosa costuma ser menor, e com isso permite que haja a entrada de sangue para o núcleo necrótico.⁷³ Estas lesões são frequentes em lesões avançadas com ruptura de placa ou trombose luminal, e na série de casos apresentado por Virmani e colaboradores, foi frequente em lesões que apresentaram entre 40% a 50% de estreitamento do lúmen.⁷³ Estas lesões são precursoras (lesões estáveis) ou subtipos de rupturas de placa de aterosclerose (lesões instáveis) (Figura 22).⁷³ Dessa forma, ainda há um debate na literatura quanto a ser considerada estável ou instável.

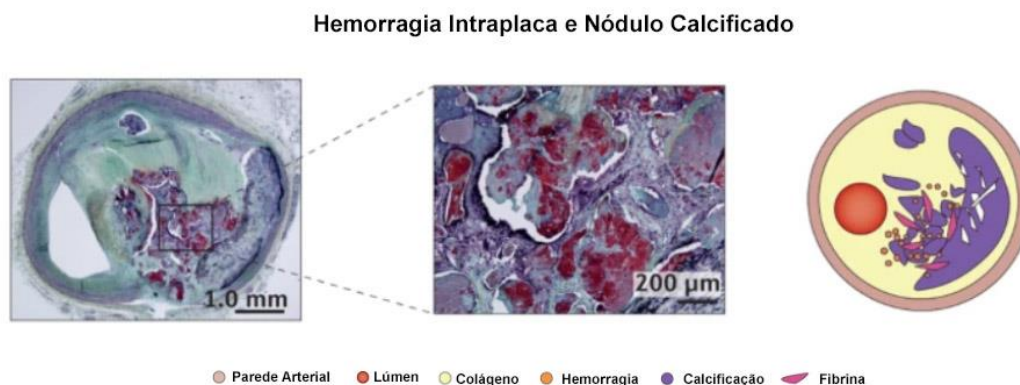


Figura 22. Hemorragia intraplaca em placa aterosclerótica com nódulo calcificado. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.5.3 Ruptura

A ruptura da placa de aterosclerose pode ser encontrada em 60% das mortes súbitas e são mais frequentes em homens com idade menor que 50 anos e em mulheres a partir de 50 anos.⁶⁹ Pesquisas mundiais apontam que a ruptura da capa fibrosa é a principal causa de trombose coronariana independentemente da manifestação clínica,⁶⁶ não somente entre aqueles que falecem por isto, mas também entre quem sobrevive a esta ruptura e conseqüentemente à trombose.⁸⁵ Nestes casos, é uma das causas para uma progressão grave e assintomática da placa de ateroma⁶⁶ (lesões cicatrizadas da classificação proposta por Yahagi e colaboradores).⁷⁶ Em lesões com ruptura, há um trombo na luz do vaso com um núcleo necrótico encapsulado com uma capa fibrosa fina com infiltração de macrófagos e de linfócitos T. Há uma interrupção da capa fibrosa que permite uma comunicação direta entre o trombo no lúmen e o núcleo necrótico (Figura 23),^{69,73} resultando em hemorragia para dentro da placa e o trombo no lúmen originado pela fissura.⁶⁶ Alguns autores definem esta área de lesão como fissura, entretanto, os termos são análogos.⁶⁶ Na área de ruptura na capa fibrosa, as CML e a matriz extracelular podem estar escassas.⁷³ Além disso, no sítio de ruptura foram encontrados muitos macrófagos em processo de apoptose, que facilitam o processo de trombose na placa de aterosclerose.⁷² Podemos encontrar a presença de *vasa vasorum*, mas são mais abundantes nas rupturas da placa que ocorrem durante o exercício do que as rupturas que ocorrem em repouso.⁷²

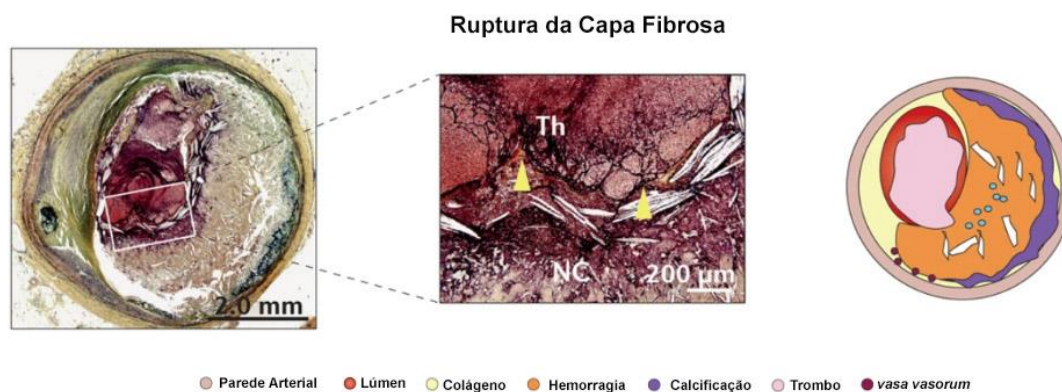


Figura 23. Ruptura da capa fibrosa. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.5.4 Nódulo Calcificado

O nódulo calcificado tem pouco efeito na desestabilização da placa, mas está associado com cicatrização da placa aterosclerótica que sofreu ruptura em processos anteriores em 65% dos casos.^{72,73} Embora muito infrequente, podem ocorrer ruptura da capa fibrosa com presença de trombo em lesões com nódulos eruptivos, densos e calcificados. Geralmente ocorrem mais na artéria coronária direita na porção medial onde ocorre a torção máxima desta artéria⁶⁹ que estão muito calcificadas em indivíduos idosos (Figura 24).⁶⁶ A origem dessa lesão não é precisamente conhecida, mas parece estar associada às placas cicatrizadas. Entretanto, não devem ser confundidos com lesões das quais há predominância de lesão fibrocalcificadas⁶⁹ (lesões VII da classificação da *AHA*).^{68,70} Muitas vezes, mais de um processo na mesma placa aterosclerótica pode ser identificado.⁶⁹



Figura 24. Nódulo Calcificado com Ruptura da Capa Fibrosa. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.6 Lesões estáveis

Conforme a nova classificação, são consideradas lesões estáveis as: lesões fibróticas, as fibrocalcificadas e a calcificação nodular sem trombose. Estas lesões são frequentemente observadas em pacientes com DAC crônica, diabetes mellitus e insuficiência renal crônica.⁷⁶

2.4.6.1 Lesões Cicatrizadas

As placas ateroscleróticas cicatrizadas são caracterizadas por um aumento súbito da área da placa por recorrentes e silenciosos processos de trombose.⁷⁶ Estas lesões são responsáveis pelo aumento da carga da placa (*“plaque burden”*), estreitamento do lúmen, e um possível remodelamento negativo com ou sem oclusão total do lúmen de modo crônico, que pode ser silencioso ou não. Microscopicamente, estas lesões apresentam uma quebra ou descontinuação de uma capa fibrosa fina com uma reação de reparo subjacente (Figura 25), contendo CML, proteoglicanos e vários tipos de colágenos (que dependerá do tempo em que a ruptura ocorreu). Os trombos não oclusivos evoluem para um tecido de granulação e infiltração de CML com deposição de colágeno e proteoglicanos, que quando cicatrizado, evolui para um tecido fibrótico (Figura 26).⁷⁶



Figura 25. Placa de aterosclerose com lesões cicatrizadas. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

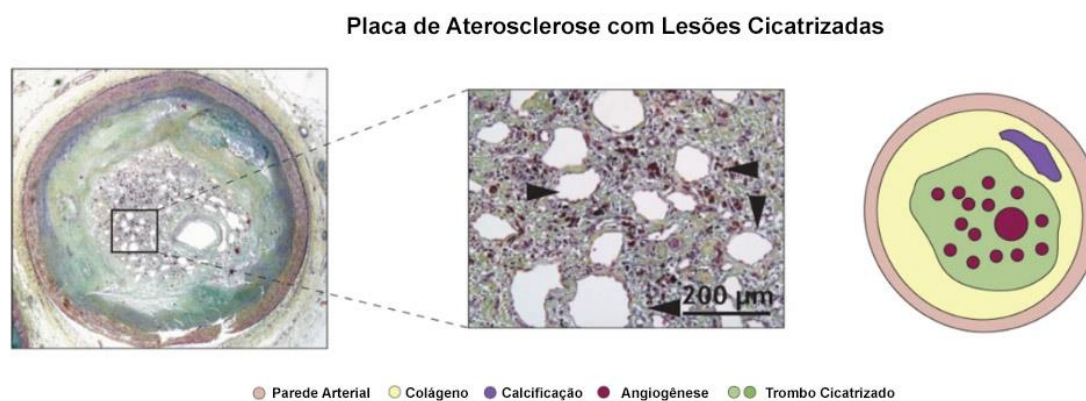


Figura 26. Placa de aterosclerose com trombo em processo de cicatrização. Fonte: Adaptado e traduzido de Yahagi e colaboradores (2016).⁷⁶

2.4.6.2 Fibrose

Já as lesões classificadas como VIII pela AHA, são lesões predominantemente constituídas por conteúdo fibroso que substitui a camada íntima normal e até mesmo o conteúdo lipídico, que pode ser escasso neste nível de lesão. As CML estão desarranjadas e diminuídas. As camadas média e adventícia podem conter macrófagos, linfócitos e até células espumosas.⁶⁸ Esta

lesão pode ser a resolução de um ou mais processos, incluindo a organização de trombos, a extensão do componente fibroso de um fibroateroma adjacente, ou a reabsorção dos núcleos lipídicos.⁶⁸

2.4.6.3 Fibrocalcificada ou Calcificação nodular com ausência de trombose

As lesões VII da classificação da AHA, anteriormente denominadas como Vb,⁷⁰ apresentam uma grande quantidade de cálcio com aumento do tecido conjuntivo fibroso. Esta calcificação é decorrente de depósitos minerais que substituem os macrófagos e CML em apoptose, e lipídio extracelular, incluindo núcleos inteiros.^{68,75}

2.5 Aterosclerose e Sistema Imune Inato

As respostas imunes inata e adaptativa fazem parte de um sistema integrado de defesa, no qual muitas células e moléculas trabalham mutuamente cooperando entre si. A resposta inata ativa e aumenta a resposta imune adaptativa, e esta por sua vez, frequentemente aumenta a resposta da imunidade inata.⁸⁶

O sistema imune tem sido amplamente estudado no contexto da aterosclerose. Já era apontado que o sistema imune era um importante mecanismo que induzia o desenvolvimento da aterosclerose e que a inflamação poderia ser um fator de risco cardiovascular clássico, tais como síndrome metabólica e diabetes.²²

Desde a década de 90, sabe-se que a aterosclerose não é um mero acúmulo de lipídios⁶ e atualmente é considerada uma doença inflamatória.^{12,15} Há vários grupos celulares com uma intensa atividade bioquímica, modulada pelos fatores de risco. Toda esta rede envolve a atividade imune⁹ tanto inata, quanto a adaptativa.⁷⁷ Atualmente, a inflamação tem uma série de vias que ligam o metabolismo dos lipídios e os fatores de risco à aterosclerose.^{9,12} A inflamação realmente contribui para a progressão silenciosa da lesão por décadas, como vimos anteriormente, mas a inflamação regional ou sistêmica pode contribuir para a desestabilização da placa ocasionando

eventos agudos e episódios de aceleração da progressão da aterosclerose. A inflamação na aterosclerose está envolvida com recrutamento e proliferação das células imunes,¹² no qual a camada íntima tem sido o principal foco habitual de investigação⁹ e mais recentemente a camada adventícia.^{29,35,87,88}

2.5.1 Macrófagos polarizados

A imunidade inata tem sido considerada uma resposta específica, porque é importante para a regulação de doenças inflamatórias, trabalhando em parceria com a imunidade adaptativa. É caracterizada por ser um sistema rápido, que em minutos após uma exposição desencadeia uma resposta inflamatória protetora. Além disso, desempenha também um papel central na ativação da resposta imunitária adaptativa subsequente. As principais células são os monócitos, macrófagos, células dendríticas,⁸⁹ granulócitos, *natural killers* e linfócitos B1 (também podem ser considerados como atuantes do sistema imune inato).^{22,90}

Os macrófagos são monócitos em sua forma diferenciada, originados a partir das células progenitoras mielóides e se desenvolvem em monócitos circulantes. Estes monócitos circulantes podem aumentar em número quando estimulados pelos fatores de risco cardiovasculares, dentre eles a hipercolesterolemia. Estes monócitos circulantes penetram a partir do lúmen, se aderem à superfície endotelial das artérias susceptíveis, devido ao estresse hemodinâmico (fluxo não laminar), e entram no espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos.¹³

Os macrófagos são células imunes que apresentam uma alta plasticidade e uma habilidade de promover inflamação em seu fenótipo inflamatório, e são capazes de cessar o processo inflamatório quando ele não é mais necessário e assumir propriedades de reparação tecidual quando assumem o fenótipo anti-inflamatório.^{13,91} Os fenótipos podem ser identificados através dos seus marcadores de superfície e das citocinas que eles secretam.⁹² Estes dois fenótipos são os extremos e reproduzíveis em laboratório, sendo o macrófago com propriedades pró-inflamatórias denominado como M1, ou classicamente ativados, e respondem aos produtos dos linfócitos Th1.

Se diferenciam para este fenótipo quando estimulados por IFN- γ (citocina pró-inflamatória).^{13,78,91,92}

O macrófago M1 pode iniciar e manter um forte processo inflamatório através da produção de citocinas pró-inflamatórias,^{13,92} como IL-1 β ,^{13,92} IL-12^{13,91,92} e TNF- α .^{13,92} Também secretam quimiocinas como MCP-1, ligante 2 de CC quimiocinas (CCL2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) produtora de óxido nítrico,¹³ que após abundantemente secretadas possibilitam que os macrófagos possam produzir espécies reativas de oxigênio^{13,91,92}. Além destas quimiocinas, temos as quimiocinas membro da subfamília CXC (CXCL9, CXCL10 e CXCL5) que têm função de recrutar linfócitos Th1 e células *natural killers*. Estas têm o papel de matar patógenos intracelulares.⁹²

De modo geral, todo este repertório de citocinas e quimiocinas tem o objetivo em comum de promover e propagar a inflamação e destruir os patógenos.¹³ Entretanto, é importante ressaltar que esta ação pró-inflamatória tem benefícios em reações agudas, porque a estimulação contínua e crônica causa dano tecidual e prejudica a cicatrização/reparação tecidual.⁹²

O fenótipo de macrófagos anti-inflamatório é denominado como M2 ou também como alternativamente ativados^{13,91} (análogo aos linfócitos Th2).¹³ Assim como os macrófagos M1, os macrófagos M2 também podem ser diferenciados quando estimulados por interleucinas, que neste caso são IL-4 (grande fator de proliferação de macrófagos M2) e IL-13.^{13,78,91} Os macrófagos M2 apresentam uma alta expressão em sua superfície de receptores *scavenger*, manose (CD206)⁹² e galactose.^{16,91} Uma vez com fenótipo M2, produzem e secretam IL-10, IL-13 e fator de transformação do crescimento β (TGF- β), que também são produzidas por linfócitos Th2 e estão envolvidos com reparação tecidual,^{13,92} e possuem propriedades pró-angiogênicas e pró-fibróticas,⁹² e ainda inibem a atividade de macrófagos M1.¹³ A via de estimulação para a diferenciação dos macrófagos em macrófagos M2 depende de quais interleucinas, fatores ou citocinas estão presentes, e com isso desencadeia uma resposta de acordo com a via que o macrófago foi estimulado. As propriedades dos macrófagos M2 incluem: remodelamento

tecidual, angiogênese, regulação da resposta imune e podem promover a diferenciação de Tregs, que também induzem a ativação da forma alternativa de fagócitos mononucleares.⁹¹

Existem três processos que contribuem de modo independente para a modificação do fenótipo dos macrófagos. O primeiro dentre eles é a presença de ésteres de colesterol e o efluxo de colesterol livre que causa a ativação do fenótipo pró-inflamatório dos macrófagos. O segundo é devido à ativação dos macrófagos, que está estritamente associada ao metabolismo interno da célula, e assim os fatores externos podem induzir o metabolismo pró-inflamatório pelo estímulo à glicólise, ou o metabolismo anti-inflamatório que funciona através do metabolismo por oxidação de ácido graxo^{13,16} (Figura 27). Alguns dos principais fatores que podem induzir o metabolismo de glicólise no macrófago são: mediadores pró-inflamatórios, estados de inflamação sistêmica de baixo grau (diabetes, doença autoimune e síndrome metabólica) e presença de hipóxia nas lesões ateroscleróticas (geralmente ambiente predominante nas lesões e associadas à presença de núcleo necrótico e defeito do sistema de eferocitose dos macrófagos). E o terceiro fator se refere ao perfil inflamatório mais abundante no ambiente em que o macrófago está inserido. Se o ambiente apresenta predominância de um estado pró-inflamatório (CCL2, IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 e TNF- α) induz o fenótipo M1 e se o ambiente tem predominância de fatores anti-inflamatórios (IL-10, TGF- β ,¹³ IL-4 e IL-13^{16,91}) induz o fenótipo M2.¹³

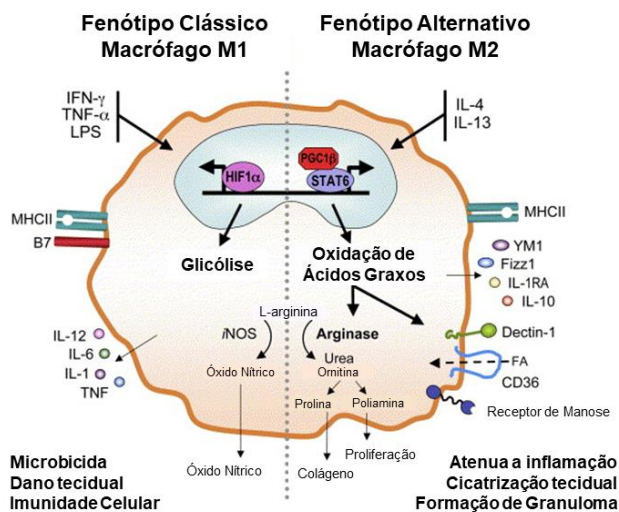


Figura 27. Metabolismo de acordo com o fenótipo dos macrófagos. Fonte: Adaptado e traduzido de Lacy-Hulbert; Moore (2016).¹⁶

Os macrófagos contribuem para a morfologia da placa.¹⁵ Em lesões iniciais os macrófagos sofrem apoptose, ação ateroprotetora devido à remoção dos restos celulares realizado pelos macrófagos vizinhos (eferocitose).¹³ Este é um processo protetor, desencadeado pela IL-10, que elimina as células antes que os danos da membrana levem a um extravasamento de conteúdo celular tóxico. Portanto, é uma resposta anti-inflamatória.¹⁵ Quando a eferocitose é deficiente ou defeituosa, promove o desenvolvimento do núcleo necrótico e conseqüente aumento do tamanho da lesão.^{6,13,77} Este processo defeituoso leva ao aumento de células apoptóticas que não são eficientemente eliminadas, gerando acúmulo de corpos apoptóticos e restos necróticos na lesão, dando origem ao núcleo necrótico na placa aterosclerótica, e a presença deste núcleo contribui para o aumento da inflamação.¹⁵ O mecanismo pelo qual o núcleo lipídico se transforma em núcleo necrótico ainda é incerto, sabe-se apenas que é através da apoptose dos macrófagos.²² Na fase inicial da aterosclerose é possível que a lesão regrida, e o macrófago tem papel fundamental nesse mecanismo através da eferocitose. Entretanto, nas lesões com espessamento intimal patológico, o número de macrófagos é crescente, tanto pelo maior acúmulo, quanto pela proliferação e aumento das células espumosas. As células de espuma secretam citocinas pró-inflamatórias que amplificam a resposta inflamatória local, como por exemplo as espécies reativas de oxigênio.⁶ Quando a proliferação de alguma maneira é barrada, o resultado é a redução do tamanho da lesão.¹³ No núcleo lipídico há o predomínio de macrófagos M1^{78,92} e quando a apoptose aumenta, em resposta ao colesterol livre e aos ácidos graxos, as células têm dificuldade em remover os restos das células que sofreram apoptose. Este processo promove a progressão da lesão, pela formação do núcleo necrótico com característica pró-trombótica e pela inflamação. Como abordado anteriormente, estas características aumentam o risco da evolução para placa instável por desenvolvimento de fissuras ou rupturas.^{13,15} Nestas áreas de ruptura, o perfil inflamatório dos macrófagos mais encontrado é o M1.⁹² Os macrófagos M2 são mais frequentemente localizados longe destes núcleos lipídicos.⁷⁸

Além da contribuição dos macrófagos para a desestabilização da placa pelo aumento da formação do núcleo necrótico, eles podem contribuir para a ruptura através de outro mecanismo que envolve a secreção de metaloproteinases da matriz, que contribui para o afinamento da capa

fibrosa,¹³ principalmente nas regiões denominadas ombros da placa (extremidades da capa fibrosa). Os linfócitos T também se infiltram nesta região.^{22,78} O afinamento causado por estas células torna a placa aterosclerótica mais vulnerável à ruptura, porque ela perde a capacidade de resistir à pressão exercida pela pressão arterial, e com isso inicia-se a formação de fissuras.⁷⁸ Também tem sido reportada a formação de hemorragia intraplaca através da secreção de proteases.¹³ As hemorragias intraplaca contribuem para o aumento do tamanho do núcleo necrótico através do extravasamento de glóbulos vermelhos.²²

Há muitas outras populações de macrófagos sendo descobertos e potencialmente estão presentes nas lesões ateroscleróticas (Figura 28). Entretanto, a placa de aterosclerose tem sido reportada como um ambiente pró-inflamatório pela presença maior de IFN- γ produzido pelos linfócitos Th1^{13,91} e pelos macrófagos M1 produzindo citocinas pró-inflamatórias⁹¹ comparado à IL-4. Contudo, os macrófagos expostos podem rapidamente se diferenciar conforme o estímulo recebido, como por exemplo a presença de lipídios ou estímulos inflamatórios.¹³ As hemorragias intraplaca são outro exemplo, pois podem levar à diferenciação ateroprotetora de macrófagos, possivelmente macrófagos com fenótipo M2,⁹³ porque fagocitam os eritrócitos senescentes, e após a exposição à hemorragia muda seu fenótipo para contra-atacar os danos induzidos pelo ferro oxidado.⁹² O perfil de macrófagos M2 também contribui para a prevenção da formação das células espumosas e auxilia no manuseio do metal ferro nas lesões.⁹² Embora a placa de aterosclerose tenha predomínio do fenótipo M1 de macrófagos, na camada adventícia tem maior predomínio de macrófagos M2, que pode ser uma consequência da transferência a partir do tecido adiposo perivascular.⁹⁴ Nas placas de aterosclerose, as áreas são muito distintas das outras, dependendo dos diferentes estágios de evolução da doença, e, desta forma, o envolvimento do perfil de polarização dos macrófagos podem divergir de acordo com as diferentes áreas.¹³

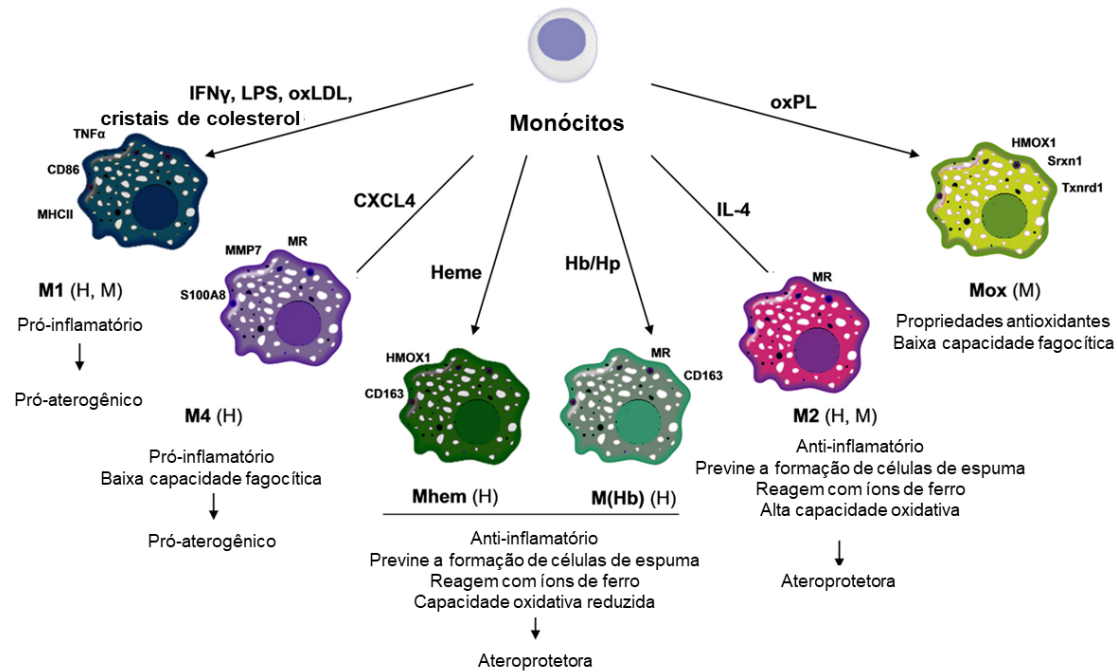


Figura 28. Possíveis diferenciações de fenótipos de macrófagos encontrados em placas ateroscleróticas. Fonte: Adaptado e traduzido de Colin e colaboradores (2014).⁹²

Portanto, ambas formas estão presentes concomitantemente com funções ateroprotetora e aterogênicas¹³ de acordo com o ambiente em que estão inseridos (citocinas, lipídios, ferro e cálcio).^{91,92} É sugerido que ambas formas sejam reguladas como um balanço destes fenótipos de macrófagos, e tanto a patogênese como a progressão da doença aterosclerótica depende diretamente para qual lado pende este balanço entre as funções pró e anti-inflamatórias.⁹¹ Dessa forma, as proporções relativas das subpopulações dos macrófagos são mais informativas quando comparada aos números absolutos, e tem sido sugerido que esta informação é um bom indicador da progressão das lesões e de qual é o perfil do fenótipo inflamatório da placa aterosclerótica.⁹²

2.6 Aterosclerose e o sistema imune adaptativo

A imunidade adaptativa, também denominada adquirida ou específica, orquestra a resposta imune de acordo com o estímulo que recebe quando o antígeno é apresentado (microbiano ou não microbiano), e a cada apresentação do antígeno leva a um aumento em número e potência da resposta inflamatória. Uma das principais características da imunidade adaptativa é a capacidade de especificidade, porque é elaborada a partir de antígenos específicos

e dentre estes, ainda reconhecem partes distintas dos antígenos – denominados epítomos. Os epítomos são diferentes porções de um complexo de proteína, polissacarídeo ou macromoléculas. Os linfócitos distinguem diferenças sutis em epítomos através dos seus receptores de superfície de membrana. A segunda característica é a capacidade de memória, através dos linfócitos B de memória, que permite uma ação mais eficaz na segunda exposição a um determinado antígeno, portanto, produzem anticorpos com maior afinidade comparada à produção da primeira resposta. Os linfócitos T de memória, por sua vez, apresentam resposta mais rápida comparados à resposta das células T *naïve*. A terceira característica é a expansão clonal dos linfócitos após à exposição ao antígeno. A quarta é a especialização, pois para cada microrganismo é elaborada uma resposta diferente. As demais características incluem a homeostasia, que corresponde à recuperação do sistema imune após a resposta elaborada e não atacar o próprio organismo, prevenindo lesões no hospedeiro enquanto a resposta ao antígeno ocorre.⁸⁶

A resposta imune adaptativa pode ser dividida em dois tipos de resposta:

(1) Imunidade humoral através de anticorpos que são moléculas altamente especializadas no sangue e fluidos produzidos e secretados por linfócitos B. Os anticorpos neutralizam e indicam o antígeno a ser eliminado por mecanismos efetores, como por exemplo, induz as células fagocíticas a ingerirem o antígeno e ativa vários mediadores inflamatórios das células;⁸⁶

(2) Imunidade celular pelos linfócitos T, que através da imunidade mediada por célula tem o objetivo de destruir o patógeno que reside nas células fagocíticas ou a morte de células infectadas para eliminar reservatórios de infecção. Além disso, recrutam outras células imunes e auxilia os linfócitos B na produção de anticorpos.⁸⁶

2.6.1 Linfócitos T

Os linfócitos T têm receptores de antígenos em sua superfície de membrana, mas possuem um espectro limitado para reconhecimento de antígenos. Eles reconhecem peptídeos derivados de proteínas estranhas ligadas às proteínas do hospedeiro sendo denominadas moléculas do

complexo maior de histocompatibilidade (MHC)^{22,86} ou antígeno de leucócitos humanos (HLA) de uma célula apresentadora de antígeno.⁹⁵ Os complexos associam-se com os receptores de células T (TCR) para formar um complexo proteico, que permite a transdução de sinal intracelular após o reconhecimento de epítopos, ligados a moléculas do complexo MHC.⁹⁵ Dessa forma, os linfócitos T só reconhecem antígenos processados e apresentados desta forma por uma célula apresentadora de antígeno, e não aos antígenos solúveis. Essas células têm o objetivo de auxiliar os fagócitos a destruir microrganismos ou células infectadas.⁹⁶

Os linfócitos T têm uma série de linhagens específicas, sendo primeiramente divididas entre linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), linfócitos T auxiliares (*T helper*) CD4⁺ e linfócitos T regulatórios (Treg).⁸⁶ Uma vez ativados, é produzida uma ampla gama de respostas, incluindo a proliferação de células, secreção de citocinas e outros mediadores solúveis, e a expressão de moléculas de superfície.⁹⁵

As células T auxiliares possuem a função de secretar citocinas, moléculas responsáveis por muitas respostas celulares tanto da imunidade inata, quanto da adaptativa. De modo geral, as citocinas secretadas pelos linfócitos T estimulam a proliferação, diferenciação das próprias células T, e de outras células imunes da imunidade inata (por exemplo a polarização dos macrófagos) e de linfócitos B.^{22,86} Os linfócitos T citotóxicos eliminam diretamente as células que produzem antígenos estranhos e os linfócitos Treg têm como função principal inibir as respostas imunes.⁸⁶

O início da resposta adaptativa acontece através das células apresentadoras de antígeno, das quais fazem parte as células dendríticas²² e os macrófagos, que são células responsáveis por esta ligação entre sistema imune inato e adaptativo. Elas capturam os antígenos e os transportam até o órgão linfóide mais próximo e apresentam estes antígenos aos linfócitos T *naïve* (linfócitos que ainda não foram apresentados a um antígeno), que dá início a resposta adaptativa. Com a ativação dos linfócitos, é desencadeada uma série de mecanismos que trabalham entre si para eliminar este antígeno. Em relação às células T auxiliares CD4⁺, uma vez ativadas passam a

secretar IL-2 que induz à expansão clonal, e alguns destes clones se diferenciam em células efetoras que podem secretar diversos grupos de citocinas com diversas funções. Algumas migrarão para o local da inflamação e outras ficarão no órgão linfoide secretando citocinas que estimulam os linfócitos B.⁸⁶ Outra parte destas células se diferenciarão em células de memória com uma meia vida muito longa e sua principal função é mediar respostas rápidas e aumentadas (nas infecções secundárias). Ambas células efetoras e de memória estão presentes em vários locais por todo o corpo com muitas diferenciações e fenótipos distintos.⁹⁷

Todos os linfócitos T expressam CD3,⁹⁸ e um dos co-receptores mutuamente exclusivos (CD4: linfócitos T auxiliares ou CD8: linfócitos T citotóxicos).^{95,96} As células T auxiliares CD4⁺ efetoras se dividem em subgrupos por produzirem respostas diferentes devido à secreção distinta de citocinas e também pelo padrão de migração, uma vez que respondem à quimiocinas diferentes em suas defesas. Os subgrupos principais são Th1, Th2 e Th17. Os linfócitos Th1 e Th2 foram os primeiros subgrupos identificados e os linfócitos Th17 é representado assim pelo fato da IL-17 ser a sua assinatura.⁹⁹

No contexto da aterosclerose, a imunidade adaptativa não é essencial para a patogênese, entretanto exerce importante papel, que culmina no direcionamento da progressão da aterosclerose e da inflamação.¹⁰⁰ Na placa de aterosclerose, os linfócitos T auxiliares CD4⁺ correspondem a 10% do total de leucócitos e são recrutados via quimiocina CCR5 (receptor de quimiocina tipo 5) e CXCR6 (receptor de quimiocina C-X-C tipo 6) dentre outros. Apresentam atuação crucial na aterosclerose devido à ampla gama de subtipos, com efeitos pró ou anti-inflamatórios afetando diretamente os tecidos e outras células imunes presentes, auxiliam os linfócitos B pela indução de produção de anticorpos IgG com alta afinidade e também pode apresentar atividade citolítica.¹⁰¹

Os linfócitos T CD4⁺, assim como os macrófagos, também são atraídos para o endotélio e penetram na camada íntima⁷⁸ sob ação da VCAM-1 e das quimiocinas recrutadoras de linfócitos T da família CXC, conhecidas como o trio que induz IFN- γ : quimiocina de proteína-10

(CXCL10/IP-10), monocina induzida por interferon-gama (CXCL9/MIG), e a quimiocina atrativa de célula T alfa induzível por interferon (CXCL11/I-TAC),⁶ sendo que a última apresenta um papel na migração de linfócitos T ativados.²³ Grande parte destes linfócitos T são Th1.^{78,101} Estas quimiocinas se ligam ao receptor de quimiocina CXCR3 expresso pelas células Th1 na lesão aterosclerótica. O linfócito T na camada íntima arterial reconhece antígenos como oxLDL e proteína de resposta ao choque térmico,⁶ expressas em resposta ao estresse celular, ao estresse térmico, ou ao estresse químico de origem endógena ou microbiana.¹⁰² O linfócito T ativado através da ligação entre receptor e antígeno, secreta IFN- γ e TNF que influencia o comportamento de outras células presentes no ateroma.⁶ Os macrófagos ativados através da ligação do CD154 (expressa por células T) com CD40 induzem a expressão do fator tecidual, citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases da matriz.⁶

No ateroma, os linfócitos T são amplamente presentes na placa, representam cerca de 10% de todas as células da placa aterosclerótica em seres humanos, sendo que destas, 70% são CD4⁺ e o restante CD8⁺.⁹⁵ As células *naïve* CD4⁺ se polarizam em muitas linhagens diferentes por diversos estímulos tais como citocinas e antígenos,²² mas dentre estes linfócitos, predominam na placa aterosclerótica os linfócitos Th1^{6,95} (cerca de 17% dentre as células T em placas humanas).²² Os linfócitos Th1 secretam citocinas predominantemente pró-inflamatórias, sendo que IFN- γ é a maior fonte e apresenta uma atividade pró-aterogênica^{6,95} porque desestabiliza a placa através da inibição da proliferação das CML e também por afetar a polarização dos macrófagos, mantendo o fenótipo pró-inflamatório.¹⁰¹

Os linfócitos Th2 também estão presentes na placa aterosclerótica secretando IL-5 e IL-13 e conseguem modular as respostas de eosinófilos e mastócitos.⁹⁵ A depleção destas células em modelos experimentais acelerou a progressão do ateroma, o que sugeria uma atuação predominantemente anti-inflamatória e ateroprotetora. Entretanto, recentemente este papel tem sido debatido, pois a inibição da secreção de IL-4, principal característica destas células, levou ao desenvolvimento de placas menos graves, levando à hipótese de que as células Th2 possam ter

uma atuação pró-aterogênica.⁹⁵ As células Th17 têm sido estudadas recentemente, mas seu papel ainda é menos claro do que a Th1.^{9,103,29} Os linfócitos Th17 produzem IL-17, principal característica destas células. A IL-17 parece diminuir o desenvolvimento da aterosclerose e a subclasse IL-17A tem sido reportada como pró-fibrótica, por aumentar a produção de colágeno e formação da capa fibrosa. Desse modo, é sugerido que os linfócitos Th17 participem na estabilização da placa,⁹⁵ mas sua atuação ainda é incerta, pois parece que a IL-17 também desencadeia uma resposta pró-inflamatória na placa de aterosclerose e o aumento dos níveis séricos de IL-17 no plasma foi associado com presença de SCA.¹⁰⁴

2.6.1.1 Linfócitos Th1

As células Th1 expressam em sua superfície de membrana muitos receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR5,^{99,104} e estes receptores se ligam às quimiocinas produzidas no tecido pelas células imunes inatas. Elas se desenvolvem a partir de linfócitos T CD4⁺ *naïve* (não apresentados a nenhum antígeno) por intermédio das células apresentadoras de antígeno, que secretam citocinas, e de acordo com a citocina secretada a célula *naïve* responderá com uma determinada polarização. Além disso, cada subgrupo de células T diferenciadas produz citocinas que estimulam seu próprio desenvolvimento e inibem o desenvolvimento de outras formas de polarizações, isto é, de outras linhagens.⁹⁹

De modo geral, os linfócitos Th1 estão muito presentes em locais de inflamação/infecção onde há fortes reações imunológicas inatas. Além disso, eles expressam altos níveis de ligantes de E-selectina e P-selectina, que auxiliam a migração destas células para os locais onde há forte inflamação. É o principal subgrupo dos linfócitos T auxiliares CD4⁺ na defesa mediada dos fagócitos sendo considerados como principal mediador da imunidade celular. A diferenciação das células Th1 é induzida pela secreção de citocinas IL-12 e IFN- γ . O IFN- γ tem um papel chave na diferenciação, pois inibe a diferenciação da célula *naïve* voltada para outros subgrupos de Th2 e Th17.⁹⁹

A principal função desta célula é a ativação dos macrófagos e a principal citocina responsável por esta atividade é o IFN- γ . A produção de IFN- γ é aumentada na presença de IL-12 e IL-18.^{21,99} As ações que o IFN- γ pode desencadear são: (1) ativação de macrófagos; (2) pode induzir as respostas dos anticorpos através das mudanças dos isotipos das Ig; (3) induz a diferenciação para Th1 e inibe para os demais subgrupos de células T efectoras; (4) amplifica a resposta dos linfócitos T através do aumento da expressão de moléculas do complexo MHC^{21,99} e (5) inibe a produção de colágeno pelas CML.¹⁰⁵ Embora o IFN- γ seja a assinatura dos linfócitos Th1, também produzem TNF (pró-aterogênica)⁹⁵ e IL-10, que tem um sistema de retroalimentação para suprimir a ativação dos mesmos.⁹⁹

Os linfócitos Th1 são predominantes nas placas de aterosclerose em todos os estágios de progressão das lesões ateroscleróticas⁷⁸ e atraídos para a placa de aterosclerose através das quimiocinas CXCR3 e CCR5.²² A citocina IFN- γ , produzida pelos linfócitos Th1 e pelos macrófagos M1 predomina na placa de ateroma e apresenta uma série de efeitos^{22,78} com atuação predominantemente aterogênica.²¹ Os antígenos oxLDL e LDL induzem a produção de IFN- γ .²² O IFN- γ é reportado como um importante estimulador para a proliferação e polarização de macrófagos e proliferação de células dendríticas.^{21,78} Dessa forma, a atuação pró-aterosclerótica dos linfócitos Th1 é perpetuada com o auxílio destas células da imunidade inata.²¹ O IFN- γ é considerado uma citocina de grande importância devido à capacidade de desestabilização que pode causar na placa de ateroma através da inibição da produção e de maturação de colágeno pelas CML. A não continuidade da manutenção de colágeno junto com a ação das metaloproteinases na placa fibrosa pode levar à ruptura desta estrutura.^{21,78} Além disso, no início da formação da placa, o IFN- γ pode estimular de modo disfuncional as células endoteliais, que passam a recrutar células imunes pró-inflamatórias. E ainda pode desregular o efluxo de colesterol para os macrófagos, e com isso há deposição de lipídio intracelular que dará origem às células espumosas.²²

2.6.1.2 Linfócitos T Reguladores

Os linfócitos Tregs são subdivididos inicialmente em dois subtipos, dos quais ambos têm atuação ateroprotera²¹ através de suas propriedades inibitórias.²² Estes linfócitos são caracterizados por possuírem uma proteína formada por genes da família *forkhead box P3* (FoxP3) de reguladores transcricionais.^{21,78} Em relação aos linfócitos Tregs, o FoxP3 é principal regulador dos processos biológicos da célula, inclusive às suas linhagens e diferenciação celular.¹⁰⁶ A alta presença deste regulador confere à célula a sua capacidade supressora, e a baixa expressão faz com que a célula perca esta habilidade. Deste modo, a expressão desta célula sozinha não é capaz de identificar os linfócitos Tregs.¹⁰⁶

Os linfócitos Tregs naturais são caracterizados pela presença dos marcadores CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Estes são desenvolvidos no timo e podem reconhecer antígenos próprios com objetivo de manter a tolerância imunológica.²¹ Já os linfócitos Tregs induzidos são desenvolvidos na periferia durante uma resposta imune, onde as células *naïve* efetoras CD4⁺CD25⁻ são diferenciadas para CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ pela presença da IL-10 e TGF-β.^{21,22} Em relação às linhagens, os linfócitos Tregs também apresentam dentro do seu desenvolvimento a sua fase *naïve*, em que expressam CD45RA⁺CD25⁺FoxP3⁺. Nesta fase, apresentam uma capacidade supressiva moderada e são muito frequentes em cordões umbilicais e sangue periférico.^{106,107} A outra linhagem, mutualmente exclusiva à anterior, são as Tregs efetoras CD45RO⁺CD25⁺FoxP3^{high}. A alta expressão de FoxP3 (FoxP3^{high}) tem alta capacidade supressiva e perde-se esta capacidade na baixa expressão de FoxP3 (FoxP3^{low}).^{106,107}

Tem sido abordado nos últimos anos a possibilidade de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ apresentarem polarização regulatória também (CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺),¹⁰⁸ como há nos linfócitos T CD4⁺ efetoras.⁷⁸ Embora seja um subtipo de linfócitos Tregs menos comum, é reportado que tem uma provável atuação ateroprotetora devido à sua atuação em causar efeitos deletérios em centros germinativos⁹⁵ e também é sugerido seu papel no controle de vias pró-aterogênicas.⁷⁸

Na aterosclerose, o número de linfócitos Treg na placa de ateroma é variável,⁷⁸ de 1 a 5% dentre todas as células T,²² mas essas células estão presentes em todos os estágios da progressão da placa de aterosclerose. Dessa forma, os linfócitos Tregs parecem ter uma atuação ateroprotetora pois sua presença atenua a aterosclerose e sua depleção acelera a aterogênese. O mecanismo da ateroproteção exercida pelos linfócitos Treg ainda não está elucidado.⁷⁸

Estas células apresentam uma importante atuação no controle de células T. A sua principal interleucina de assinatura é IL-10, associada à prevenção da progressão da aterosclerose⁷⁸ por inibir a atividade das metaloproteinases da matriz e induzir as células fagocitárias humanas a produzir inibidores teciduais de metaloproteinases.²¹ Além disso, a IL-10 diminui a diferenciação dos linfócitos T para Th1 e também inibe o recrutamento e secreção de citocinas por outros linfócitos T e macrófagos.¹⁰⁹ Os linfócitos Tregs também são associados à citocina TGF- β , que possui uma atuação complexa. Os estudos têm apontado uma atuação voltada para a estabilização da progressão da placa de aterosclerose pela estimulação da produção de colágeno.^{21,22,101} Ambas IL-10 e TGF- β também atuam inativando ou deletando os efeitos de citocinas pró-inflamatórias. Os linfócitos Tregs, além de contribuírem para a supressão dos linfócitos T, também suprime as células dendríticas e inibe a polarização dos macrófagos (atuando no receptor *toll-like 2*), auxiliando-os a assumir o perfil anti-inflamatório M2.²²

Os estudos experimentais com aterosclerose demonstram uma atuação ateroprotetora,^{22,95} embora o balanço entre as células imunes seja crucial para o desenvolvimento da aterosclerose.⁹⁵

2.7 Doença arterial coronariana e tecido adiposo

A obesidade está associada com disfunção do tecido adiposo³¹ e com a inflamação sistêmica.^{32,110} A população de macrófagos, que normalmente corresponde de 5 a 10% de todas as células presentes no tecido adiposo, em condições de obesidade aumenta para até 60%.¹¹⁰

A obesidade é considerada um problema de saúde pública no mundo todo e pode ser definida como um acúmulo de excessivo de tecido adiposo no corpo.³² Segundo a OMS, em 2016,

a prevalência de indivíduos, de ambos os sexos, com idade maior ou igual a 18 anos, em condição de sobrepeso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$) no Brasil foi de 56,5% com IC de 95% que variou entre 52,3 a 60,7%, sendo a segunda maior prevalência mundial. A prevalência de obesidade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) foi de 22,1% com IC de 95% que variou entre 18,7 a 25,7%. Além disso, a prevalência de obesidade em crianças e adolescentes foi de 10,8% com IC de 95% que variou entre 7,0 a 15,4%.¹¹¹

O IMC é considerado um marcador de obesidade e foi demonstrado como um indicador associado com inflamação sistêmica em indivíduos saudáveis.¹¹² Desde a década de 80, a obesidade é conhecida como um fator de risco independente para doenças cardiovasculares, principalmente em mulheres. No estudo de coorte *Framingham Heart Study*, foi investigado a incidência de DAC ao longo de 26 anos. O peso corpóreo foi associado com óbito por DAC e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) em homens, independentemente da idade, colesterol, pressão arterial sistólica, tabagismo, hipertrofia ventricular esquerda e a intolerância à glicose. Em mulheres também foi encontrada associação positiva e de modo independente para DAC, AVC, ICC e morte por DAC e DCV em geral.¹¹³

2.7.1 Tecido Adiposo

Fisiologicamente, o tecido adiposo apresenta muitas funções metabólicas e imunes, podendo ser classificado entre tecido adiposo branco ou marrom.¹¹⁴ O tecido adiposo marrom em humanos diminui com o envelhecimento e apresenta distribuição estratégica no corpo para fornecimento de energia para os órgãos vitais. Além disso, tem como função dissipar energia através de produção de calor. Morfologicamente, seus adipócitos são multiloculares com vacúolos e tem um grande número de mitocôndrias.¹¹⁵

O tecido adiposo branco apresenta a função de proporcionar isolamento térmico,¹¹⁰ proteger outros órgãos de danos mecânicos,^{32,110} e estocar energia em forma de triglicérides. Além disso, libera de ácidos graxos livres para a circulação para oxidação ou armazenamento por outros tipos celulares, conforme o estímulo hormonal, sendo um importante regulador da liberação ou

armazenamento de gordura. O tecido adiposo secreta adipocinas que regulam a homeostase metabólica, agindo em órgãos distantes, tais como o cérebro, rim, fígado, pâncreas e músculo esquelético.³² A abundância de tecido adiposo branco está associada com distúrbios relacionados à obesidade, e esta quantidade aumenta conforme a idade, proporcionalmente ao peso total do corpo.¹¹⁵ Os principais depósitos de tecido adiposo branco são o visceral, que corresponde à 10% do total de tecido adiposo corporal com o omento; subcutâneo, que corresponde à aproximadamente 85%; e os tecidos adiposos que revestem os órgãos como o coração, rins e gânglios linfáticos.¹¹⁴

O tecido adiposo branco é constituído por adipócitos com formato de gotículas únicas de gordura (unilocular) e por células estromais vasculares, incluindo células fibroblásticas do tecido conjuntivo e pré-adipócitos (precursoras dos adipócitos não preenchidas com lipídios). As células estromais vasculares contribuem para a integridade estrutural e constituem cerca de 50% do seu conteúdo celular total. Além disso, o tecido adiposo branco apresenta uma quantidade variável de mitocôndrias,¹¹⁵ macrófagos, linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e Treg, *natural killer*, linfócitos B, mastócitos e eosinófilos.^{31,110,114,116}

O tecido adiposo branco saudável é considerado como um órgão endócrino que secreta adipocinas que possuem funções diversas e influenciam em várias funções fisiológicas como metabolismo de nutrientes, sinalização de saciedade, angiogênese e atua diretamente no sistema cardiovascular.¹¹⁴ As principais adipocinas são:

- (1) A adiponectina, que tem a função de sensibilizar a insulina em tecidos periféricos, aumentar a oxidação de ácidos graxos, inibir a gliconeogênese e aumentar a absorção de glicose nos adipócitos.³¹ Os níveis de adiponectina são inversamente proporcionais à resistência insulínica, obesidade,^{31,32} diabetes³¹ e ao IMC.¹¹⁰ A diminuição dos níveis de adiponectina ocasiona perda do sinal anti-inflamatório, contribuindo para o desenvolvimento de inflamação na obesidade.³² Níveis elevados de

adiponectina estão presentes em doenças inflamatórias e autoimunes crônicas.¹¹⁰ A adiponectina apresenta efeitos ateroprotetores por modular a resposta inflamatória do endotélio através da inibição da expressão de moléculas de adesão de células endoteliais e adesão de monócitos ao endotélio vascular. Além disso, inibe a formação de células de espuma por suprimir a expressão de receptores *scavenger* e reduz a proliferação de CML.¹¹⁰

- (2) A leptina, que tem função de aumentar da saciedade e aumentar a oxidação de gordura em muitos tecidos periféricos. Embora a obesidade esteja associada com aumento de seus níveis, é observado uma resistência à ação da leptina.³¹ Apresenta efeito ateroprotetor através da diminuição do acúmulo de lipídios e da diminuição da lipotoxicidade por induzir a apoptose de ácidos graxos. Apresenta também efeito pró-aterogênico por induzir a disfunção endotelial, estimular a inflamação, gerar estresse oxidativo, aumentar a agregação plaquetária, e estimular a hipertrofia e a proliferação das CML.¹¹⁰
- (3) A apelina, que atua na estimulação da contratilidade cardíaca, promove a vasodilatação e mostrou-se redutora de pressão arterial em ratos. Entretanto, o aumento dos níveis de apelina associou-se com a obesidade.¹¹⁰
- (4) A visfatina, que atua na redução da apoptose de CML e de células endoteliais humanas, mas o aumento da sua expressão está associado com a presença de placas instáveis nas artérias carótidas e aterosclerose em artérias coronárias.¹¹⁰
- (5) A resistina, que está associada com doenças cardiovasculares, obesidade e resistência insulínica.¹¹⁰
- (6) A chemerin, que está relacionada com as citocinas pró-inflamatórias, proteína C reativa, IL-6 e TNF.¹¹⁰

O tecido adiposo branco pode ser considerado atualmente como um órgão imune¹¹⁴ por sua participação na resposta inflamatória.³¹ Através de uma complexa rede, as células imunes presentes no tecido adiposo branco contribuem para as funções do tecido adiposo como o armazenamento de triglicérides para reserva de energia e homeostase da glicose. Entretanto, na obesidade, os adipócitos se hipertrofiam e não armazenam energia de forma eficiente e as células imunes se desregulam, podendo assumir um fenótipo pró-inflamatório com efeitos deletérios para o organismo. A hipertrofia dos adipócitos e a rarefação dos vasos sanguíneos levam à hipóxia e estresse oxidativo. Este processo induz a morte celular dos adipócitos e eleva a produção de mediadores inflamatórios derivados do adipócito como a leptina, resistina e outros como MCP-1. A produção destes mediadores inflamatórios induz o recrutamento, proliferação e ativação de macrófagos. Os macrófagos sofrem plasticidade para fenótipo pró-inflamatório (M1), há o aumento de linfócitos Th1, e linfócitos citotóxicos CD8⁺.^{32,114,117} Estes macrófagos fagocitam os adipócitos em processo de morte ou mortos, formando uma estrutura de coroa (*crown-like structures* - *CLS*) constituída por adipócito cercado de macrófagos e outras células imunes. Esta estrutura de CLS parece ser um processo adaptativo para eliminar os detritos celulares ou para limitar a liberação de lipídios tóxicos quando os adipócitos sofrem morte celular por meio de fagocitose.³² Entretanto, esse processo pode ser maléfico pois as citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos M1 levam à resistência à insulina. Em resposta, os macrófagos anti-inflamatórios M2 são ativados e aumentam a secreção de citocinas anti-inflamatórias e IL-10 para proteger os adipócitos dos riscos de um processo inflamatório exacerbado (Figura 29).¹¹⁶ O número de macrófagos e a plasticidade dos macrófagos de M1 para M2 são afetados pela perda de peso.⁵²

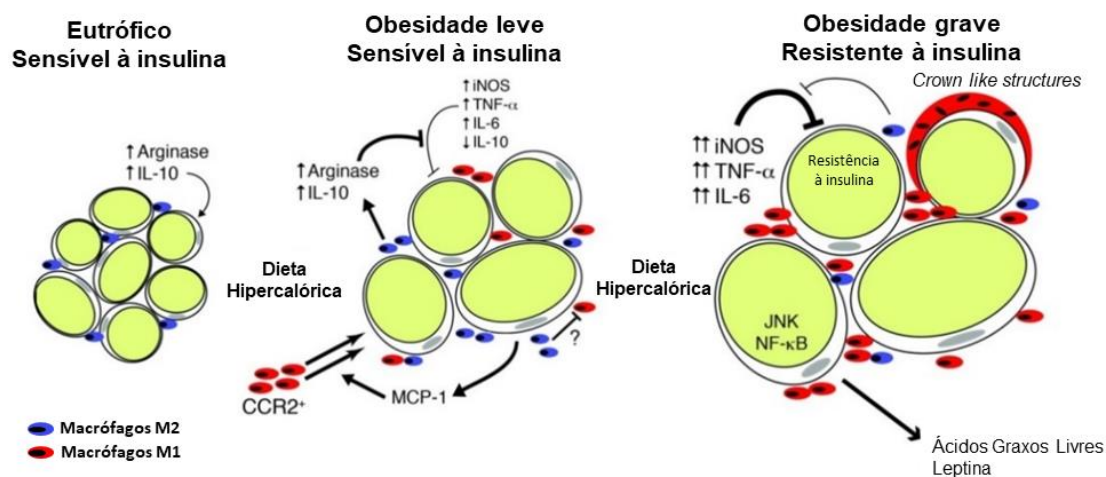


Figura 29. Processo inflamatório induzido pela obesidade. IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; JNK: c-Jun N-terminal cinase. Fonte: Adaptado e traduzido de Lumeng e colaboradores.¹¹⁶

Os linfócitos T e B no tecido adiposo subcutâneo podem participar dessa estrutura CLS em indivíduos com obesidade mórbida (IMC médio de 46kg/m²).¹¹⁸ Entretanto, estudo em modelo animal de obesidade induzida por dieta hipercalórica mostrou que as células T do tecido adiposo perdem a sua capacidade inflamatória de responder ao estímulo do receptor de células T (TCR), perdem a capacidade de expressar o marcador de superfície CD25⁺ e perdem a capacidade de secretar IFN- γ e IL-2 devido a uma exaustão do linfócito T, no qual os autores sugerem que pode ser uma resposta na tentativa de diminuir o estado inflamatório crônico e de baixo grau. O mesmo ocorreu com os linfócitos T em tecido adiposo humano de pacientes, com ou sem diabetes, submetidos à cirurgia bariátrica.¹¹⁹

2.7.2 Tecido adiposo epicárdico

O tecido adiposo epicárdico (TAE) é o tecido adiposo visceral torácico adjacente ao coração.^{120,121} Compartilha a mesma origem embrionária do tecido adiposo omental e mesentérico. Anatomicamente em adultos, o TAE está concentrado no espaço atrioventricular e interventricular e acompanha o trajeto das artérias coronárias, tendo sua irrigação realizada pelas mesmas.^{120,121} É classificado como um tecido adiposo branco, portanto, pode secretar adipocinas

como um órgão endócrino, armazenar lipídios e atuar como um tecido inflamatório. A função do TAE é de capturar e armazenar ácidos graxos livres interventriculares para proteger os cardiomiócitos da exposição de concentrações excessivas de ácidos graxos livres das artérias coronárias durante o aumento energético. Alternativamente libera ácidos graxos livres como fonte de ATP imediato para o miocárdio quando necessário.¹²⁰

O TAE secreta adipocinas^{120,121} e contém nervos adrenérgicos e colinérgicos que interagem com o sistema nervoso simpático e parassimpático no coração.¹²² É possível medir a espessura do TAE através de exames de imagem. Atualmente, a espessura do TAE é visto como um fator de risco metabólico e cardiovascular com boas correlações com os níveis de insulina e pressão arterial sistólica.¹²³ O TAE é espesso em pessoas com diabetes mellitus, síndrome metabólica, esteatose hepática e aterosclerose subclínica.¹²¹

2.7.3 Tecido adiposo perivascular

O tecido adiposo perivascular (TAP) é diferente de outros tecidos adiposos, por causa de sua localização ao redor da maior parte dos vasos sanguíneos, com exceção da circulação cerebral.²⁸ Ainda não é muito bem estabelecido se o TAP é um tecido adiposo branco, bege, marrom ou outro tipo de tecido adiposo,¹²⁴ embora evidências sugeriram que seja um tecido adiposo branco. O TAP possui um contato direto com o *vasa vasorum*²⁸ e com a camada adventícia, podendo se infiltrar nesta camada da artéria.²⁷ O TAP morfologicamente apresenta adipócitos menores e irregulares em relação aos adipócitos em outros sítios, como por exemplo, o tecido adiposo subcutâneo, perirrenal,²⁷ artéria mamária¹²⁵ e por isso acumula gotículas de lipídios menores e irregulares.^{126,127}

O TAP não é considerado como o mesmo tecido de TAE. Embora não haja uma barreira física, as diferentes regiões de deposição de gordura no coração apresentam diferenças de assinatura do transcriptoma. Diferentemente das regiões periatrais e periventriculares, o TAP próximo às artérias coronárias tem uma superexpressão de genes associados à proliferação e genes associados ao metabolismo de esfingolipídios.¹²⁸ O TAP também está associado a maior

expressão gênica de moléculas relacionadas à fibrose, fato que também foi observado nos achados histológicos.¹²⁵ Além disso, o TAP próximo às artérias coronárias tem uma superexpressão de genes associados às citocinas inflamatórias que auxiliam a migração de macrófagos, à regulação do desenvolvimento vascular (angiogênese) e controle da morfologia vascular.¹²⁹

Além da diferença morfológica, há propriedades funcionais intrínsecas ao TAP como a secreção de citocinas com um perfil pró-inflamatório (IL-6, IL-8 e MCP-1), secreção reduzida de adiponectina,²⁷ além de poder liberar espécies reativas de oxigênio.¹²⁸

Desta forma, o TAP é um ambiente propício para recrutamento e ativação de células imunes, e estas células associadas à secreção de adipocinas podem levar à disfunção do TAP e com isso alterar a regulação do tônus arterial e aumentar a chance de DAC.¹³⁰ A obesidade também pode gerar uma disfunção, pois como acontece nos demais tecidos adiposos, há aumento do TAP, hipertrofia e hipóxia, levando à inflamação do TAP e aumento da contratilidade vascular sugerida pelo desbalanço da secreção de adipocinas e da presença de inflamação.²⁸

Devido à sua proximidade com a artéria coronária sem nenhuma barreira anatômica, acredita-se que o TAP pode participar do desenvolvimento da aterosclerose por contribuir para a inflamação na camada adventícia.²⁷ A inflamação parece ser mediada por macrófagos em pacientes com DAC crônica,³⁶ e em poucos estudos de autópsia com aumento do tamanho da placa,^{37,38} macrófagos e linfócitos na placa de ateroma^{35,37} e componentes em placas estáveis, como aumento de colágeno, xantoma intimal, e núcleo lipídico.^{35,37} A densidade de linfócitos T CD8⁺ também foi maior em pacientes com DAC crônica em comparação aos controles.³⁶ Dessa forma, estudos prévios mostraram que há associação entre inflamação no TAP mediada por macrófagos,³⁵⁻³⁷ mas a caracterização predominante ainda tem resposta incerta, pois além dos resultados de estudos prévios serem controversos, há várias limitações já abordadas anteriormente, e a caracterização da aterosclerose coronariana limitou-se em comparar sujeitos com artérias estenosadas com controles.^{18,39,42} Nosso estudo prévio (ANEXO I) avançou um passo, uma vez que encontramos uma correlação positiva entre densidade de linfócitos B CD20⁺

e macrófagos CD68⁺ no TAP periplaca com o estreitamento luminal. Além disso, mostramos que o aumento na densidade de macrófagos CD68⁺ no TAP periplaca está associado com o aumento de risco de placas instáveis. E ainda, mostramos que esta inflamação no TAP pode ser heterogênea, no que se refere aos macrófagos, pelo fato de encontrarmos uma inflamação maior no TAP periplaca, comparado à região distal controle. Dessa forma, sugerimos que o TAP periplaca pode contribuir para a aterogênese coronariana. Pretendemos com este estudo avançar e investigar qual é o perfil inflamatório predominante no TAP periplaca associado à DAC.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação do perfil da resposta inflamatória no TAP adjacente às placas ateroscleróticas de artérias coronárias em um estudo de autópsia.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a associação da polarização dos macrófagos M1 e M2 no TAP adjacente à principal placa aterosclerótica de cada artéria coronária com a composição de placa de aterosclerose e medidas morfométricas nas artérias coronárias;
- Investigar a associação das linhagens de linfócitos Th1 e Treg no TAP adjacente à principal placa aterosclerótica de cada artéria coronária com a composição de placa de aterosclerose e medidas morfométricas nas artérias coronárias;
- Comparar o perfil inflamatório no TAP adjacente às placas de aterosclerose instáveis com o TAP adjacente às placas de aterosclerose estáveis em relação à composição de placa de aterosclerose e medidas morfométricas nas artérias coronárias;
- Comparar o perfil inflamatório no TAP adjacente à principal placa aterosclerótica (periplaca) com TAP adjacente ao seguimento da artéria coronária distal às placas de aterosclerose e sem lesões (controle) em relação à composição de placa de aterosclerose e medidas morfométricas nas artérias coronárias.

3.3 Hipóteses

- **Macrófagos:** os macrófagos M1 no TAP periplaca se correlacionarão positivamente com a porcentagem de obstrução arterial e com componentes relacionados à instabilidade ou vulnerabilidade de placa. Os macrófagos M2 no TAP periplaca se correlacionarão positivamente com a porcentagem de obstrução arterial e componentes de placa de aterosclerose relacionados às lesões crônicas e estáveis. Contudo, esperamos encontrar que o fenótipo do TAP adjacente à placa seja predominantemente pró-inflamatório em placas avançadas, vulneráveis e instáveis;
- **Linfócitos T:** os linfócitos da linhagem Th1 no TAP periplaca se correlacionarão de modo semelhante com a reposta dos macrófagos M1: porcentagem de obstrução arterial e com os componentes relacionados à instabilidade ou vulnerabilidade de placa. Os linfócitos Treg no TAP periplaca serão infreqüentes, mas se correlacionarão negativamente com a porcentagem de obstrução arterial e correlacionarão com componentes relacionados às lesões crônicas e estáveis. Contudo, esperamos encontrar que o fenótipo do TAP adjacente à placa seja predominantemente pró-inflamatório em placas avançadas, vulneráveis e instáveis;
- Esperamos encontrar inflamação predominantemente pró-inflamatória com fenótipo M1 e linfócitos da linhagem Th1 no TAP periplaca adjacente às placas ateroscleróticas instáveis em comparação com as placas estáveis;
- Esperamos encontrar no mesmo indivíduo que a densidade de ambos os perfis serão maiores no TAP periplaca em comparação com o TAP controle distal. A freqüência na região distal será baixa e com predomínio de fenótipo anti-inflamatório.

4. MÉTODO

4.1 Local de coleta de dados

O presente estudo foi desenvolvido nos laboratórios de Patologia Cardiovascular e também no Biobanco para Estudos em Envelhecimento da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (BEE-FMUSP). Ambos os laboratórios fazem parte do Laboratório de Investigação Médica – LIM22 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O Biobanco tem como objetivo o melhor entendimento dos processos relacionados à senescência e à senilidade, e para isso conta com uma estrutura organizacional bem definida de coleta de dados, processamento, avaliação clínica e anatomopatológica. Esta estrutura funciona desde meados de 2004.¹³¹ A coleta de dados é realizada no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP).¹³¹ Este serviço realiza em média mais de 14.000 autópsias anualmente e tem como objetivo esclarecer a *causa mortis* em casos de óbito por moléstia mal definida ou sem assistência médica ocorridos no município de São Paulo.¹³²

O Biobanco criou uma estrutura organizacional de coleta de dados composta por enfermeiros e gerontólogos, que convidam os familiares a participarem do estudo. Esta abordagem do familiar é realizada durante o período de 4 a 6 horas em que os familiares esperam a liberação do corpo no próprio local. São explicados os objetivos e método do estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é aplicado antes da pesquisa ser iniciada. Após a assinatura do TCLE é aplicada uma entrevista clínica semiestruturada, que dura em média 30 minutos. Este processo é realizado em uma sala privativa no próprio SVOC-USP. Posteriormente, outra equipe faz a captação do material biológico e os dados antropométricos na sala de autópsia.¹³¹

O presente estudo utiliza o mesmo repositório da pesquisa realizada anteriormente.⁴³ Utilizamos a experiência e a estrutura do Biobanco para a coleta dos dados no período de 2013 a 2015.⁴⁴ Neste período, a coleta de dados foi realizada pela aluna, que fez parte da equipe de entrevistas no período de 2010 a 2015, e pelas equipes do Biobanco no período matutino. No período vespertino a aluna teve o auxílio da equipe do Laboratório de Patologia Cardiovascular. Esta pesquisa é um projeto associado ao estudo de doutorado da Dra. Aline Nishizawa (2011-2016), intitulado “Associação entre adiposidade e aterosclerose sistêmica”, com aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (412/11). O pesquisador responsável foi o Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci.

Conforme aprovado no comitê de ética, utilizamos o TCLE do estudo (412/11) para a obtenção do material e dados clínicos (ANEXO II). Este estudo foi aprovado como projeto independente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP sob o número CAAE: 70793717.0.0000.0065 (ANEXO III), mas com vinculação ao projeto citado anteriormente e também ao projeto de mestrado anterior da aluna (439/12 – ANEXO IV). O presente estudo é financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através do auxílio regular à pesquisa 2017/11313-0, aprovado em dezembro de 2017.¹³³ Além disso, a aluna tem bolsa de doutorado regular concedida pela FAPESP 2017/24066-1.¹³⁴

4.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional de corte transversal.

4.3 Casuística

4.3.1 Critérios de Inclusão

- Indivíduo participante da pesquisa com idade igual ou acima de 30 anos na data do óbito;
- Ter autorização através do TCLE assinado pelo responsável legal;
- Intervalo *post mortem* inferior à 24 horas (contabilizados até o término do processamento das amostras);

- Coração e tecidos adiposos cedidos pelo médico assistente plantonista do SVOC-USP;
- Informantes com convívio diário ou semanal.

4.3.2 Critérios de Exclusão

- Informante que não forneça dados consistentes, por motivos cognitivos, emocionais, ou por convívio com frequência inferior ao semanal;
- Tempo de fixação das amostras de tecido adiposo maior que 72 horas;
- Presença de inflamação local ou sistêmica:
 - ❖ *Stent* coronariano;
 - ❖ Diagnóstico prévio de sepse e/ou sinais de sepse *post mortem*;
 - ❖ Uso de corticosteroides ou imunossupressores, de uso atual ou contínuo;
 - ❖ Tratamento atual com quimioterapia e/ou radioterapia;
 - ❖ Histórico de doença autoimune;
 - ❖ Pericardite crônica ou aguda;
 - ❖ Derrame pericárdico;
 - ❖ Miocardite e/ou endocardite;
 - ❖ Doença de Chagas;
 - ❖ Hemopericárdio ou tamponamento cardíaco;
 - ❖ Transplante cardíaco;
 - ❖ Cirurgia cardíaca prévia;
 - ❖ Seguidos da artéria coronária que apresentaram ponte miocárdica, por ausência de amostra de tecido adiposo perivascular para correspondente avaliação.

4.3.2.1 Identificação de sinais de sepse *post mortem*

O diagnóstico de sepse é clínico, mas características dos principais órgãos em resposta à sepse podem ser evidenciadas durante o exame da autópsia.^{135,136} Durante o exame de autópsia os técnicos de autópsia do SVOC-USP amostram fragmentos dos principais órgãos, encaminhados para confecção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) para a determinação do

diagnóstico da causa da morte. Para este estudo, foi feita a requisição destas lâminas no Laboratório de Histotécnica no Departamento de Patologia da FMUSP, para verificação de presença de alterações que podem sugerir sepse para cada participante de acordo com os estudos prévios.⁴³ As lesões observadas nos órgãos foram:¹³⁵

- “(1) Coração: necrose isquêmica, inflamação intersticial, miocardite, hemorragia intersticial;
- (2) Pulmão: congestão e expansão da parede alveolar. Neutrófilos variáveis no interstício, edema e hemácias nos alvéolos, células epiteliais tipo 1 e células endoteliais capilares alveolares. E nos estágios mais avançados são encontrados: colapso alveolar, hemorragia e edema, formação da membrana hialina na superfície epitelial dos bronquíolos respiratórios e ductos alveolares e acúmulo variável de neutrófilos nos capilares alveolares;
- (3) Fígado: colestase intracanalicular nas áreas perivenulares, colestase ductular, ductulos em proliferação e inflamação neutrofilica portal circundante e colestase canalicular, colangite não bacteriana com ductulos biliares em proliferação;
- (4) Rim: edema intersticial com separação dos túbulos, edema das células tubulares, perda de núcleos de células tubulares no lúmen, atenuação da espessura do epitélio tubular, regeneração das células tubulares, inflamação intersticial e acúmulo de células nucleadas (linfócitos, precursores mieloides e precursores de eritrócitos nucleados) nos vasos retos na medula externa.”¹³⁵

Os participantes que obtiveram dois ou mais critérios associados à sepse com um foco de infecção foram excluídos do estudo (exemplos na Figura 30). Esta avaliação foi realizada pelo patologista Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva.⁴³

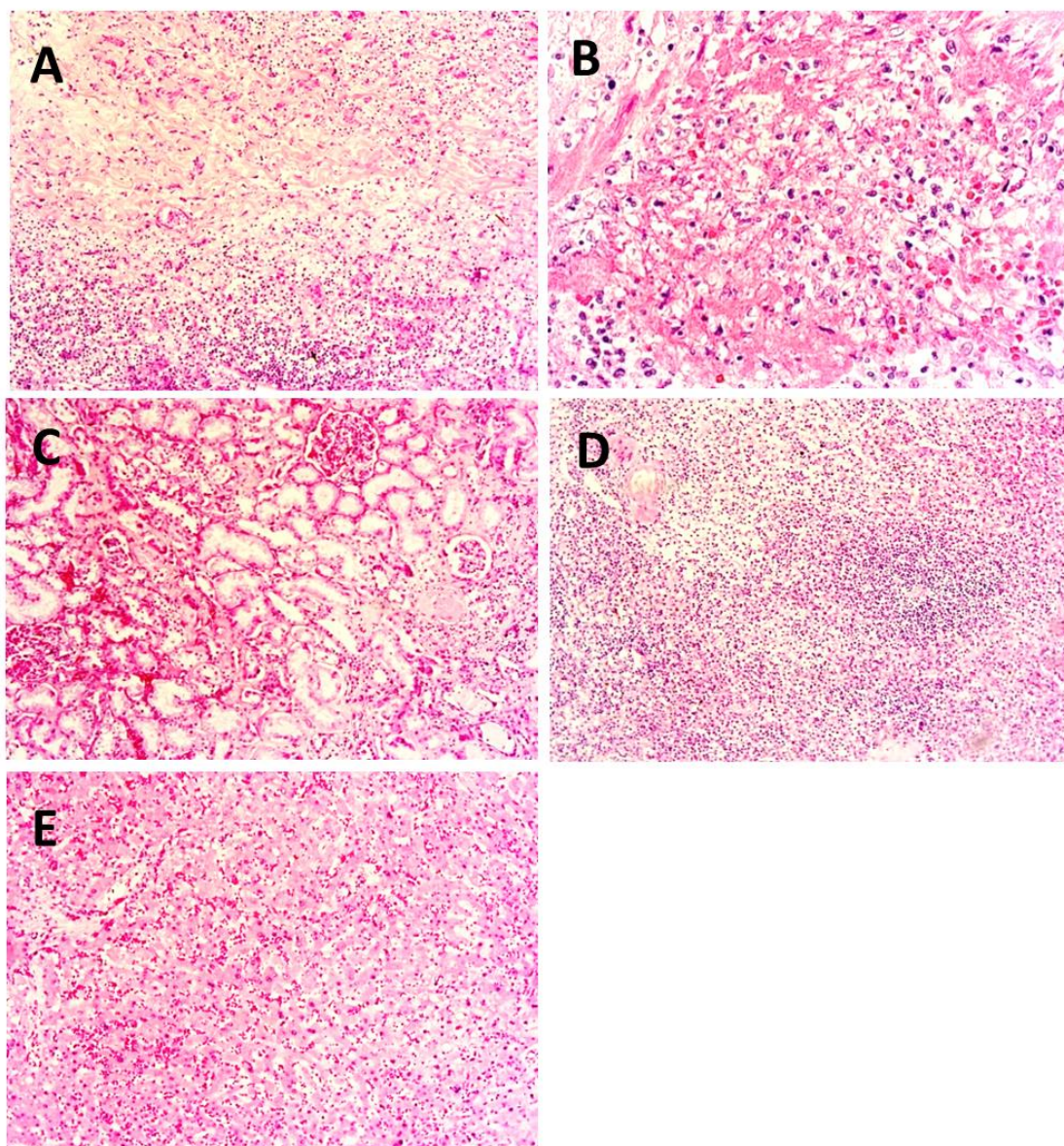


Figura 30. Fragmentos de pulmão, rim, baço e fígado responsivos à sepse. Fragmentos de pulmão, rim, baço e fígado responsivos à sepse. A: aumento de 10x de fragmento do pulmão com infiltração de neutrófilos associado à pleurite por broncopneumonia. B: aumento de 40x de pulmão com infiltrado de neutrófilos. C: aumento de 10x de rim com necrose tubular aguda por choque; D: aumento de 10x de baço com esplenite aguda; E: aumento de 10x de fígado com congestão e esteatose hepática por consequência à broncopneumonia. Fonte: Farias-Itao, et al., (2019).⁴³

4.4 Dados Clínicos e Sociodemográficos

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

- Dados sociodemográficos: idade na data do óbito obtido por documento oficial, sexo, cor, escolaridade (em anos completos de estudo), e frequência de convívio com o falecido (diário ou semanal).
- Antecedentes pessoais e fatores de risco cardiovascular: diagnóstico prévio de HAS, diabetes mellitus, DAC, ICC, dislipidemia (DLP), AVC, sedentarismo, tabagismo e etilismo.
- Uso de medicamentos (atual e contínuo) como corticosteroides e imunossupressores; histórico de cirurgia cardíaca prévia, angioplastia, doença de Chagas, e doença autoimune para verificar a presença de critérios de exclusão.

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

4.5 Amostragem dos Tecidos

A metodologia da padronização de coleta e fixação do material foi previamente publicada.⁴⁴ O processamento do material foi realizado no Laboratório de Patologia Cardiovascular pela aluna com auxílio da técnica do laboratório. O coração e as gorduras foram lavados em água corrente para a retirada do excesso de sangue e de coágulos. O coração foi colocado em um freezer a -20 °C para ser resfriado por dois minutos e posteriormente injetamos ágar nas artérias coronárias através do óstio da coronária direta (CD), no tronco da coronária esquerda (TCE) e do orifício da artéria coronária circunflexa (CX) para evitar colabamento. O coração foi resfriado novamente por 1 minuto para a solidificação do ágar, e depois as artérias coronárias foram dissecadas com 1 cm de TAP circundante e adjacente ao redor das artérias coronárias através dos óstios na aorta ascendente. Foram dissecadas as artérias CD, TCE, artéria coronária descendente anterior (DA) e CX. O TAP foi removido sistematicamente a cada 1,5 cm a partir do óstio, devidamente identificado em cassetes em ordem crescente de retirada para posterior correspondência com os fragmentos das artérias. Caso fosse necessário, o ágar foi injetado repetidas vezes nas artérias coronárias até que a artéria se abrisse completamente de modo uniforme, sob uma plataforma de gelo reutilizável (Figura 31).

As artérias coronárias foram fixadas por pelo menos 5 dias e o TAP no período de 24 a 72 horas em paraformaldeído diluído a 4% tamponado com pH entre 7,2 a 7,4 conforme previamente padronizado.⁴⁴

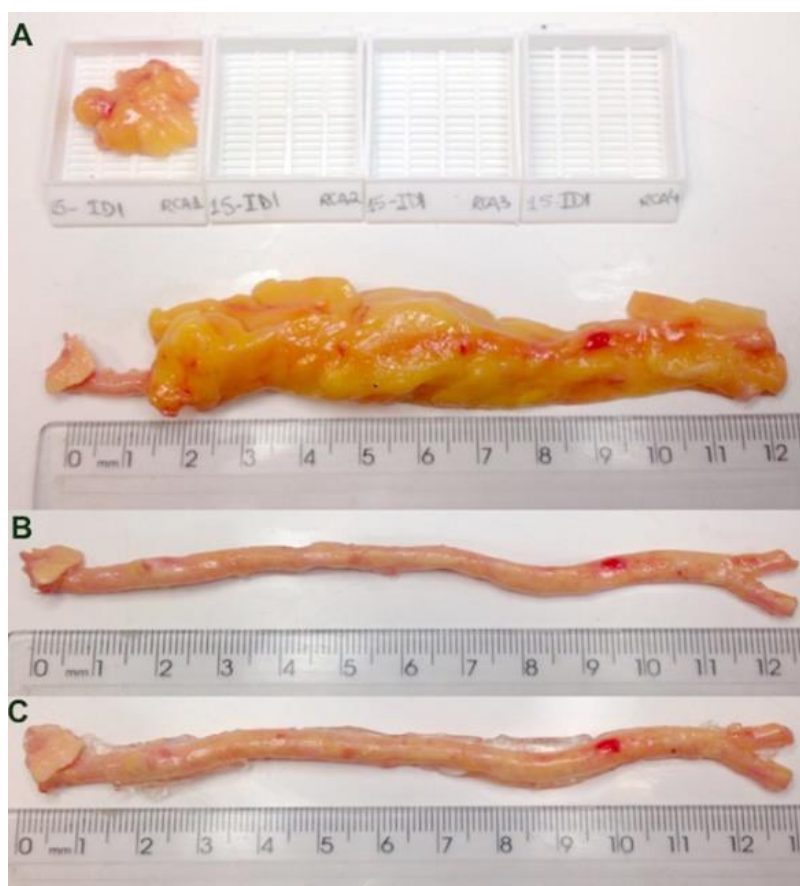


Figura 31. Ilustração do procedimento da remoção do tecido adiposo perivascular adjacente às artérias coronárias e abertura das artérias coronárias. A: Remoção sistemática do tecido adiposo perivascular a cada 1,5 cm a partir do óstio; B: artérias coronárias dissecadas após a primeira injeção de ágar com as artérias no coração; C: resultado das repetidas injeções de ágar com abertura eficaz. Fonte: Farias-Itao e colaboradores (2016).⁴⁴

4.6 Avaliação das artérias coronárias

4.6.1 Avaliação Macroscópica

Após a fixação, as artérias coronárias foram cortadas transversalmente do mesmo modo em que o TAP foi retirado, em fragmentos de 1,5 cm desde o óstio até a extremidade, e então cada fragmento foi cortado transversalmente em intervalos regulares de 5 mm para avaliação macroscópica em cada secção. A avaliação foi feita sistematicamente em todas as artérias coronárias, com registro da estimativa da porcentagem de obstrução arterial e características macroscópicas da placa para cada fragmento. Durante a avaliação o fragmento com maior

obstrução da luz do vaso ou com sinal de instabilidade da placa aterosclerótica (hemorragia de placa ou trombo) foram amostrados para posterior análise histológica de acordo com critérios aceitos internacionalmente (TAP periplaca).⁷⁶ Além disso, foi amostrado também fragmento com ausência macroscópica de aterosclerose ou lesão inicial de cada artéria, distal à placa de ateroma amostrada inicialmente e de outras placas. Esta amostra foi utilizada como controle intracardíaco (TAP controle).

Estes procedimentos foram realizados com auxílio de uma lupa (Emporionet® LP 500, Brasil) com um anel de luz acoplada com suporte pedestal girafa fixado na mesa. O ágar foi retirado de todas as secções amostradas e as artérias coronárias foram fotografadas com o auxílio de um estereomicroscópio (Nikon® SMZ 1000, Tóquio, Japão) para análise macroscópica (Figura 32).

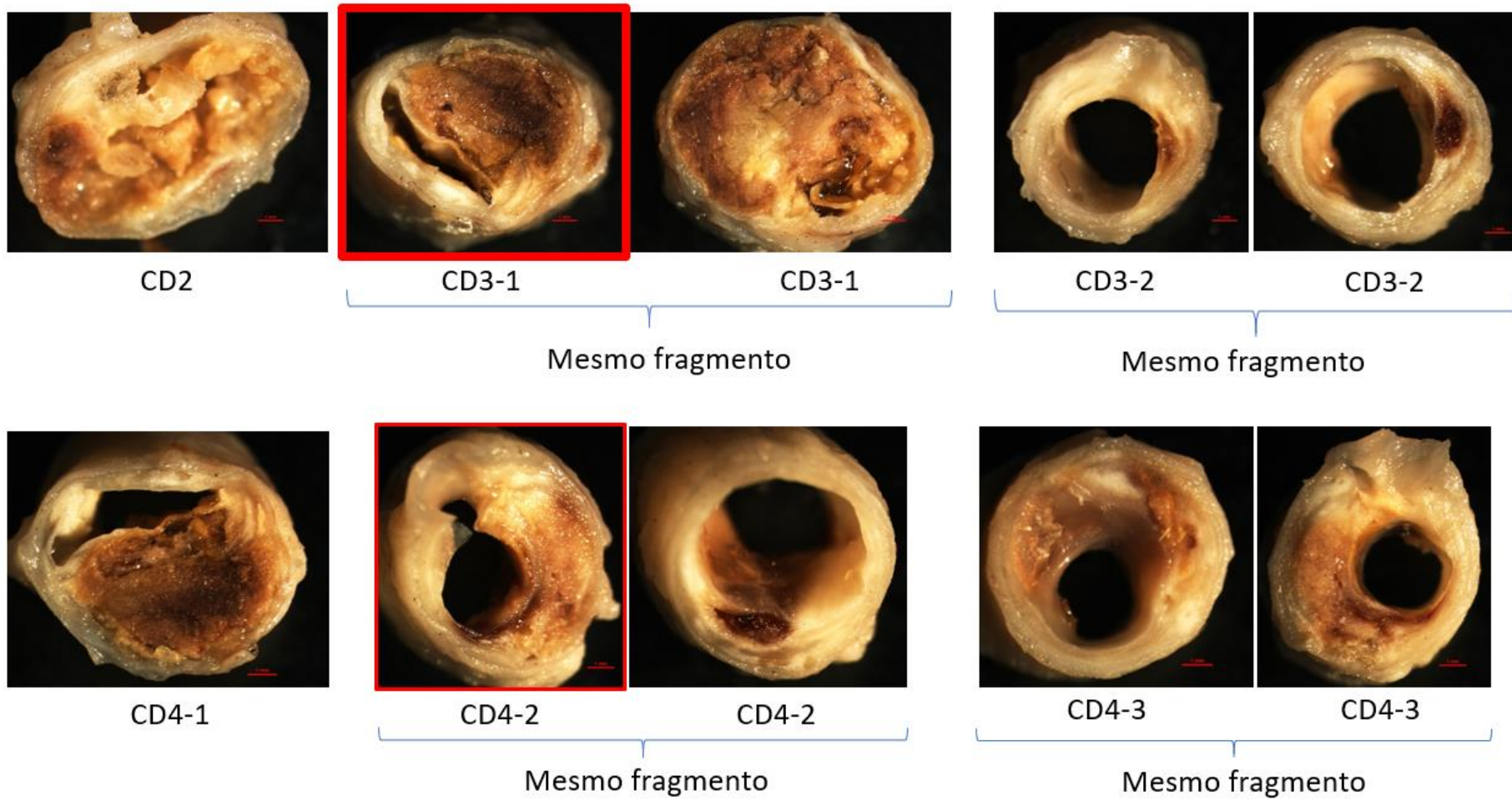


Figura 32. Artéria coronária direita cortada em cortes transversais a cada 5mm para avaliação macroscópica. Fotos com aumento de 1,5x. Fonte: Arquivo pessoal.

As amostras foram enviadas ao laboratório de Histotécnica da FMUSP. Os fragmentos das artérias amostradas passaram pelo processo de desidratação, diafanização e depois foram incluídas e emblocadas em parafina. Com auxílio de um micrótomo, foram realizados cortes com 4 µm de espessura para a confecção das lâminas. Cada fragmento foi corado com HE, Tricômico de Masson e Verhoeff. As lâminas confeccionadas foram fotografadas com auxílio de um estereomicroscópio (Nikon®, SMZ 1000, Tóquio, Japão) para as medidas morfométricas e análise da composição de placa de aterosclerose.

4.6.2 Análise Microscópica: Atherosclerotic Plaque Analyzer (APA)

Para aprimorar a avaliação das lesões ateroscleróticas, desenvolvemos em parceria com o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) um programa computacional em ambiente *National Instruments LabVIEW®* (linguagem gráfica de programação destinada a aplicações em engenharia) capaz de processar as imagens de microscopia de artérias coronárias. Este projeto foi desenvolvido pelas equipes das duas universidades. Além disso, este projeto foi o tema da dissertação de mestrado profissional do aluno Renato Araújo de Andrade (IFSP), orientado pelo Professor Dr. Alexandre Brincalpe Campo (IFSP). O projeto teve aprovação do comitê de ética em pesquisa nas duas universidades (CAAE FMUSP: 86044518.0.3002.0065 e CAAE IFSP: 86044518.0.0000.5473) (ANEXO VI e VII).

O objetivo deste software foi a construção de um ambiente onde pudéssemos simular a experiência que os médicos patologistas têm ao realizar a classificação de placa, utilizando as três colorações e facilitar o acesso à foto macroscópica como suporte (Figura 33). O desenvolvimento deste software foi planejado pelas duas equipes. O software foi nomeado como “*Atherosclerotic Plaque Analyzer (APA)*”. O menu de ferramentas do software inclui: (1) carregamento do banco de imagens em formato de árvore; (2) realiza o tratamento de imagem das fotografias microscópicas para uniformizar o fundo para correção das divergências de iluminação e melhorar

o contraste de toda a fotografia (Figura 34); (3) realiza automaticamente a localização da artéria; (4) faz o processamento da barra de calibração a fim de calibrar o sistema de coordenadas contido na imagem e extrair medidas em escala real, uma vez que as fotos de cada artéria foram tiradas nos variados aumentos para que a imagem capture o maior número de detalhes possível; (5) apresenta diversas ferramentas de construção de contornos; (6) possui ferramentas para edição dos contornos; (7) realiza uma varredura através do centro da artéria em um giro de 360 graus para fazer o desdobramento transversal para mensuração da espessura da capa fibrosa (ECF), espessura da íntima-média (EIM) e observação das medidas de espessura máxima e mínima cada componente, bem como da placa aterosclerótica; e (8) realiza a exportação das medidas calculadas automaticamente pelo APA diretamente para a planilha de dados em formato CSV ou XLS.

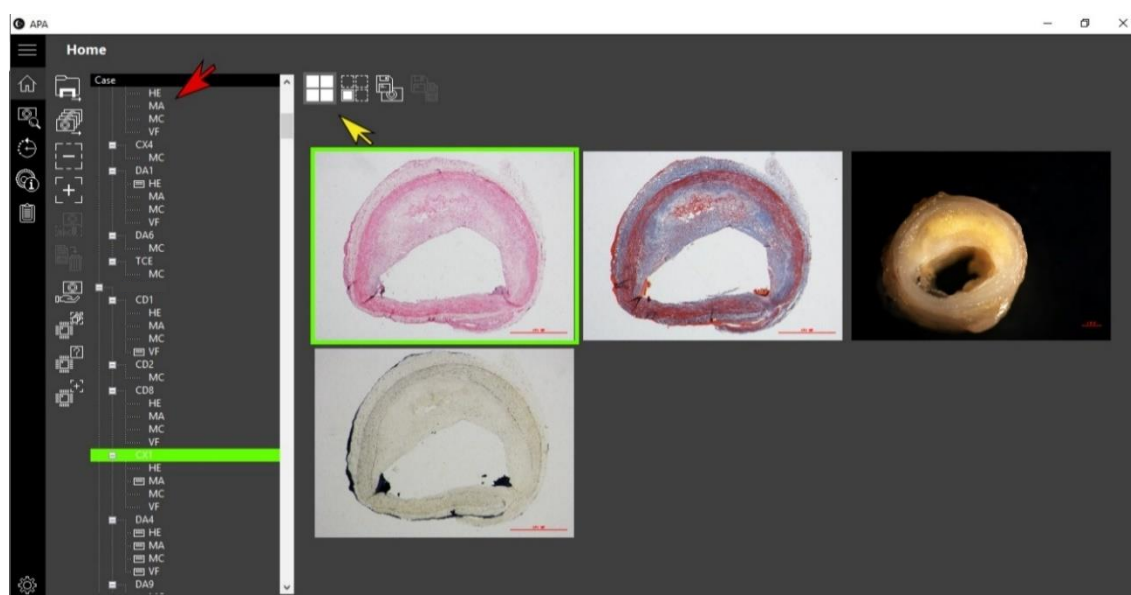


Figura 33. Captura de imagem do software *Atherosclerotic Plaque Analyzer*. A árvore com a identificação do indivíduo e os fragmentos que compõe a amostra está identificada com a flecha vermelha. A flecha amarela identifica o menu que mostra simultaneamente as três colorações e a foto macroscópica original, que denominamos como mosaico. Esse processo se assemelha à comparação que é realizada pelos patologistas e facilita o processo de classificação. Fonte: Arquivo pessoal.

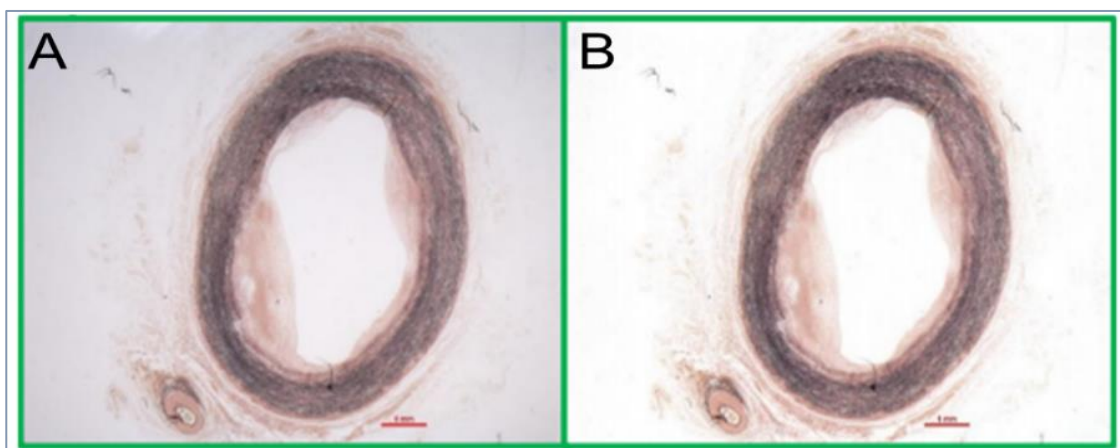


Figura 34. Tratamento de imagem realizada pelo software *Atherosclerotic Plaque Analyzer*. A: Foto de uma artéria carótida realizada através do estereomicroscópio; B: Mesma foto da figura A após a correção de branco do fundo e aumento uniforme do contraste. Escala: 1 mm. Fonte: Arquivo pessoal.

O tratamento de imagem, localização da artéria, localização e processamento da escala, bem como os contornos de LLEI e lúmen são realizados de modo automático por meio de varredura radial e posteriormente contorno ativo (método *snake*). Foi realizado testes de concordância entre o processamento automático em relação ao manual e obtivemos uma taxa de 94% para a LLEI (Figura 35) e para o lúmen (Figura 36).^{137,138} As artérias que apresentaram alterações de contornos devido ao processamento delicado da histologia (deformações ou rompimentos) foram realizadas manualmente.

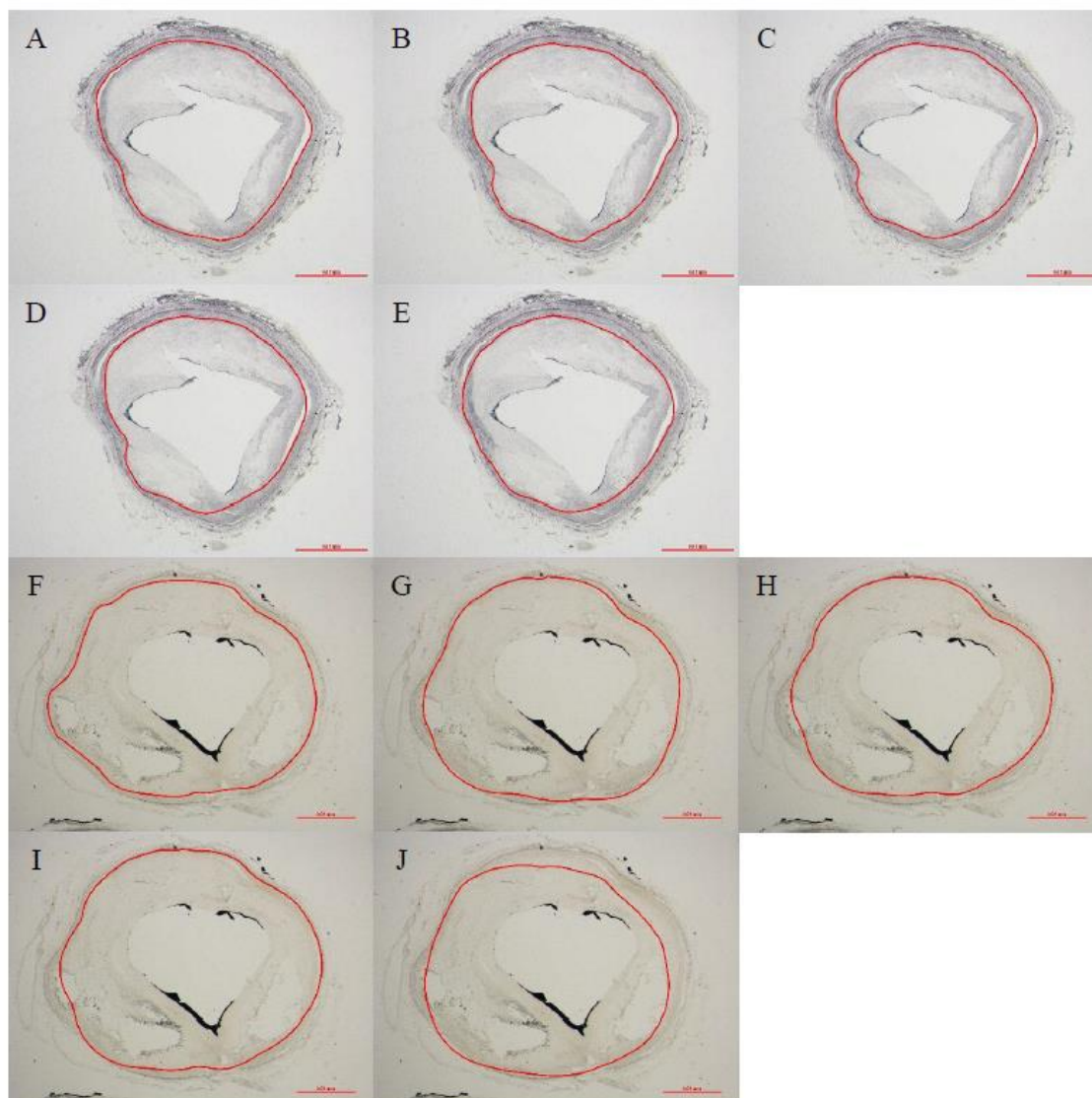


Figura 35. Comparação entre traçado manual e automático da Lâmina Limitante Elástica Interna. As figuras A e F correspondem ao traçado realizado manualmente, as figuras de B-G, C-H, D-I, e E-J correspondem ao traçado realizado de modo automático pelo software através de diferentes métodos. Escala: 0,01 mm. Fonte: Reprodução de imagem autorizada pelo Renato Araújo de Andrade.

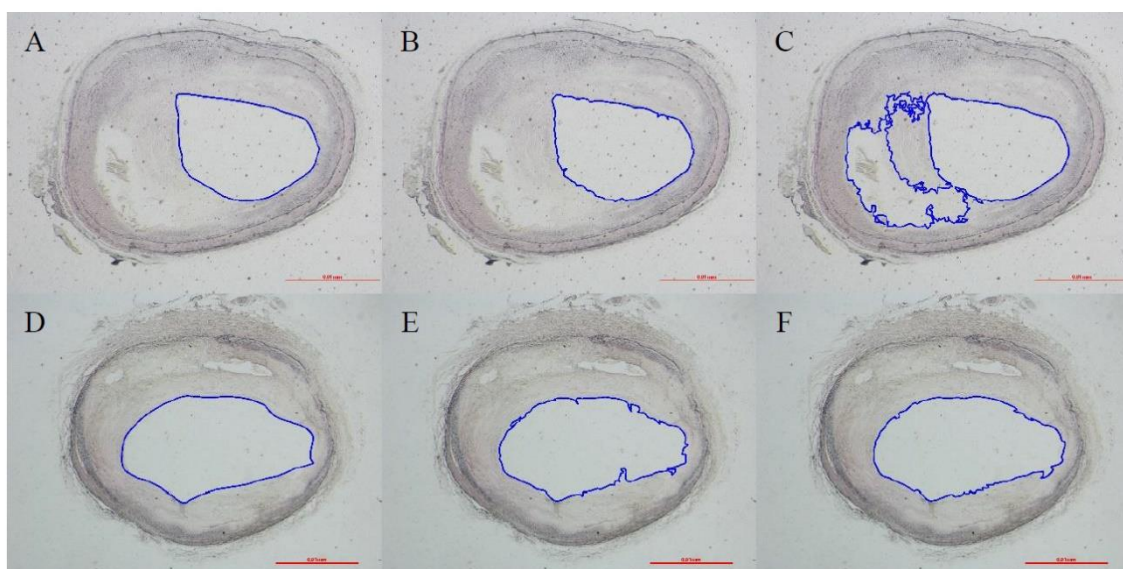


Figura 36. Comparação entre traçado manual e automático do lúmen. As figuras A e D correspondem ao traçado realizado manualmente; as letras B-E e C-F correspondem ao traçado realizado de modo automático pelo APA através de diferentes métodos. Escala: 0,01 mm. Fonte: Reprodução de imagem autorizada pelo Renato Araújo de Andrade.

As principais vantagens em relação ao processamento manual executado por um pesquisador compreendem: menor tempo de execução por se tratar de processamento em tempo de máquina; reprodutibilidade e maior precisão por não haver divergências nos resultados se utilizados os mesmos critérios e o mesmo material, além da possibilidade de uma ferramenta dedicada para a tarefa (em substituição ao software Image J[®] que era utilizado para as mensurações).¹³⁹

Após os contornos realizados da LLEE, LLEI e o lúmen na coloração de Verhoeff, o software calcula automaticamente a área da placa (Figuras 37 e 38). Na área da placa realizamos a identificação dos componentes de placa manualmente nas outras duas colorações e conseguimos transpor estes traçados de uma coloração para a outra. Na coloração de HE mensuramos a área das porções de lipídio, necrose, trombo, hemorragia de placa e calcificações. Na coloração de Tricômico de Masson, mensuramos a área da capa fibrosa e fibrose (Figura 39).

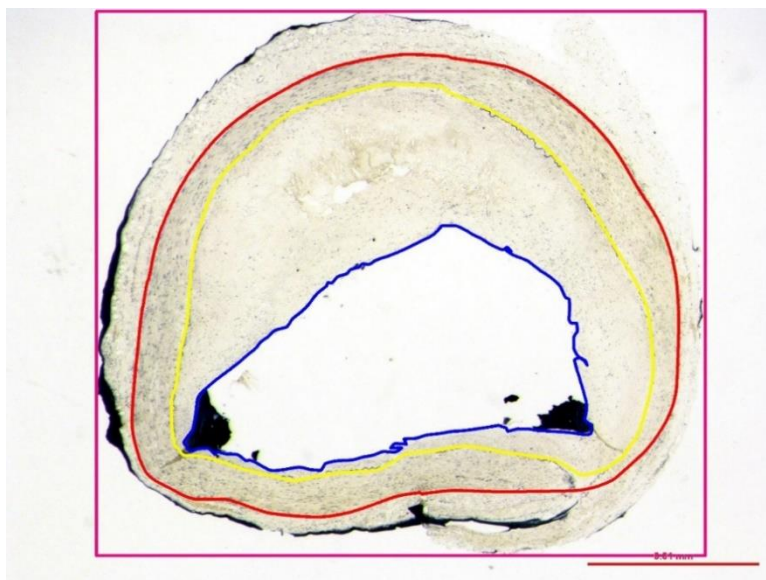


Figura 37. Artéria coronária com os contornos realizados automaticamente através do software Atherosclerotic Plaque Analyzer. A lâmina limitante elástica interna está contornada em amarelo e o lúmen em azul. A lâmina limitante elástica externa foi contornada manualmente e está indicada em vermelho. Área da placa corresponde à área entre os contornos amarelo e azul. Escala: 0,01 mm. Fonte: Arquivo pessoal.

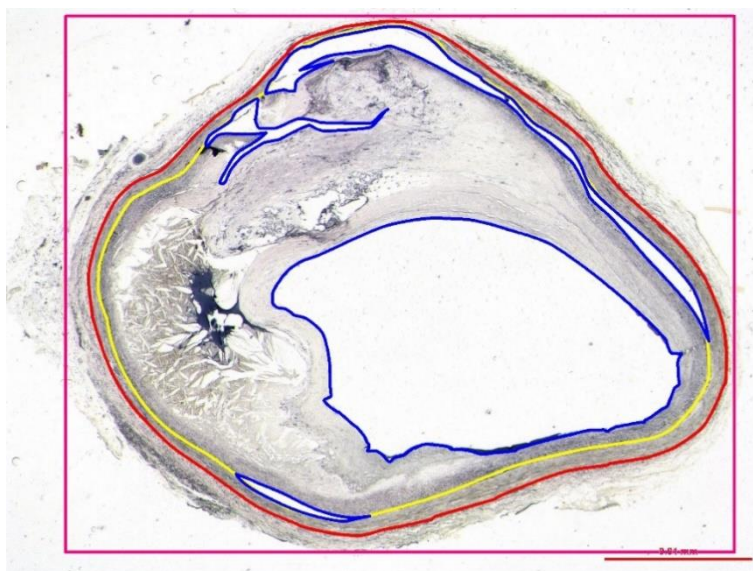


Figura 38. Artéria coronária com os contornos realizados manualmente através do software Atherosclerotic Plaque Analyzer devido à presença de artefato. A lâmina limitante elástica interna está contornada em amarelo e o lúmen em azul. A lâmina limitante elástica externa foi contornada

manualmente e está indicada em vermelho. Área da placa corresponde à área entre os contornos amarelo e azul. Escala: 0,01 mm. Fonte: Arquivo pessoal.

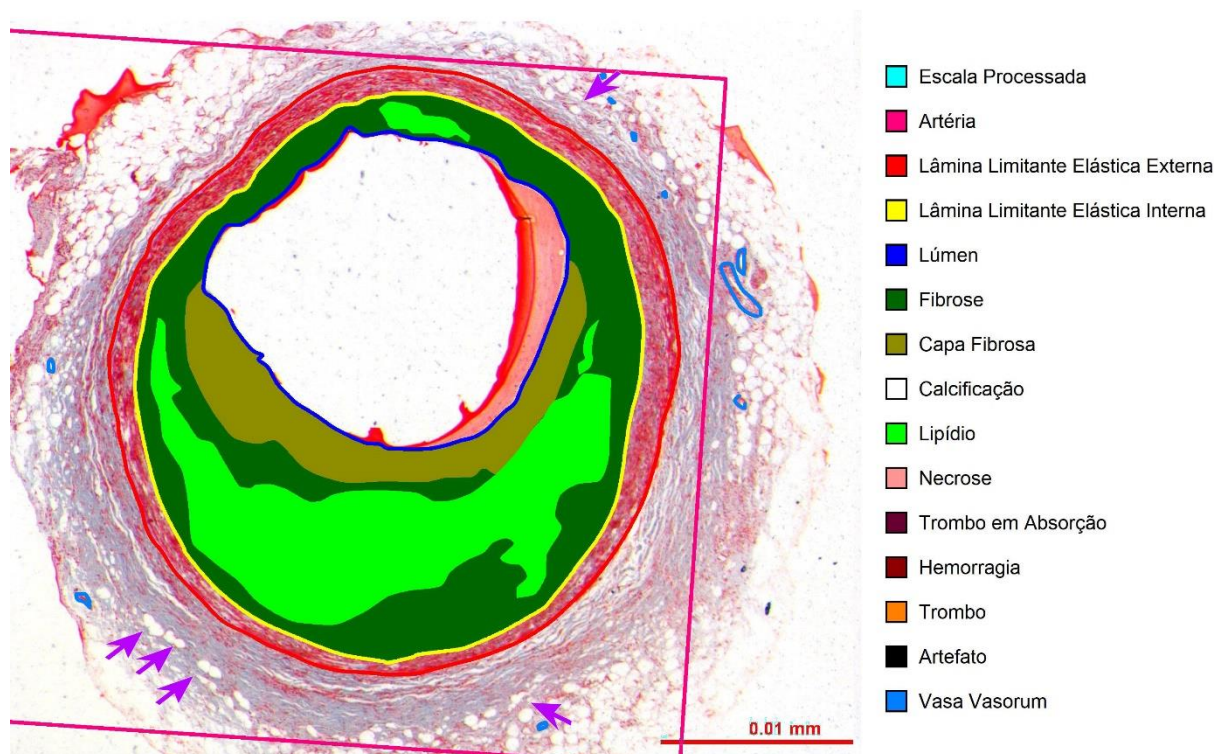


Figura 39. Análise dos componentes da placa de aterosclerose em artéria coronária realizado manualmente através do software Atherosclerotic Plaque Analyzer na coloração de Tricômico de Masson. Setas roxas indicam adipócitos do tecido adiposo perivascular infiltrados na camada adventícia. Escala: 0,01 mm. Fonte: Arquivo pessoal.

Desta forma, o APA forneceu as seguintes informações utilizadas neste estudo: área delimitada pela lâmina limitante elástica interna (LLEI), área delimitada pela lâmina limitante elástica externa (LLEE), área delimitada pelo lúmen, área total de lipídios, área total de fibrose, área total da capa fibrosa isoladamente, área de necrose, área de hemorragia de placa, área de calcificação, e área de trombo.^{137,138} Através destas informações calculamos a porcentagem de obstrução arterial.¹⁴⁰

Porcentagem de obstrução arterial: $\frac{\text{Área delimitada pela LLEI} - \text{Área delimitada pelo lúmen}}{\text{Área delimitada pela LLEI}} \times 100$

4.6.3. Divisão dos Grupos

As placas de aterosclerose foram classificadas em placas ateroscleróticas estáveis e instáveis através da análise microscópica de acordo com critérios aceitos internacionalmente.⁷⁶

- (1) Placas ateroscleróticas instáveis: presença de trombo obstrutivo ou não obstrutivo, e hemorragia de placa;
- (2) Placas ateroscleróticas estáveis: ausência dos componentes acima

4.7 Avaliação do perfil da resposta inflamatória no TAP

Para investigar a caracterização do perfil inflamatório das células imunes no TAP associadas à DAC, utilizamos a técnica de imuno-histoquímica simples para a identificação dos macrófagos polarizados e de imuno-histoquímica de dupla marcação para as linhagens de linfócitos Th1 e Treg. Posteriormente, todas as lâminas foram digitalizadas para a contagem das células para obtenção da avaliação final em densidade de células (células/ μm^2).

4.7.1 Macrófagos Polarizados

Baseado no estudo prévio de Hirata et al.¹⁴¹ utilizamos os anticorpos anti-CD11c para a detecção de macrófagos com fenótipo M1 (pró-inflamatório) e anti-CD206 para macrófagos com fenótipo M2 (anti-inflamatório/reparador).

A técnica de IHQ foi realizada nas 656 amostras de TAP periplaca e TAP distal parafinados cortados em 4 μm de espessura aderidos em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano-Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA). O processo de desparafinização

foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65 °C, durante cinco minutos e passadas rapidamente em três banhos de xilol frio. Para hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95% e um banho de álcool 70%. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e deixadas em tampão fosfato com pH 7,4. O próximo passo foi a recuperação dos sítios antigênicos realizado através de alta temperatura em solução de ácido cítrico 10 mM pH=6,0 em panela de pressão. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada 10v (3%). As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-CD11c e anti-CD206 diluídos (Tabela 5), e incubados *overnight* à 4 °C (16 horas). Após o período de incubação, foram feitas lavagens em tampão fosfato e as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário: polímero Easylink One conjugado com streptavidina (HRP) (EasyPath, Immunobioscience Corp. EUA) e utilizado como cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) para a revelação. Após lavagens com tampão, as lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) (Figuras 40). Tonsilas faríngeas foram utilizadas como controle positivo e negativo.

Tabela 5. Especificação dos anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica para macrófagos.

| Anticorpo | Tipo de Anticorpo | Obtido | Clone | Marca | Diluição padronizada | Diluído |
|-------------------|----------------------|------------|---------|-------------------------------|----------------------|---|
| CD11c | Anticorpo monoclonal | Coelho | EP1347Y | Abcam, Cambridge, Reino Unido | 1µl: 400µl | Dilúente de anticorpo da Spring® (ADS-125, Spring Bioscience Corp, EUA) |
| CD206 (anti-MRC1) | Anticorpo monoclonal | Camundongo | 5C11 | Abnova, Taiwan | 1µl: 1500µl | Albumina de soro bovino em 1% com tampão fosfato |

EUA: Estados Unido da América.

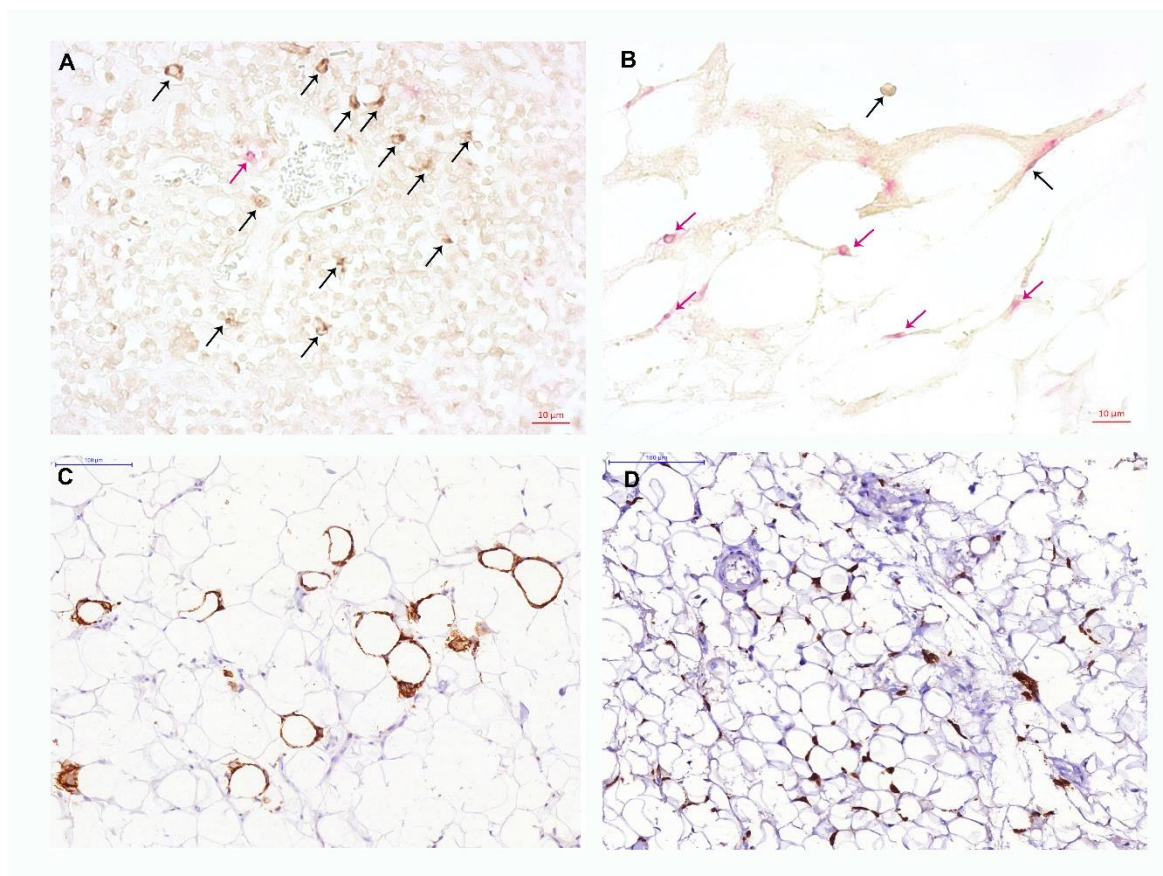


Figura 40. Macrófagos polarizados no tecido adiposo perivascular periplaca. A: Tonsila faríngea imunomarcada com a técnica de imuno-histoquímica de dupla marcação para macrófagos M1 $CD11c^+$ (setas marrons) e macrófagos M2 $CD206^+$ (setas cor-de-rosa); B: Tecido adiposo perivascular imunomarcado com a técnica de imuno-histoquímica de dupla marcação para macrófagos M1 $CD11c^+$ (setas marrons) e macrófagos M2 $CD206^+$ (setas cor-de-rosa); C: Tecido adiposo perivascular adjacente à artéria coronária direta imunomarcada com macrófagos M1 em marrom formando estrutura em coroa (*crown link structures*) ao redor dos adipócitos mortos ou em processo de morte; D: Tecido adiposo perivascular adjacente à artéria coronária direta imunomarcada com macrófagos M2. Fonte: Farias-Itao, et al., 2022.¹³⁷

4.7.2 Linfócitos Th1

Para a padronização, primeiro realizamos a técnica de IHQ com cada anticorpo primário separadamente, e somente após realizamos os testes de dupla marcação em uma única amostra com tecido de tonsila faríngea humana e TAP. Na IHQ de dupla marcação são utilizados dois cromógenos de sistemas de detecção diferentes (um para cada anticorpo primário): peroxidase (HRP) e fosfatase (AP) de cores diferentes. As lâminas marcadas com dupla marcação tiveram prioridade na digitalização, pois o DAB é mais estável ao longo do tempo comparado com os cromógenos de fosfatase ou HRP coloridos, que podem desbotar com mais facilidade (Tabela 6). As padronizações das linhagens dos linfócitos Th1 e Treg foram realizadas pela aluna sob supervisão da Dra. Ana Maria Gonçalves da Silva no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IMT-FMUSP). Todas as lâminas executadas com a técnica de IHQ de dupla marcação foram realizadas pela aula no IMT-FMUSP e no BEE-FMUSP.

Tabela 6. Especificação dos anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica para linfócitos Th1.

| Anticorpo | Tipo de Anticorpo | Obtido | Clone | Marca | Diluição padronizada | Diluído |
|-----------|----------------------|------------|---------------------|-------------------------|----------------------|--|
| CD4 | Anticorpo monoclonal | Camundongo | 4B12 | Dako-Agilent, Dinamarca | 1µl: 50µl | Albumina de soro bovino em 1% com tampão fosfato |
| CXCR3 | Anticorpo monoclonal | Camundongo | Clone 49801, MAB160 | R&D Systems, EUA | 1 µl: 200 µl | Albumina de soro bovino em 1% com tampão fosfato |

EUA: Estados Unidos da América.

Para a técnica de IHQ de dupla marcação utilizamos cortes de TAP com espessura de 4 µm aderidos em lâminas silanizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano-Sigma Chemical Co.; St. Louis, Missouri, EUA). O processo de desparafinização foi feito ao colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 °C durante 30 minutos, seguido de dois banhos de xilol frio por cinco

minutos e posteriormente dois banhos em álcool absoluto de um minuto para ajudar a remover o excesso de xilol, e finalizou com três banhos sucessivos de álcool 95% diluído em água deionizada por um minuto para a hidratação dos cortes. As lâminas foram lavadas em água corrente e mergulhadas em água deionizada. Para a recuperação dos epítomos, usamos a solução com Tris-EDTA de pH alto (9,0) (Tris-base: 0,121g e EDTA: 0,037g com 100 ml de água deionizada). Esta solução foi pré-aquecida por 20 minutos em panela de vapor. As lâminas foram imersas na solução já aquecida por 30 minutos, posteriormente, foram retiradas da panela e resfriadas em temperatura ambiente na própria solução por 20 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e água deionizada para posterior bloqueio com peróxido de hidrogênio na solução: 50 ml de metanol+50 ml de água deionizada com 30 µl de peróxido de hidrogênio 30V em um único banho de 10 minutos em capela, seguidos de lavagem em água corrente, água deionizada e 5 minutos em tampão fosfato pH=7,4. Realizamos o bloqueio de ligações inespecíficas ou proteínas com um banho de 30 minutos a 37°C na estufa com leite desnatado diluído em tampão fosfato (6%). As lâminas foram lavadas três vezes em tampão fosfato com troca de cuba. As lâminas foram enxugadas, o corte foi demarcado com caneta hidrofóbica e aplicado o anticorpo anti-CD4 diluído conforme a tabela 7. A incubação foi *overnight* a 4 °C (16 horas) em câmara úmida. No dia seguinte, a câmara úmida com as lâminas foi retirada da geladeira, esperou-se a estabilização da temperatura e realizados três banhos com tampão fosfato por cinco minutos cada. O anticorpo secundário: polímero Easylink One (EasyPath) foi aplicado e incubado por 30 minutos a 37 °C em estufa. Posteriormente, foram realizados três banhos de fosfato de cinco minutos cada para a retirada do excesso de polímero, e sem seguida a revelação foi realizada com o cromógeno StayBlack peroxidase na diluição 1 µ: 10 µl (Abcam, Cambridge, Reino Unido) que possui o metal níquel com o DAB. As células imunomarcadas ficam na cor preta. As lâminas foram reveladas acompanhadas no microscópio individualmente em temperatura ambiente (Nikon®, Tóquio, Japão). O tempo da revelação foi entre 4 a 10 minutos, mas foram interrompidas conforme a avaliação da aluna com mergulho das lâminas em uma cuba com água deionizada para interromper a ação do DAB. Em seguida, foi realizado um banho de cinco minutos em tampão fosfato para a estabilização do pH do tecido nas lâminas.

Para o segundo anticorpo primário, realizamos o bloqueio de peroxidase e fosfatase com o Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent (Dako – Agilent, Santa Clara, EUA) por 15 minutos em temperatura ambiente. Esta etapa tem o objetivo de retirar qualquer resquício de peroxidase do cromógeno anterior e bloquear a fosfatase endógena para a próxima etapa. As lâminas foram banhadas em tampão fosfato por cinco minutos e incubadas com o anticorpo primário anti-CXCR3 conforme as especificações da tabela 7, por 1h a 37 °C na estufa. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes por cinco minutos em tampão fosfato e incubadas com o anticorpo secundário Link do kit Envision G2 (Dako-Agilent, Santa Clara, EUA) por 30 minutos a 37 °C na estufa, após as lâminas foram lavadas conforme a etapa anterior, e incubadas com a etapa 2 do kit “*Enhancer*” novamente por 30 minutos a 37 °C na estufa que faz a amplificação da imunomarcção. As lâminas foram lavadas três vezes por cinco minutos em tampão fosfato e a revelação foi realizada com cromógeno vermelho Permanent Red® do kit. Novamente as lâminas foram reveladas individualmente acompanhadas no microscópio em temperatura ambiente. O tempo da revelação foi entre 6 a 10 minutos, mas foram interrompidas em água deionizada conforme a avaliação da aluna. As lâminas não foram contracoradas para não atrapalhar a distinção das cores e conseqüentemente na avaliação das células que são somente CD4⁺ em relação às células duplamente imunomarcadas CD4⁺CXCR3⁺. As lâminas foram colocadas para secar em capela com fluxo laminar, e em seguida montadas com lamínula e o meio de montagem (Figura 41). Todas as reações foram realizadas com uma lâmina de tonsila faríngea ou linfonodo humano como controle positivo.

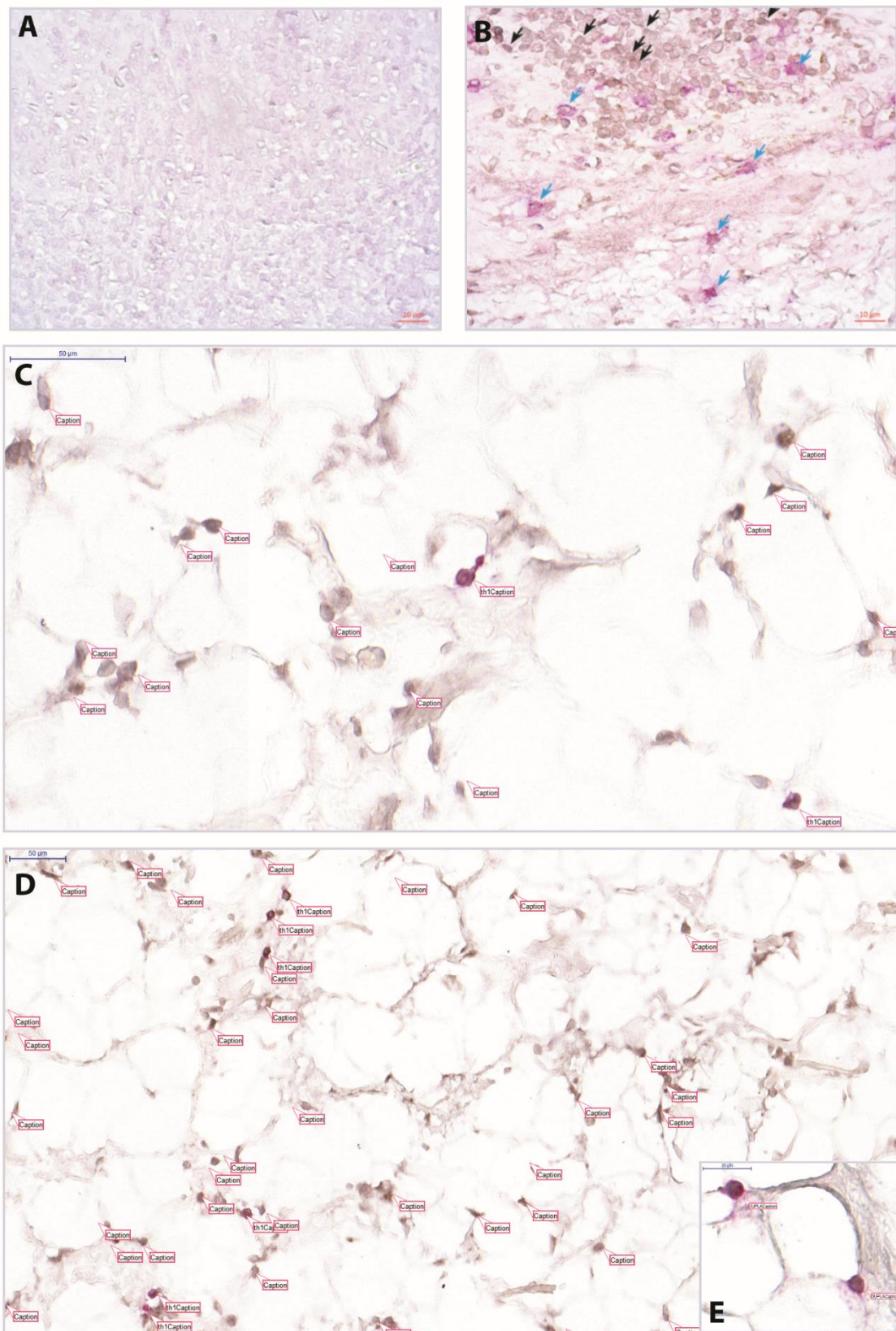


Figura 41. Linfócitos T auxiliares 1 (Th1) $CD4^{+}CXCR3^{+}$ no tecido adiposo perivascular periplaca. A: Controle negativo da imunomarcção dos linfócitos Th1 em amostra de tonsila

faríngea humana, barra da escala 10 μm ; B: Controle positivo da imunomarcção dos linfócitos Th1 em amostra de tonsila faríngea humana (setas azuis indicam dupla marcação Th1 $\text{CD4}^+\text{CXCR3}^+$ e setas pretas indicam alguns linfócitos T auxiliares (Th) $\text{CD4}^+\text{CXCR3}^-$), barra da escala 10 μm ; C: Linfócitos Th1 no tecido adiposo perivascular periplaca (seta cor-de-rosa indicando “Th1Caption”: dupla marcação para linfócitos Th1 e “Caption” indicam: marcação simples para linfócitos Th); D: Foto panorâmica com do tecido adiposo perivascular (seta cor-de-rosa indicando “Th1Caption”: dupla marcação para linfócitos Th1 e “Caption” indicam: marcação simples para linfócitos Th); E: Foto do tecido adiposo perivascular com maior aumento mostrando em detalhes os linfócitos Th1 (seta cor-de-rosa indicando “Th1Caption”: dupla marcação para linfócitos Th1).

4.7.3 Linfócitos Treg

A detecção desta linhagem foi realizada também por imuno-histoquímica de dupla marcação. Devido à particularidade da imunomarcção FoxP3 ser nuclear, não obtivemos bons resultados com os reagentes anteriores, pois os cromógenos apresentaram muito fundo. Tivemos que readaptar o protocolo com outros reagentes e realizar a permeabilização da membrana nuclear para melhorar a detecção da imunomarcção. Dessa forma, substituímos o DAB com níquel (cor preta) para DAB sem o metal níquel (cor marrom) e o Permanent Red (vermelho) foi substituído para cromógeno na cor verde e por sistema de detecção HRP pois os anticorpos primários foram produzidos em animais diferentes.

A técnica seguiu as mesmas etapas descritas anteriormente com algumas alterações: (1) todos os processos de lavagens foram realizadas com solução tampão TBST pH=7,6 (solução tampão salina com Tris) com saponina a 0,01% (Merck-Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha); (2) a solução para a recuperação dos epítomos foi feita com Tris-EDTA com pH=8,0 e o tempo de exposição (modo “cozimento”) na panela a vapor foi de 40 minutos; (3) o bloqueio foi feito com dois banhos com peróxido de hidrogênio 10V (3%); (4) banho de 15 minutos de TSBT com 0,01% de saponina para permeabilização da membrana; (5) mantivemos o bloqueio de proteínas com

solução de leite desnatado diluído em tampão fosfato (6%) e adicionamos mais um bloqueio de proteínas com Protein Block (Dako-Agilent, Santa Clara, EUA) por 10 minutos, seguida de uma lavagem de tampão TBST por cinco minutos, e após, foi feito a incubação das lâminas com o anti-FoxP3, conforme Tabela 7; (6) como o anticorpo primário foi obtido de rato, usamos o anticorpo secundário anti-rato IgG com biotina (H+L) (Vectorstain, kit ABC-HRP, Vector, Newark, Califórnia, EUA) na diluição 1 µl: 200 µl diluído no tampão TBST; (7) para a amplificação do resultado, adicionamos streptavidina peroxidase do kit ABC (Vectorstain, kit ABC-HRP, Vector, Newark, Califórnia, EUA) na diluição 1 µl solução A+ 1 µl solução B diluídos em 200 µl de tampão TBST (diluição final 2 µl: 200 µl); (8) utilizamos para a detecção de linfócitos T (T auxiliares CD4⁺ e T citotóxicos CD8⁺) o anti-CD45RO diluído conforme Tabela 8 e incubado por 1h a 37 °C na estufa; (9) realizamos a diluição do anticorpo primário CD45RO com PBS+1% de BSA. A revelação foi feita com o cromógeno verde com sistema de detecção HRP (BioSB, Santa Barbara, Califórnia, EUA) individualmente acompanhada em microscópio com duração de até 4 minutos. O restante do protocolo se manteve igual ao anterior. Todas as reações foram realizadas com uma lâmina de tonsila faríngea ou linfonodo humano como controle positivo. A técnica tem duração de 14 horas e 30 minutos. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 42.

Tabela 7. Especificação dos anticorpos utilizados na técnica de imuno-histoquímica para macrófagos.

| Anticorpo | Tipo de Anticorpo | Obtido | Clone | Marca | Diluição Padronizada | Diluído |
|-----------|----------------------|------------|----------------|--------------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| FoxP3 | Anticorpo monoclonal | Rato | PCH101 | eBioscience, ThermoFisher, EUA | 1 µl: 50 µl | Tampão TBST 0,1% saponina |
| CD45RO | Anticorpo monoclonal | Camundongo | Clone UCHL1 | Dako-Agilent, Dinamarca | 1 µl: 400 µl | Tampão PBS 1% BSA |

EUA: Estados Unidos da América.

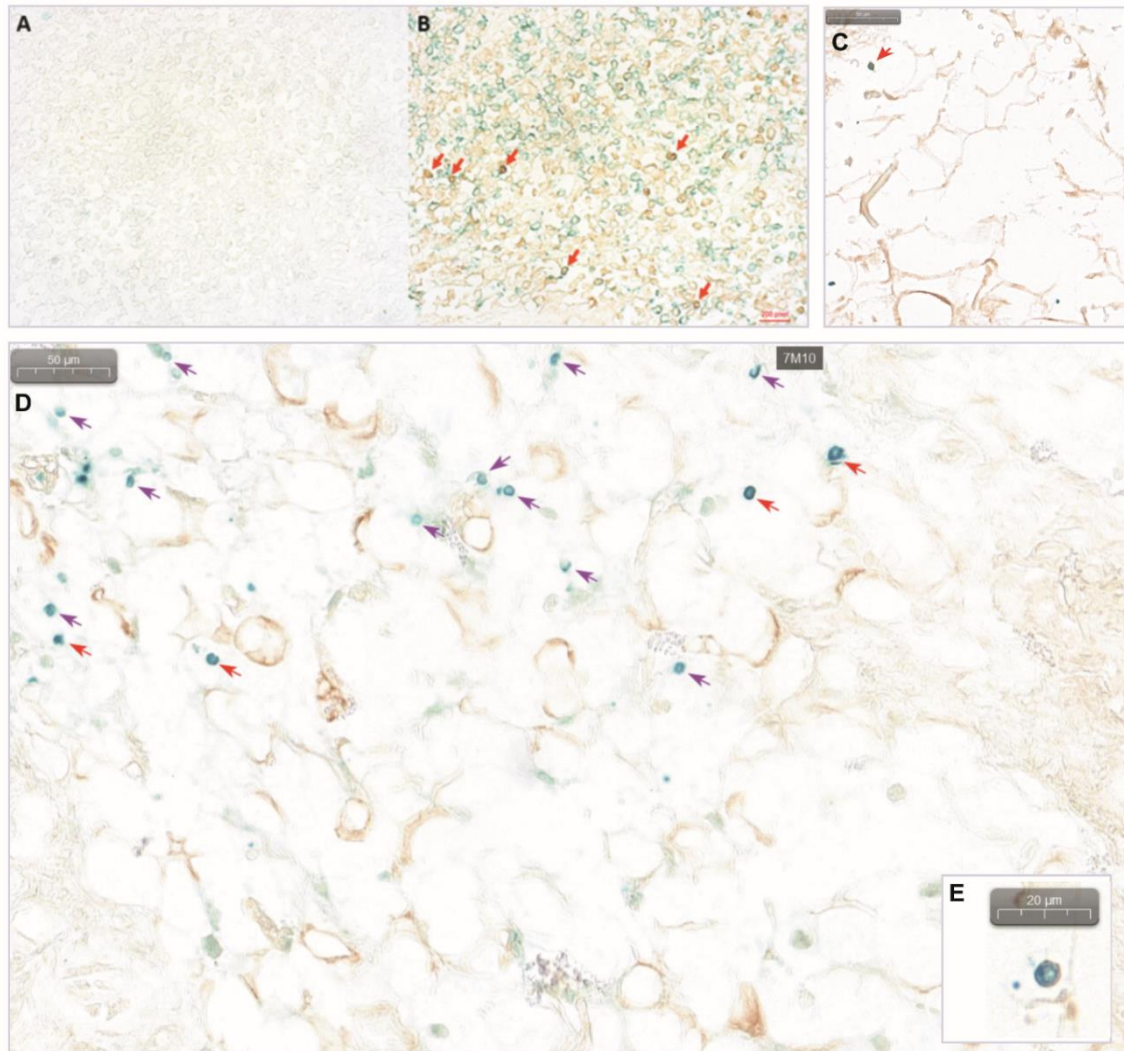


Figura 42. Linfócitos T reguladores FoxP3⁺CD45RO⁺ no tecido adiposo perivascular periplaca. A: Controle negativo da imunomarcção dos linfócitos T reguladores em amostra de tonsila faríngea humana, barra da escala 200 pixels; B: Controle positivo da imunomarcção dos linfócitos T reguladores em amostra de tonsila faríngea humana, setas vermelhas indicam dupla marcação (marrom FoxP3⁺ e verde CD45RO⁺); C: Linfócito T regulador no tecido adiposo perivascular periplaca (seta vermelha); D: Foto panorâmica do tecido adiposo perivascular com linfócitos T (setas roxas) e linfócitos T regulares (setas vermelhas) imunomarcados; E: Linfócito T regulador em tecido adiposo perivascular periplaca em maior aumento com detalhe da imunomarcção nuclear do FoxP3 (cor marrom) e marcação na membrana de superfície CD45RO⁺ (cor verde).

4.7.4 Avaliação da densidade das células imunes no TAP

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

Este processo de digitalização das lâminas permitiu uma melhor qualidade da imagem. Essa metodologia permitiu o cegamento da aluna para identificação do tecido adiposo e a identificação do participante, pois não foi necessário consultar a etiqueta da lâmina no início da quantificação, os arquivos adquirem código numérico de modo automático e não a identificação da amostra. Para visualizar a identificação do indivíduo na etiqueta da lâmina, é necessário entrar nas propriedades do arquivo no software para ter acesso à imagem. A empresa responsável pelo escaneamento gerou arquivos separados por anticorpo. Além disso, o escaneamento permitiu que os campos escolhidos não fossem sobrepostos, desse modo não era possível a mesma célula ser contada mais de uma vez.

O software Pannoramic Viewer® funciona como um microscópio virtual. Vinte campos aleatórios com diâmetro de 600 μm foram marcados para macrófagos M1 e M2 e vinte campos aleatórios de 1500 μm foram marcados para os linfócitos (Figura 43-A). O número total de células imunomarcadas dentro de cada campo foi quantificado (Figura 43-B). Ao final da análise de cada lâmina, o número total de células foi computado em um banco de dados. Os campos foram determinados em um aumento (fit) com todo o fragmento enquadrado na tela onde não era possível identificar onde estavam as células imunomarcadas, ou seja, a escolha dos campos foi feita de modo sistemático e independente da presença de células, exceto para locais onde havia grandes aglomerados possíveis de serem visualizados sob aumento menor do que 1x.

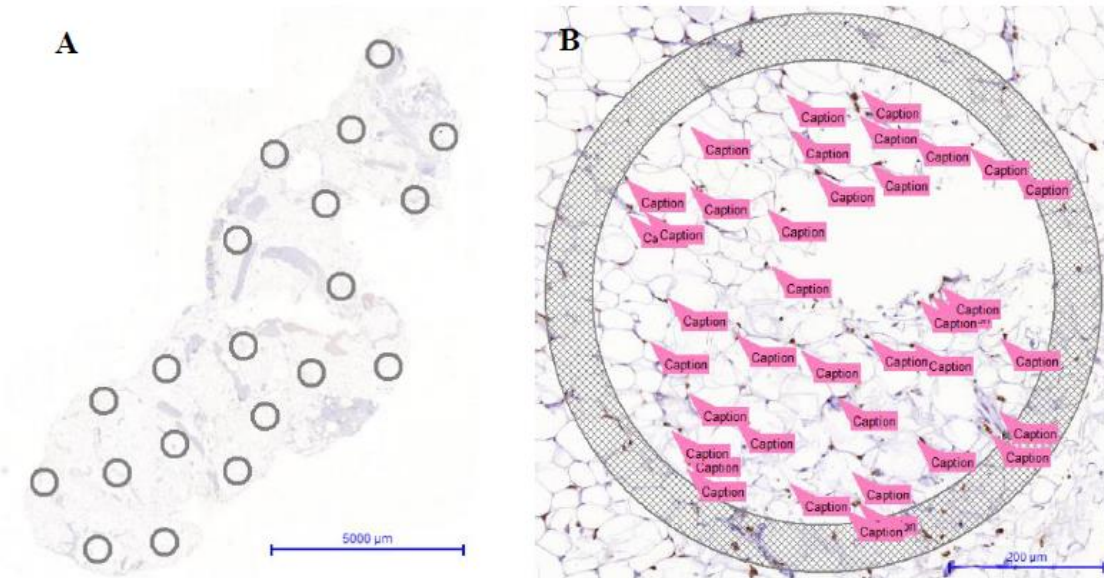


Figura 43. Demonstração da distribuição dos campos aleatórios no tecido adiposo perivascular.

Fonte: Arquivo Pessoal.

4.8 Análise Estatística

4.8.1 Cálculo do tamanho de amostra

Os estudos prévios compararam o número de leucócitos em dois grupos: indivíduos com DAC e controles. O cálculo da magnitude de efeito foi baseado em um estudo prévio,³⁴ que obteve número de leucócitos (CD45⁺) de $24 \pm 22 \text{ cm}^3$ no grupo controle e $44 \pm 21 \text{ cm}^3$ no grupo com DAC, apresentando magnitude de efeito de 0,93 calculado através do software estatístico G*Power® (Alemanha). O número total de casos necessários para o estudo foi estimado em 26 casos para cada grupo (n=78), para um alfa de 5% e poder de 90%.⁴⁴

4.8.2 Análise descritiva

Os dados clínicos e sociodemográficos foram apresentados através de dados quantitativos e dados qualitativos. Os dados quantitativos foram representados através das medidas de tendência central (média ou mediana) com as medidas de dispersão (desvio padrão ou intervalo interquartil) de acordo com a distribuição dos dados.

4.8.3 Avaliação da correlação das medidas morfométricas da aterosclerose coronariana com inflamação no TAP periplaca

A variável dependente foi a aterosclerose, avaliada pelas medidas morfométricas e o percentual dos componentes da placa de aterosclerose em relação à área da placa (variável quantitativa contínua). As variáveis independentes foram as densidades das células imunes (células $10^{-5}/\mu\text{m}^2$) e a razão das densidades da polarização na mesma linhagem celular ($M1/M2$, $Th1/Th$, $Treg/T$ e $Th1/Treg$) (variável quantitativa contínua).

A correlação foi testada através de regressão linear com erros padrões robustos (estimador Huber-White) para medidas repetidas no mesmo indivíduo (até quatro seguimentos arteriais por indivíduo: CD, TCE ou DA, e CX) quando os resíduos apresentaram distribuição Gaussiana.¹⁴² Utilizamos a análise *countfit* do pacote estatístico Stata para avaliar qual modelo era mais apropriado (regressão de Poisson ou regressão binomial negativa) quando a distribuição dos resíduos das regressões lineares não tinham distribuição Gaussiana.¹⁴³

4.8.4 Avaliação da associação da instabilidade e estabilidade das placas ateroscleróticas coronariana com inflamação no TAP periplaca

A variável dependente foi aterosclerose, classificada como placas de aterosclerose instáveis e estáveis (variável categórica). As variáveis independentes foram as densidades das células imunes (células $10^{-5}/\mu\text{m}^2$) e a razão das densidades da polarização na mesma linhagem celular ($M1/M2$, $Th1/Th$, $Treg/T$ e $Th1/Treg$) (variável quantitativa contínua). A associação foi testada através da regressão logística com erros padrões robustos (estimador Huber-White) para medidas repetidas no mesmo indivíduo.¹⁴²

Realizamos uma análise de sensibilidade estratificando a correlação das medidas morfométricas e a composição de placa de aterosclerose com a inflamação no TAP periplaca entre presença de placas ateroscleróticas instáveis e estáveis. Os testes estatísticos utilizados tiveram os mesmos critérios apresentados no subcapítulo anterior.

4.8.5 Avaliação da correlação das medidas morfométricas da aterosclerose coronariana com a diferença da inflamação entre TAP periplaca e TAP controle

A variável dependente foi a aterosclerose, avaliada pelas medidas morfométricas e o percentual dos componentes da placa de aterosclerose em relação à área da placa (variável quantitativa contínua). Na variável independente, realizamos as diferenças das densidades do mesmo grupo celular para manter uma avaliação pareada no mesmo indivíduo (M1, M2, Th1 e Treg). Cada fragmento de TAP adjacente à placa (CD, TCE ou DA, CX) foi subtraído do TAP controle no mesmo indivíduo.

Nós testamos a correlação entre as medidas morfométricas e composição de placa de aterosclerose e as diferenças das densidades entre o TAP periplaca e controle através de regressão linear com erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo (estimador Huber-White) quando os resíduos apresentaram distribuição Gaussiana.¹⁴² Utilizamos a análise *countfit* do pacote estatístico Stata para avaliar qual modelo era mais apropriado (regressão de Poisson ou regressão binomial negativa) quando a distribuição dos resíduos das regressões lineares não tinham a distribuição Gaussiana.¹⁴³ Além disso, testamos a associação das placas ateroscleróticas instáveis e estáveis com a diferença das densidades das células imunes entre o TAP periplaca e controle através da regressão logística com erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo (estimador Huber-White).¹⁴²

Realizamos as análises univariadas e multivariadas ajustadas para idade, sexo, HAS, diabetes mellitus, IMC, tabagismo, etilismo e sedentarismo para todos os modelos.⁴³ Os resultados foram apresentados com os coeficientes das regressões, intervalos de confiança de 95% e p-valor. O nível de significância foi estipulado em 5% em todos os testes bicaudais. Os pacotes estatísticos utilizados foram o Stata versão 16.0 (Stata Corp., College Station, Texas, Estados Unidos da América) e R versão 1.3.1073 (Fundação R para Computação Estatística, Viena, Áustria).

5. RESULTADOS

5.1 Análise Descritiva da Casuística

Trata-se do repositório do estudo anterior, portanto a coleta dos dados foi realizada no período de setembro de 2013 a dezembro de 2015. Dentre os 1599 possíveis participantes no SVOC-USP, no período de coleta de dados, foram incluídos 133 participantes consecutivamente. Dentre estes, sete foram excluídos por apresentar sinais de sepse na avaliação histopatológica. Reunimos uma amostra de 82 participantes. O fluxograma ilustrado na Figura 44 apresenta a entrada e saída de possíveis participantes de acordo com os critérios de elegibilidade, e também o número de amostras totais de seguimentos arteriais e TAP considerando as quatro artérias coronárias amostradas no mesmo indivíduo (i.e. CD, TCE, DA e CX).

Na análise descritiva das variáveis sociodemográficas e clínicas dos 82 participantes, encontramos uma média de idade de $69,0 \pm 14,4$ anos (mínimo 30 e máximo 94 anos). Em relação ao sexo, a amostra foi igualmente distribuída (50% para homens e mulheres) e apresentou uma maior frequência de indivíduos brancos (58%). Os participantes apresentaram baixa escolaridade (mediana de 4 anos e intervalo interquartilico entre 1-6 anos). Encontramos uma alta prevalência de HAS (74%) e diabetes mellitus (37%) e a maioria dos participantes era sedentária (68%) (Tabela 8). A maioria dos informantes convivia diariamente com o falecido (85%).

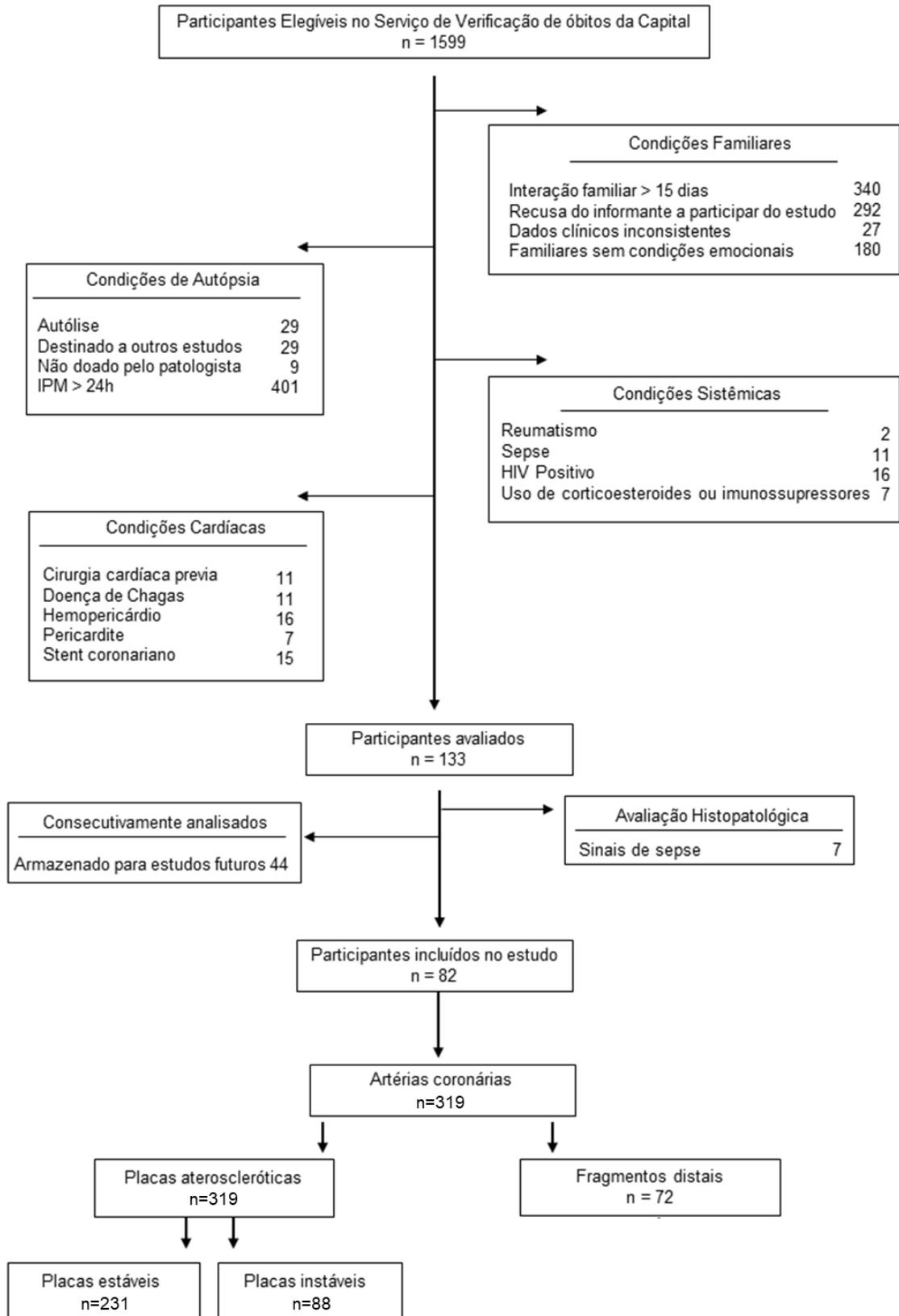


Figura 44. Fluxograma de entrada dos participantes no estudo. IPM: Intervalo post-mortem; HIV: vírus da imunodeficiência humana. Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 8. Análise descritiva das variáveis clínicas e sociodemográficas da amostra (n=82 participantes), São Paulo, 2013-2015.

| Variáveis | Total |
|---|--------------|
| Idade (anos), média (DP) | 69,0 (14,4) |
| Sexo Feminino, n (%) | 41 (50,0) |
| Cor, n (%) | |
| . Branca | 48 (58,5) |
| . Não branca | 34 (41,5) |
| Escolaridade (anos), mediana (ITQ) | 4 (1-6) |
| HAS, n (%) | 61 (74,4) |
| Diabetes, n (%) | 30 (36,6) |
| Sintomas de DAC, n (%) | 10 (12,2) |
| Insuficiência Cardíaca, n (%) | 19 (23,2) |
| AVC, n (%) | 10 (12,2) |
| Dislipidemia, n (%) | 14 (17,1) |
| IMC, média (DP) | 24,4 (5,8) |
| Sedentarismo, n (%) | 56 (68,3) |
| Tabagismo, n (%) | |
| . Sim | 12 (14,6) |
| . Não | 70 (85,4) |
| Uso de álcool, n (%) | |
| . Sim | 24 (29,3) |
| . Não | 58 (70,7) |




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

5.2 Macrófagos Polarizados no TAP e Aterosclerose Coronariana

Os resultados e discussão da análise descritiva das medidas morfométricas e dos componentes da placa de aterosclerose nas artérias coronárias, como também da associação da polarização de macrófagos no TAP com as medidas morfométricas e dos componentes da placa de aterosclerose nas artérias coronárias são apresentados no manuscrito a seguir publicado recentemente no periódico *Journal of the American Heart Association* (Qualis A1, fator de impacto= 5.501 no ano de 2022, e ranking 35/142 no ano de 2020 na categoria *Cardiac and Cardiovascular Systems* pelo Relatório das Citações dos Periódicos realizado pelo Instituto para Informação Científica).

ORIGINAL RESEARCH

Macrophage Polarization in the Perivascular Fat Was Associated With Coronary Atherosclerosis

Daniela Souza Farias-Itao , BSN, MSc; Carlos Augusto Pasqualucci, MD, PhD; Renato Araújo de Andrade, BE, PSM; Luiz Fernando Ferraz da Silva, MD, PhD; Maristella Yahagi-Estevam, BPT; Sílvia Helena Gelas Lage , MD, PhD; Renata Elaine Paraízo Leite, BPT, PhD; Alexandre Brincalpe Campo, BE, PhD; Claudia Kimie Suemoto , MD, MSc, PhD

BACKGROUND: Inflammation of the perivascular adipose tissue (PvAT) may be related to atherosclerosis; however, the association of polarized macrophages in the pericoronary PvAT with measurements of atherosclerosis components in humans has not been fully investigated.

METHODS AND RESULTS: Coronary arteries were dissected with surrounding PvAT. We evaluated the percentage of arterial obstruction, intima-media thickness, fibrous cap thickness, plaque components, and the number of vasa vasorum. The number of proinflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) macrophages in the periplate and control PvAT were evaluated using immunohistochemistry. Regression models adjusted for sociodemographic and clinical variables were used. In 319 segments from 82 individuals, we found a correlation of the M1/M2 macrophage density ratio with an increase in arterial obstruction ($P=0.02$) and lipid content ($P=0.01$), and a decrease in smooth muscle cells ($P=0.02$). M1 and the ratio of M1/M2 macrophages were associated with an increased risk of thrombosis ($P=0.03$). In plaques with thrombosis, M1 macrophages were correlated with a decrease in fibrous cap thickness ($P=0.006$), an increase in lipid content ($P=0.008$), and the number of vasa vasorum in the adventitia layer ($P=0.001$). M2 macrophages were correlated with increased arterial obstruction ($P=0.01$), calcification ($P=0.02$), necrosis ($P=0.03$) only in plaques without thrombosis, and decrease of the number of vasa vasorum in plaques with thrombosis ($P=0.003$).

CONCLUSIONS: M1 macrophages in the periplate PvAT were associated with a higher risk of coronary thrombosis and were correlated with histological components of plaque progression and destabilization. M2 macrophages were correlated with plaque size, calcification, necrotic content, and a decrease in the number of vasa vasorum in the adventitia layer.

Key Words: atherosclerosis ■ coronary artery disease ■ inflammation ■ macrophages ■ pericoronary adipose tissue

Atherosclerosis is the main cause of cardiovascular diseases, accounting for 85% of cardiovascular disease deaths.¹ Among them, coronary heart disease is the main disease (42%) and has increased in recent years despite a decline from 1980 to 2010.² Atherosclerosis has complex pathophysiology, with an intense biochemical activity that is modulated by several risk factors. Among them, inflammation plays

a central role.³ In the last decade, inflammation in the perivascular adipose tissue (PvAT) has been linked to development and severity of coronary atherosclerosis. PvAT comes into direct contact with the adventitia layer and other characteristics, making it the ideal environment for the recruitment of immune cells.⁴

In animal models, inflammation in the PvAT was related to the percentage of arterial obstruction,

Correspondence to: Daniela Souza Farias-Itao, BSN, MSc, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 455 Avenida Doutor Arnaldo, Sala 1355, 01246-903, São Paulo, Brazil. E-mail: dsfarias@usp.br

Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/JAHA.121.023274>

For Sources of Funding and Disclosures, see page 11.

© 2022 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

JAHA is available at: www.ahajournals.org/journal/jaha

CLINICAL PERSPECTIVE

What Is New?

- Proinflammatory macrophages in the perivascular adipose tissue were associated with higher thrombosis risk and plaque destabilization.
- Proinflammatory phenotype was correlated with the decrease of fibrous cap thickness and directly correlated with the increase of lipid area and the number of vasa vasorum in the adventitia layer.
- In plaques without thrombosis, anti-inflammatory macrophages were associated with arterial obstruction, calcification, and necrotic content.

What Are the Clinical Implications?

- This translational study suggests mechanisms of how polarized macrophages in the perivascular adipose tissue are related to coronary atherosclerosis and plaque.
- Currently, clinical trials are testing whether immunological agents could prevent or block atherosclerotic plaque development.
- Immunological agents that act in the inflammatory pathway between proinflammatory macrophages in the perivascular adipose tissue and coronary atherosclerosis may be promising therapeutic options.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

| | |
|-------------|---------------------------------|
| APA | atherosclerotic plaque analyzer |
| FCT | fibrous cap thickness |
| IMT | intima-media thickness |
| NOK | next of kin |
| PvAT | perivascular adipose tissue |
| SMC | smooth muscle cell |

intima-media thickness (IMT), lipid-rich plaque, and the presence of atherothrombosis. Moreover, macrophage infiltration in the PvAT preceded atherosclerotic plaque formation in other animal studies.^{5,6} In humans, macrophage infiltration in the coronary PvAT was associated with CAD (coronary artery disease).⁷⁻¹³ The inflammation mediated by polarized macrophages in the coronary PvAT was higher in patients with CAD in comparison with other areas (eg, aorta, internal thoracic artery, and saphenous vein).^{12,14} However, these studies did not evaluate plaque composition or plaque instability.⁷⁻¹¹ We previously demonstrated that macrophages in the periplaque PvAT in coronary arteries

were associated with the percentage of arterial obstruction and with the presence of unstable plaques. These associations were greater in periplaque PvAT than in control PvAT, but the phenotype predominance remains unclear.¹³ Proinflammatory macrophages (M1) in the PvAT were more frequent among patients with CAD,^{7,8} but another study found no association.¹¹ The association of anti-inflammatory macrophages (M2) with CAD also showed mixed results.⁸⁻¹¹ The ratio of M1 to M2 macrophages, a marker of the proinflammatory state, was higher in patients with CAD and was correlated with atherosclerosis severity.^{9,10} However, it remains unknown whether macrophage polarization in the PvAT is correlated with plaque components and size in humans.

Therefore, we investigated the association of macrophage polarization in the surrounding PvAT with the atherosclerotic plaque components and morphometric measurements in human coronary arteries from individuals who submitted to a full-body autopsy.

METHODS

This study was approved by the local ethics committee and followed the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. Data are stored in the REDCap electronic data capture tool¹⁵ hosted at the University of Sao Paulo Medical School. Data access is available upon request to the corresponding author. Details of the methodology were previously published.¹⁶

Selection of Subjects

In Brazil, an autopsy is mandatory in cases where the cause of death is unknown. The Sao Paulo Autopsy Service of the University of Sao Paulo performs around 14 000 autopsies a year and is the reference institution for identifying the causes of nontraumatic deaths in the metropolitan region of Sao Paulo.¹⁷ Eligible subjects were selected prospectively between 2013 to 2015. The next of kin (NOK) of the deceased were invited by the team of nurses/gerontologists to participate in this study. The participants were asked to sign an informed consent form and respond to a semistructured interview.¹⁷ The criteria for inclusion were: age at death of 30 years or older, postmortem interval of <24 hours, informed consent form accepted and signed by the NOK, and daily or weekly interaction between the NOK and the deceased at least 6 months before the death to provide accurate clinical data. Exclusion criteria were NOK unable to answer the questions of the semistructured interview, fixation of PvAT >72 hours prior, heart with signs of autolysis, heart disease attributable to local inflammation (eg hemopericardium, presence of a stent), previous cardiac surgery, immunosuppression by drugs/radiotherapy, autoimmune diseases, a

site with a myocardial bridge, and the presence of sepsis or systemic inflammation detected through biopsy of main organs.¹⁶

Clinical Data Evaluation

We used the following demographic data: age at death, sex, race categorized as White or Black and Asian reported by the NOK and confirmed from the photograph on an official government document, level of education, and frequency of interaction between the NOK and the deceased.

The medical history included hypertension, diabetes, dyslipidemia, stroke, heart failure, smoking (never/previous or current), physical activity (domestic, work, or leisure physical activities at least 3 times a week), and alcohol consumption (never/previous or current). The presence of coronary artery disease was considered positive if the NOK reported a previous diagnosis of CAD, myocardial infarction, angioplasty, frequent chest pain, or coronary bypass surgery. We also investigated current and previous surgeries, medication, and other diseases.¹⁷ The body mass index was calculated by direct measurements of height using a stadiometer and weight using an electronic scale, with the deceased in the supine position without clothes or shoes.

Material Processing

Fresh hearts were collected and washed under running water, and the coronary arteries were filled with agar to avoid collapse. Next, the right coronary artery, trunk of the left coronary artery, left anterior descending artery, and left circumflex artery were dissected with 10 mm of surrounding PvAT. The PvAT was then removed from the coronary arteries at regular intervals of 15 mm and identified to match with the arterial segments. The PvAT was fixed by immersion in buffered paraformaldehyde at pH 7.2 to 7.4 for at least 24 hours and up to 72 hours, and the coronary arteries were immersed for at least 5 days. Next, both the PvAT and coronary artery fragments were immersed in paraffin, sliced lengthwise at 4 μ m intervals, and mounted on silanized slides (3-aminopropyl triethoxysilane; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).¹⁶

Evaluation of Polarized Macrophages in the PvAT

Based on Hirata et al,⁹ we identified M1 and M2 macrophages using an immunohistochemistry technique, as follows: (1) deparaffinization in hot xylene; (2) hydration with absolute, 95%, and 70% alcohol; (3) induction of antigenic recovery by heat in a pressure cooker with citric acid (10 mmol/L and pH 6.0); (4) blocking of endogenous peroxidase with a 3% hydrogen peroxide

10 volume; (5) incubation with primary antibodies diluted in phosphate buffer with 1% of bovine serum albumin at 4 °C overnight (M1 macrophages: rabbit monoclonal anti-C11c, EP1347Y, 1 μ L: 400 μ L; Abcam, Cambridge, United Kingdom) and (M2 macrophages: mouse monoclonal anti-CD206, 5C11, 1 μ L:1500 μ L; Abnova, Taiwan); (6) incubation with secondary antibody (Easylink One polymer HRP-conjugated streptavidin (HRP, horseradish peroxidase enzyme); EasyPath); (7) revelation with diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany); and (8) counter-staining with hematoxylin-eosin (Merck, Darmstadt, Germany). We used the pharyngeal tonsils as positive and negative control (Figure S1).¹⁶

The slides were scanned with Panoramic Scan (Panoramic Scan 250 Flash III; 3DHISTECH, Budapest, Hungary) and analyzed with a Panoramic Viewer virtual microscope (3DHISTECH), in which 20 fields, 600 μ m in diameter, were randomly distributed without magnification. The cells were counted by a rater (D.S.F.-I.) who was blinded to the identification of the coronary artery fragment.¹⁶

Evaluation of Coronary Artery Atherosclerosis

During the macroscopic evaluation, one fragment was selected from each of the main arteries with signs of instability.¹⁸ In the absence of plaque instability, we selected the greater luminal narrowing together with the periplaque PvAT. Additionally, one segment, distal to the plaques and without macroscopic atherosclerosis, was selected with the adjacent PvAT (control PvAT). These macroscopic segments were photographed with a stereomicroscope (SMZ 1000; Nikon, Tokyo, Japan). The segment was immersed in paraffin, cut in 4- μ m slices, and stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome, and Verhoeff (Data S1).

We then photographed each stained slide. We created the software program using LabView Ambiance (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench; National Instruments, Austin, TX) to evaluate the images of the coronary arteries. The atherosclerotic plaque analyzer (APA) aims to identify and delimit the components of the atherosclerotic plaque and other morphometric measurements using the photos of the stained slides. The APA gathers this information and propagates information from one stain to another. The APA can correct the background to remove shadows, localize the artery, calibrate the scale bar to real size, convert the scale bar to millimeters or micrometers, contour the lumen and internal elastic lamina in Verhoeff stain automatically,¹⁹ and calculate the fibrous cap and IMT. All of these steps are performed automatically, then checked by the researcher. The APA calculates the percentage of arterial obstruction using

the formula: area delimited by the internal elastic lamina minus the area delimited by the lumen, divided by the area delimited by the internal elastic lamina, and then multiplied by 100.²⁰ The IMT was calculated by the distance between the lumen and the external elastic lamina.²¹ We considered the mean distance throughout the circumference of the lesion. Fibrous cap thickness (FCT) was measured at the thinnest distance.²² The APA also calculates the percentage of the plaque area that was occupied by the lipid core, necrotic core, calcifications, healed area, intraplaque hemorrhage, collagen, smooth muscle cell (SMC), and fibrous cap. We also counted the number of vasa vasorum in the 3 layers of the artery. These measurements were continuous variables. We validated the lumen and internal elastic lamina measured by the APA compared with the measurements of an experienced researcher (D.S.F.-I.). We found 94% agreement for the lumen (Figure S2A) and internal elastic lamina (Figure S2B). The atherosclerotic plaques were classified as stable or unstable (ie, luminal thrombosis/healed component of the previous thrombosis and intraplaque hemorrhage).¹⁸

Statistical Analysis

The clinical and sociodemographic data were reported as average \pm SD or median and interquartile interval, according to the variable distribution. The categorical variables were presented as absolute and relative frequencies. We compared the plaque composition according to thrombosis and hemorrhage status using regression models with robust SE for repeated measures in the same individual (4 arterial segments per person) using Huber-White sandwich estimators.²³ We considered, as dependent variables, the percentage of atherosclerotic plaque components and morphometric measures (continuous variable) and the instability classification (categorical variable). The independent variables were the densities of M1, M2, and the ratio of M1 to M2 macrophages in the periplaque PvAT (continuous variable).

We tested the correlation of atherosclerosis components and morphometric measures with macrophage densities, using linear regression with robust SE for repeated measures in the same individual when the regression residuals had Gaussian distribution. In cases where this assumption did not hold, we use the countfit analyses in Stata to identify which test would be more appropriate, Poisson's regression or negative binomial regression.²⁴ We also tested the association between the densities of polarized macrophages adjacent to stable and unstable atherosclerotic plaques, using logistic regression with robust SEs for repeated measures. We compared the macrophage densities between periplaque and control PvAT by subtracting the respective densities of these sites. The

association of these differences with atherosclerotic components and morphometric measurements was performed using the same models described above. We adjusted the models for age, sex, hypertension, diabetes, smoking, alcohol consumption, physical inactivity, and body mass index. We also tested the correlation of components of the atherosclerotic plaque and morphometric measurements with the densities of polarized macrophages stratified by plaque instability as sensitivity analyses. The Stata 16.0 (StataCorp, College Station, TX) and R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) programs were used to perform the statistical analyses. The α level was 0.05 in 2-tailed tests.

RESULTS

Subjects

We collected 319 fragments of coronary atherosclerosis from 82 individuals. The mean age was 69.0 \pm 14.4 years; 50% were women, 58% were White, and the median level of education was 4 years (interquartile range, 1–6 years). Hypertension (54%) and diabetes (36%) were the most common diseases. Only 12% of the individuals had received a previous diagnosis of CAD or stroke. The most prevalent cardiovascular risk factor was physical inactivity (68%) (Table S1).

Coronary Atherosclerosis

The coronary artery had an average 54 \pm 26% of lumen obstruction. We also observed a mean of 43 \pm 23% arterial obstruction in stable plaques, 65 \pm 16% in plaques with hemorrhage, and 99 \pm 3% in plaques with thrombosis (Figure S3A). The average FCT was 24.7 \pm 29.7 μ m in the thinnest portion (Figure S3C). The highest number of vasa vasorum was observed in the adventitia layer (Figure S3D through S3F). As for plaque composition, the most prevalent content was SMC, with an average of 33 \pm 44% of the plaque area occupied by SMC, followed by lipid (23 \pm 19%), collagen (22 \pm 22%), fibrous cap (16 \pm 9%), calcification (7 \pm 15%), and necrosis (3 \pm 11%) (Figure S4).

Were Polarized Macrophages in the PvAT Correlated With Components of Atherosclerosis?

In the adjusted analysis, the M1 macrophage density in the periplaque PvAT was related to an increase in plaque size (β , 1.44 [95% CI, 0.33–2.54]; $P=0.01$) and IMT (β , 13.61 [95% CI, 2.06–25.17]; $P=0.02$). Also, the M1 macrophage density in the periplaque PvAT was related to a decrease in SMC area (β , –3.29 to –0.27; $P=0.02$) and a decrease in FCT (β , –0.30 [95% CI, –0.59 to –0.01]; $P=0.03$) (Table 1).

Table 1. Correlation of the M1 CD11c⁺ Macrophage Density in the Periplaque Perivascular Adipose Tissue With Coronary Artery Atherosclerosis (n=319 Arterial Segments)

| M1 CD11c ⁺ macrophages density, cell 10 ⁻⁵ /μm ² | Unadjusted model | | | Adjusted model* | | |
|---|------------------|------------------|---------|-----------------|----------------|---------|
| | Coefficient | 95% CI | P value | Coefficient | 95% CI | P value |
| Arterial obstruction, % [†] | 1.56 | 0.63 to 2.49 | 0.001 | 1.44 | 0.33 to 2.54 | 0.01 |
| IMT, μm [†] | 15.40 | 4.67 to 26.13 | 0.005 | 13.61 | 2.06 to 25.17 | 0.02 |
| Collagen, % [†] | 0.55 | -0.05 to 1.16 | 0.07 | 0.36 | -0.39 to 1.12 | 0.33 |
| Smooth muscle cell, % [†] | -2.11 | -3.39 to -0.83 | 0.002 | -1.78 | -3.29 to -0.27 | 0.02 |
| Fibrous cap, % [†] | -0.31 | -0.56 to -0.06 | 0.01 | -0.30 | -0.59 to -0.01 | 0.03 |
| Minimum FCT, μm [†] | 0.03 | -0.97 to 0.89 | 0.93 | 0.13 | -0.80 to 1.08 | 0.76 |
| Calcification, % [‡] | 0.05 | -0.00004 to 0.10 | 0.05 | 0.07 | -0.01 to 0.16 | 0.11 |
| Lipid, % [†] | 0.66 | -0.03 to 1.35 | 0.06 | 0.60 | -0.20 to 1.41 | 0.14 |
| Necrosis, % [†] | 0.06 | -0.05 to 0.18 | 0.29 | 0.02 | -0.10 to 0.15 | 0.72 |
| Intraplaque hemorrhage, % [†] | -0.07 | -0.19 to 0.04 | 0.23 | -0.002 | -0.14 to 0.13 | 0.96 |
| Vasa vasorum intima layer, n [§] | -0.04 | -0.15 to 0.07 | 0.50 | -0.05 | -0.15 to 0.04 | 0.27 |
| Vasa Vasorum media layer, n [§] | 0.003 | -0.08 to 0.09 | 0.94 | -0.03 | -0.11 to 0.05 | 0.46 |
| Vasa vasorum adventitia layer, n [§] | 0.01 | -0.02 to 0.05 | 0.42 | 0.01 | -0.02 to 0.06 | 0.43 |

FCT indicates fibrous cap thickness; and IMT, intima-media thickness.

*Adjusted for age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol use, and smoking.

[†]Linear regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

[‡]Negative binomial regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

[§]Poisson regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

Similarly, M2 macrophage density in the periplaque PvAT was associated with arterial obstruction in the coronary arteries (β , 0.77 [95% CI, 0.12–1.42]; $P=0.02$) and IMT (β , 9.09 [95% CI, 1.54–16.63]; $P=0.01$). The increase in M2 macrophage density in the periplaque PvAT was also correlated with an increase in plaque calcification (β , 0.09 [95% CI, 0.01–0.18]; $P=0.03$) (Table S2).

The M1/M2 ratio, which identifies the more frequent inflammatory profile, showed that M1 was more frequent than M2 in the presence of arterial obstruction. Each increase in the M1/M2 ratio was related to an average 9% increase in arterial obstruction (β , 9.15 [95% CI, 1.44–16.87]; $P=0.02$). In addition, the increase of proinflammatory state in the periplaque PvAT was correlated with a higher lipid content in the atherosclerotic plaque (β , 6.89 [95% CI, 1.14–12.64]; $P=0.01$) and a higher number of vasa vasorum in the adventitia layer (β , 0.29 [95% CI, 0.05–0.53]; $P=0.01$). On the other hand, the proinflammatory state was related to a decrease in SMC content (β , -12.25 [95% CI, -22.88 to -1.62]; $P=0.02$) (Table 2).

Were Polarized Macrophages in the Pericoronary PvAT Associated With Unstable Atherosclerotic Plaques?

A greater density of M1 proinflammatory macrophages in the periplaque PvAT was associated with an increased risk of thrombosis (odds ratio [OR], 1.11 [95% CI, 1.10–1.23]; $P=0.03$) (Figure, Table S3). Corroborating

this finding, the proinflammatory profile was predominant over anti-inflammatory macrophages. For each unit increase in M1/M2 ratio, there was a 1.95 times higher risk of thrombosis (OR, 1.95 [95% CI, 1.05–3.61]; $P=0.03$) (Figure, Table S3). In atherosclerotic plaques with thrombus, the M1 macrophage density in the periplaque PvAT (β , 0.02 [95% CI, 0.01–0.07]; $P=0.02$) and the M1/M2 ratio density in the periplaque PvAT (β , 0.30 [95% CI, 0.12–0.49]; $P=0.001$) were associated with an increase in the number of vasa vasorum in the adventitia layer. Additionally, in plaques with thrombus, the increase in the number of vasa vasorum in the adventitia layer was associated with a decrease in the number of M2 macrophages (β , -0.03 [95% CI, -0.05 to -0.01]; $P=0.003$). Alternatively, there was no association between intraplaque hemorrhage in the coronary arteries and the density of M1 and M2 macrophages in the periplaque PvAT, or with the M1/M2 ratio (Figure S5, Table S3).

Are These Associations Only Adjacent to Atherosclerotic Plaques, or Are They Diffusely Distributed in the Cardiac Fat?

When the difference in macrophage densities between the periplaque PvAT and the control PvAT is large, this means that the macrophage density in the periplaque PvAT is greater than in the control PvAT in the same individual. A greater M1 difference was correlated with greater collagen content in atherosclerotic plaques (β , 0.92 [95% CI, 0.05–1.78]; $P=0.03$) (Figure S6). We

Table 2. Correlation Between M1 CD11c⁺/M2 CD206⁺ Macrophage Ratio in the Periplaque Perivascular Adipose Tissue With Coronary Artery Atherosclerosis (n=319 Arterial Segments)

| Ratio of M1 CD11c ⁺ / M2 CD206 ⁺ macrophages density, cell 10 ⁻⁵ /μm ² | Unadjusted model | | | Adjusted model* | | |
|--|------------------|------------------|---------|-----------------|------------------|---------|
| | Coefficient | 95% CI | P value | Coefficient | 95% CI | P value |
| Arterial obstruction, % [†] | 8.30 | 0.80 to 15.80 | 0.03 | 9.15 | 1.44 to 16.87 | 0.02 |
| IMT, μm [†] | 51.52 | -32.92 to 135.97 | 0.22 | 64.21 | -21.07 to 149.50 | 0.13 |
| Collagen, % [†] | 2.30 | -2.60 to 7.22 | 0.35 | 3.56 | -2.12 to 9.24 | 0.21 |
| Smooth muscle cell, % [†] | -9.64 | -19.6 to 0.39 | 0.06 | -12.25 | -22.88 to -1.62 | 0.02 |
| Fibrous cap, % [†] | -2.78 | -4.68 to -0.88 | 0.005 | -2.98 | -5.06 to -0.89 | 0.006 |
| Minimum FCT, μm [†] | 2.01 | -4.99 to 9.02 | 0.56 | 2.14 | -5.39 to 9.69 | 0.57 |
| Calcification, % [‡] | 0.31 | -0.33 to 0.97 | 0.34 | 0.21 | -0.57 to 1.01 | 0.58 |
| Lipid, % [†] | 6.15 | 0.87 to 11.43 | 0.02 | 6.89 | 1.14 to 12.64 | 0.01 |
| Necrosis, % [‡] | 0.02 | -1.02 to 1.06 | 0.96 | -0.35 | -1.37 to 0.66 | 0.49 |
| Intraplaque hemorrhage, % [‡] | -0.54 | -1.49 to 0.39 | 0.25 | -0.30 | -0.99 to 0.38 | 0.38 |
| Vasa vasorum intima layer, n [§] | 0.005 | -0.69 to 0.70 | 0.98 | -0.01 | -0.62 to 0.58 | 0.95 |
| Vasa Vasorum media layer, n [§] | -0.09 | -0.82 to 0.62 | 0.78 | -0.07 | -0.82 to 0.66 | 0.83 |
| Vasa vasorum adventitia layer, n [§] | 0.24 | 0.01 to 0.47 | 0.03 | 0.29 | 0.05 to 0.53 | 0.01 |

FCT indicates fibrous cap thickness; and IMT, intima-media thickness.

*Adjusted for age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol consumption, and smoking.

[†]Linear regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

[‡]Negative binomial regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

[§]Poisson regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

found no differences between M1 macrophages in the periplaque and control PvAT in association with other coronary atherosclerosis components (Figure S7). Additionally, we found no differences between M2 macrophages in the periplaque and control PvAT in association with coronary atherosclerosis components (Figure S8). However, greater M2 macrophage density difference was related to greater IMT (β , 11.76 [95% CI, 1.43–22.09]; $P=0.02$) and to a decrease in the number of vasa vasorum in the adventitia layer (β , -0.03 [95% CI, -0.05 to -0.005]; $P=0.01$) (Figure S9).

Is There a Difference in the Association Between the Density of Polarized Macrophages in the PvAT and Atherosclerotic Components According to the Presence of Thrombosis?

In the atherosclerotic plaques with thrombosis, only M1 macrophage associations were significant. The increase in M1 macrophage density in the periplaque PvAT was related to a decrease in fibrous cap area (β , -1.03 [95% CI, -1.99 to -0.08]; $P=0.03$) and an increase in the number of vasa vasorum in the adventitia layer (β , 0.03 [95% CI, 0.01–0.07]; $P=0.02$) (Table 3). In atherosclerotic plaques without thrombosis, most associations with M2 macrophages were significant and were associated with greater arterial obstruction (β , 0.69 [95% CI, 0.11–1.27]; $P=0.01$), greater calcification (β , 0.10 [95% CI, 0.01–0.19]; $P=0.02$), and greater

necrosis content (β , 0.20 [95% CI, 0.01–0.38]; $P=0.03$). The only association found in plaques with thrombosis was a decrease in the number of vasa vasorum in the adventitia layer (β , -0.003 [95% CI, -0.05 to -0.01]; $P=0.003$) (Table 4).

The proinflammatory state was predominantly associated with components and measurements in plaques with thrombosis. The greater M1/M2 macrophages ratio was associated with a decrease in FCT (β , -6.18 [95% CI, -10.39 to -1.97]; $P=0.006$), an increase in lipid content (β , 11.07 [95% CI, 3.25–18.88]; $P=0.008$), and an increase in the number of vasa vasorum in the adventitial layer (β , 0.30 [95% CI, 0.12–0.49]; $P=0.001$). On the other hand, a proinflammatory state was associated with a smaller necrosis content (β , -3.45 [95% CI, -6.41 to -0.50]; $P=0.02$) (Table 5).

DISCUSSION

Coronary atherosclerosis was mainly associated with proinflammatory macrophages in the periplaque PvAT. M1 macrophages in the periplaque PvAT were correlated with an increase in plaque size, lipid content, and the number of vasa vasorum in the adventitia layer, and with a decrease in SMC content in the atherosclerotic plaques. Also, M2 macrophages in the periplaque PvAT were correlated with an increase in plaque size and calcification content. As for differences in the density of polarized macrophages in the periplaque PvAT and the control PvAT, we found that M1 macrophages

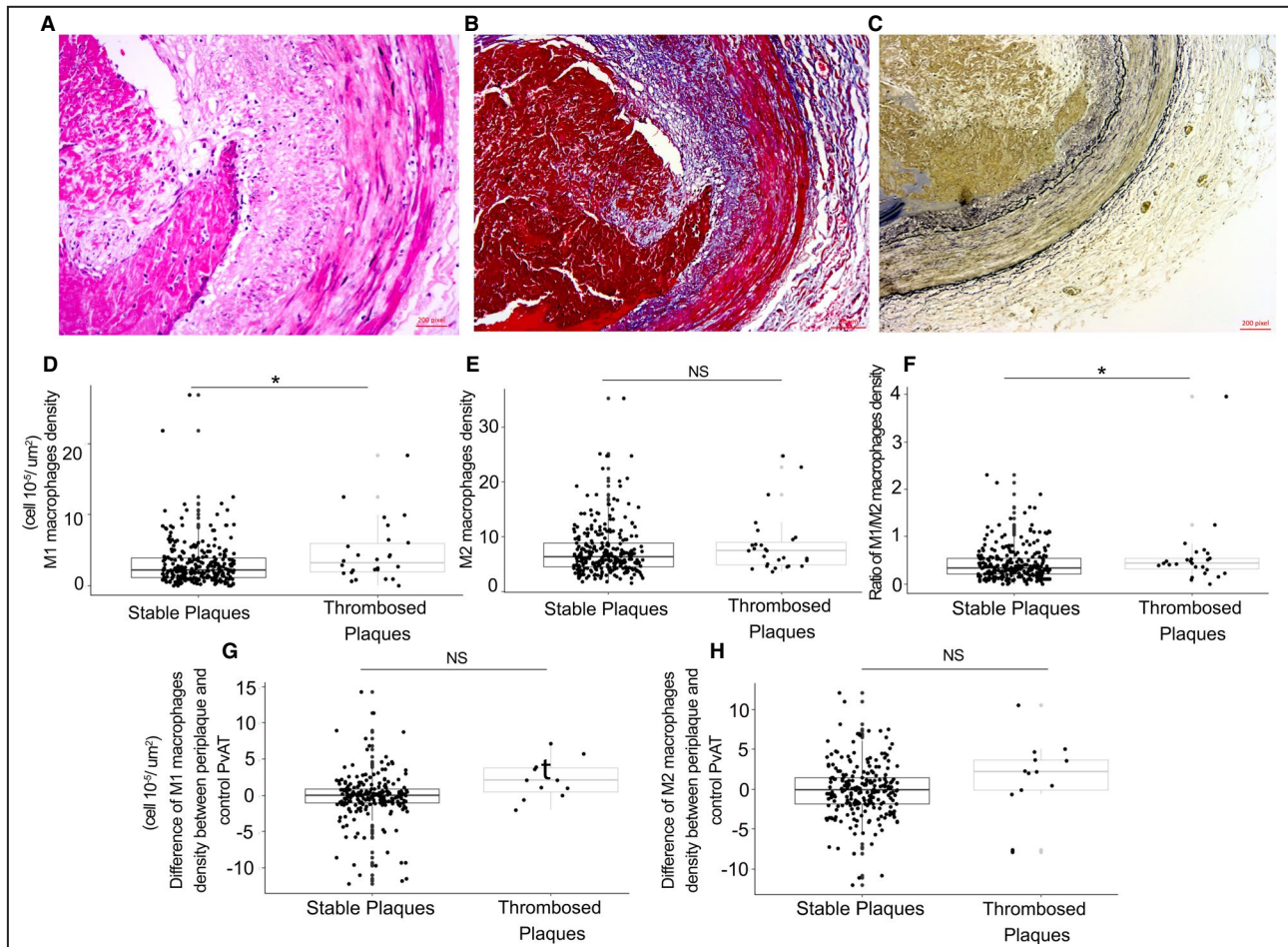


Figure. Association between the polarized macrophage density in the periplaque perivascular adipose tissue (PvAT) and unstable atherosclerotic plaques (n=319 arterial segments).

A, Atherosclerotic plaque with the presence of thrombus, hematoxylin-eosin stain. **B**, Atherosclerotic plaque with the presence of thrombus, Masson's Trichrome stain. **C**, Atherosclerotic plaque with the presence of thrombus, Verhoeff stain. **D** through **H**, Association between the density of polarized macrophages in the periplaque PvAT and atherosclerotic plaques with thrombosis. Linear regression adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors. *, significant result. NS, non-significant result.

in the periplaque PvAT were associated with greater collagen content, whereas M2 macrophages in the periplaque PvAT were related to greater IMT. The M1/M2 ratio showed a predominance of the proinflammatory over the anti-inflammatory profile. Additionally, M1 macrophage density in the periplaque PvAT was associated with an increased risk of coronary thrombosis. M1 macrophages were related to characteristics of atherosclerotic plaque destabilization, such as an increase in lipid content and the number of vasa vasorum, and a decrease in the necrotic content and FCT. In contrast, the anti-inflammatory macrophage profile was predominant in plaques without thrombosis and was associated with an increase in arterial obstruction, calcification, and necrotic content.

We found that the atherosclerosis development was associated with macrophages that expressed a proinflammatory profile, whereas the anti-inflammatory profile was related to plaque stabilization. Our results

are in agreement with previous studies with human biopsy samples that found a predominance of proinflammatory macrophages in patients with CAD.⁷⁻¹⁰ Only one study did not find any difference in the number of polarized macrophages between patients with CAD and controls, which could be explained by the differences in sample size and the number of analyzed fields quantified.¹¹ Similarly, studies in animal models found an increase in plaque size, IMT, and lipid content in the presence of macrophages. Moreover, the transplantation of visceral PvAT next to carotid arteries led to a higher macrophage concentration adjacent to the transplanted area.⁵ Also, in animal models, this leukocyte infiltration in the PvAT seems to precede atherosclerosis development and atherosclerotic vascular dysfunction, because in early plaques, a greater density of M1 macrophages in the PvAT was found in knockout apoE (apolipoprotein E)-deficient mice.⁶

Table 3. Comparison of M1 CD11c⁺ Macrophage Densities in the Periplaque Perivascular Adipose Tissue Adjacent to Segments With and Without Thrombosis (n=319 Arterial Segments)

| Macrophages M1 CD11c ⁺ density, cell 10 ⁻⁵ /μm ² | Without thrombus, n=292 coronary plaques | | | Thrombus, n=27 coronary plaques | | |
|---|--|----------------|---------|---------------------------------|-----------------|---------|
| | Adjusted model* | | | Adjusted model* | | |
| | Coefficient | 95% CI | P value | Coefficient | 95% CI | P value |
| Arterial obstruction, % [†] | 0.95 | -0.003 to 1.91 | 0.05 | -0.29 | -0.83 to 0.25 | 0.28 |
| IMT, μm [†] | 10.09 | -2.84 to 23.03 | 0.12 | 2.99 | -42.45 to 48.43 | 0.89 |
| Collagen, % [†] | 0.18 | -0.56 to 0.94 | 0.61 | -0.23 | -2.16 to 1.68 | 0.80 |
| Smooth muscle cell, % [†] | -1.31 | -2.86 to 0.23 | 0.09 | ‡ | ‡ | |
| Fibrous cap, % [†] | -0.22 | -0.49 to 0.04 | 0.10 | -1.03 | -1.99 to -0.08 | 0.03 |
| Minimum FCT, μm [†] | 0.30 | -0.93 to 1.53 | 0.62 | -1.02 | -2.44 to 0.40 | 0.15 |
| Calcification, % [§] | 0.06 | -0.02 to 0.15 | 0.18 | 0.07 | -0.32 to 0.48 | 0.70 |
| Lipid, % [†] | 0.27 | -0.38 to 0.94 | 0.40 | 1.78 | -0.66 to 4.24 | 0.14 |
| Necrosis, % [§] | 0.09 | -0.05 to 0.24 | 0.22 | -0.13 | -0.67 to 0.40 | 0.61 |
| Intraplaque hemorrhage, % [§] | -0.09 | -0.25 to 0.06 | 0.23 | -0.01 | -0.09 to 0.07 | 0.81 |
| Vasa vasorum intima layer, n | -0.06 | -0.17 to 0.05 | 0.28 | -0.10 | -0.22 to 0.01 | 0.09 |
| Vasa Vasorum media layer, n | -0.03 | -0.15 to 0.08 | 0.56 | -0.09 | -0.25 to 0.07 | 0.28 |
| Vasa vasorum adventitia layer, n | -0.008 | -0.03 to 0.02 | 0.60 | 0.03 | 0.01 to 0.07 | 0.02 |

FCT indicates fibrous cap thickness; and IMT, intima-media thickness.

*Adjusted for age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol consumption, and smoking.

[†]Linear regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

[‡]Absence of observations.

[§]Negative binomial regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

^{||}Poisson regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

Likewise, M2 macrophages in the PvAT were also associated with atherosclerosis in our study. Previously, M2 macrophage density in the PvAT was greater in patients with CAD,^{8,9} whereas another study did not corroborate this finding.¹⁰ Similar to our results that showed that an increase in M2 macrophage density was correlated with an increase in plaque size and calcification, other imaging studies found an association between PvAT volume and coronary artery calcification.²⁵⁻²⁷ Moreover, macrophage infiltration and neoangiogenesis in the epicardial adipose tissue were associated with mild coronary calcification; however, macrophage polarization was not assessed.²⁸ In atherosclerotic plaques, M2 macrophages seem to play a role in inflammation resolution through macrocalcification.^{29,30} Although microcalcification is considered a proinflammatory process, macrocalcification in atherosclerosis is a signal of plaque stabilization by phagocytosis, resulting in necrotic cellular debris and apoptotic cell resolution. M2 macrophages were also related to the production of the extracellular matrix, osteoblastic differentiation, and maturation of vascular SMC.²⁹

Although we found that periplaque PvAT inflammation was related to greater collagen content and IMT, and a fewer number of vasa vasorum compared with the control PvAT, another study did not find any difference.³¹ This discrepancy could be explained by the different sample sizes, the number of quantified fields of the PvAT, the different immunohistochemistry techniques

used, and the different statistical approaches in terms of adjustment for possible confounders. Imaging studies have already shown a greater density of immune cells surrounding culprit lesions in patients with acute coronary syndrome.³² Therefore, PvAT inflammation may be heterogeneous in the same individual with bidirectional activity between the arterial wall and the periplaque PvAT in humans.^{33,34} On the other hand, in animal models, it appears that early leukocyte infiltration in the PvAT occurs before the artery wall inflammation and endothelial dysfunction,⁶ suggesting a causal effect of PvAT in endothelial dysfunction.⁵ Also, in animal models, removal of the PvAT in the proximal left anterior descending artery reduced the percentage of stenosis compared with controls 3 months after surgery, whereas in the control group, there was an increase in the stenosis index.³⁵

Macrophages in the PvAT were previously associated with an increased risk of thrombosis in human coronary arteries.¹³ Greater PvAT attenuation, which is a marker of PvAT inflammation in imaging exams, was independently associated with poorer global coronary reserve flow 1 month after an acute coronary event,³⁶ higher acute coronary syndrome,³⁷ and increased cardiac death.³⁸ Our stratified analyses demonstrated that the inflammation mediated by M1 macrophages in the periplaque PvAT was associated with characteristics of plaque progression and destabilization in thrombosed coronary arteries, suggesting that M1 macrophages in

Table 4. Comparison of M2 CD206⁺ Macrophage Densities in the Periplaque Perivascular Adipose Tissue Adjacent to Segments With and Without Thrombosis (n=319 Arterial Segments)

| Macrophages M2 CD11c ⁺ density, cell 10 ⁻⁵ /μm ² | Without thrombus, n=292 coronary plaques | | | Thrombus, n=27 coronary plaques | | |
|---|--|---------------|---------|---------------------------------|-----------------|---------|
| | Adjusted model* | | | Adjusted model* | | |
| | Coefficient | 95% CI | P value | Coefficient | 95% CI | P value |
| Arterial obstruction, % [†] | 0.69 | 0.11 to 1.27 | 0.01 | -0.25 | -0.64 to 0.12 | 0.17 |
| IMT, μ [†] | 8.41 | 0.03 to 16.80 | 0.049 | 6.19 | -16.95 to 29.33 | 0.58 |
| Collagen, % [†] | 0.004 | -0.63 to 0.64 | 0.98 | -0.50 | -1.74 to 0.73 | 0.40 |
| Smooth muscle cell, % [†] | -0.67 | -1.89 to 0.54 | 0.27 | ‡ | ‡ | |
| Fibrous cap, % [†] | 0.06 | -0.22 to 0.36 | 0.64 | -0.34 | -1.21 to 0.51 | 0.41 |
| Minimum FCT, μm [§] | -0.44 | -1.21 to 0.32 | 0.25 | -0.19 | -1.22 to 0.83 | 0.70 |
| Calcification, % [§] | 0.10 | 0.01 to 0.19 | 0.02 | 0.10 | -0.21 to 0.42 | 0.51 |
| Lipid, % [†] | 0.14 | -0.31 to 0.60 | 0.53 | 0.42 | -1.19 to 2.05 | 0.59 |
| Necrosis, % [§] | 0.20 | 0.01 to 0.38 | 0.03 | 0.12 | -0.14 to 0.39 | 0.35 |
| Intraplaque hemorrhage, % [§] | 0.00001 | -0.14 to 0.14 | 1.00 | 0.03 | -0.06 to 0.12 | 0.49 |
| Vasa vasorum intima layer, n | -0.05 | -0.13 to 0.02 | 0.15 | -0.06 | -0.14 to 0.02 | 0.16 |
| Vasa vasorum media layer, n | -0.08 | -0.17 to 0.01 | 0.09 | 0.02 | -0.10 to 0.16 | 0.70 |
| Vasa vasorum adventitia layer, n | -0.006 | -0.03 to 0.01 | 0.61 | -0.03 | -0.05 to -0.01 | 0.003 |

FCT indicates fibrous cap thickness; and IMT, intima-media thickness.

*Adjusted for age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol consumption, and smoking.

[†]Linear regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

[‡]Absence of observations.

[§]Negative binomial regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

^{||}Poisson regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

the PvAT might influence the inflammation in acute coronary events. Accordingly, unstable lesions in human carotid arteries had a higher concentration of M1 macrophages, and metalloproteinases-2 and 9 compared with stable plaques.³⁹ In this way, either M1 macrophages in the PvAT or their cytokine production could contribute to plaque destabilization. We also found that M2 macrophages in the periplaque PvAT may play a role mainly in stable plaques, by the association with calcium and necrosis in stable plaques. These results are in line with those reported in the literature, in which stable atherosclerotic plaques had a greater concentration of M2 macrophages.³⁹

The increase in the number of vasa vasorum in the adventitia layer was associated with an increase in the M1/M2 ratio density in the periplaque PvAT. A similar finding was observed in atherosclerotic plaques with thrombus both for the M1 macrophage density and for M1/M2 ratio density in the periplaque PvAT. Additionally, in plaques with thrombus, the increase in the number of vasa vasorum in the adventitia layer was related to a decrease in the number of M2 macrophages. These findings suggest that an increase in the number of vasa vasorum could be the link between the proinflammatory profile in the PvAT, coronary atherosclerosis, and plaque destabilization. Experimental studies in mice demonstrated that the neoangiogenesis induction increased the number of macrophages in the perivascular area before atherosclerotic plaque

formation and promoted a faster plaque progression.⁴⁰ Our findings are in line with a recent study using autopsy material. However, some methodological differences with our study are present; in the other study they did not evaluate unstable plaques, the inflammation in the PvAT was detected by molecule expression analyses, and the plaque composition was measured by intravascular ultrasound.⁴¹ It is also suggested that vasa vasorum promotes vasospasm through the PvAT and artery inflammation by activation of the paracrine pathway.⁴² These findings suggested a possible role of adventitia vasa vasorum in the migration of inflammatory cells from the periplaque PvAT to the atherosclerotic plaque.

Our results should be interpreted considering some limitations. First, because it is an observational cross-sectional study, we cannot establish causality relationships. Second, it is important to consider that macrophage polarization in vivo has a large plasticity that can be modified by signaling changes from the atherosclerotic plaques and periplaque PvAT.^{43,44} Thus, the classification of M1 CD11c⁺ macrophages and M2 CD206⁺ macrophages could be simplistic, because it represents the extremes of macrophage polarization. Further studies in animals and humans are needed to identify other markers of macrophage transition. Additionally, we did not evaluate cytokines and adipocytokines in the PvAT or the macrophage polarization in the coronary artery plaques. Moreover,

Table 5. Comparison of the Ratio Between M1 CD11c⁺/M2 CD206⁺ Macrophage Densities in the Periplaque Perivascular Adipose Tissue Adjacent to Segments With and Without Thrombosis (n=319 Arterial Segments)

| Ratio M1 CD11c ⁺ /M2 density, cell 10 ⁻⁵ /μm ² | Without thrombus, n=292 coronary plaques | | | Thrombus, n=27 coronary plaques | | |
|---|--|------------------|---------|---------------------------------|-------------------|---------|
| | Adjusted model* | | | Adjusted model* | | |
| | Coefficient | 95% CI | P value | Coefficient | 95% CI | P value |
| Arterial obstruction, % [†] | 6.08 | -2.03 to 14.19 | 0.14 | -0.39 | -1.40 to 0.61 | 0.42 |
| IMT, μm [†] | 33.43 | -72.82 to 139.69 | 0.53 | -33.59 | -246.67 to 179.48 | 0.74 |
| Collagen, % [†] | 2.83 | -4.42 to 10.09 | 0.43 | 1.14 | -5.58 to 7.86 | 0.72 |
| Smooth muscle cell, % [†] | -9.35 | -22.90 to 4.18 | 0.17 | ‡ | ‡ | |
| Fibrous cap, % [†] | -2.37 | -5.35 to 0.60 | 0.11 | -4.71 | -10.27 to 0.84 | 0.09 |
| Minimum FCT, μm [§] | 4.46 | -6.98 to 15.92 | 0.43 | -6.18 | -10.39 to -1.97 | 0.006 |
| Calcification, % [§] | 0.03 | -0.83 to 0.90 | 0.93 | -0.39 | -1.59 to 0.80 | 0.51 |
| Lipid, % [†] | 3.58 | -3.21 to 10.37 | 0.29 | 11.07 | 3.25 to 18.88 | 0.008 |
| Necrosis, % [§] | -0.21 | -1.04 to 0.61 | 0.60 | -3.45 | -6.41 to -0.50 | 0.02 |
| Intraplaque hemorrhage, % [§] | -0.66 | -1.98 to 0.65 | 0.32 | -0.14 | -0.41 to 0.12 | 0.29 |
| Vasa vasorum intima layer, n | 0.20 | -0.69 to 1.10 | 0.65 | -0.23 | -0.55 to 0.07 | 0.13 |
| Vasa vasorum media layer, n | 0.17 | -0.73 to 1.08 | 0.70 | -1.43 | -5.22 to 2.35 | 0.45 |
| Vasa vasorum adventitia layer, n | 0.06 | -0.22 to 0.35 | 0.64 | 0.30 | 0.12 to 0.49 | 0.001 |

FCT indicates fibrous cap thickness; and IMT, intima-media thickness.

*Adjusted for age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol consumption, and smoking.

[†]Linear regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

[‡]Absence of observations.

[§]Negative binomial regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

^{||}Poisson regression with SE adjusted for repeated measures in the same individual.

the lack of follow-up of subjects in this study did not allow us to measure the clinical data directly. The search for clinical data in medical records was not an option because of the decentralization of public health in Brazil. However, information was collected with a reliable NOK, and 80% of them had lived with the deceased in the 6 months before death. Also, our semi-structured interview had higher levels of sensitivity and specificity.^{17,45,46}

Our study also has several strengths. Although previous human studies compared CAD and control patients, the differences in our study design should be highlighted. We evaluated a range of plaque severity (early, vulnerable, stable, and unstable) using morphometric measurements.¹⁸ The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) imaging study reinforced the importance of considering the early stages of atherosclerosis, because frequent vascular inflammation was found in asymptomatic middle-aged individuals with subclinical atherosclerosis, and even in 11% of the artery walls without atherosclerosis.⁴⁷ Additionally, we performed a careful statistical analysis considering repeated measures in the same individual and adjustment for possible confounders. Other strengths of the present study included the histopathological evaluation of all of the coronary arteries, and the collection of the fragments with the most severe

atherosclerosis and one control segment in the same individual. This comprehensive evaluation is only possible in autopsy studies, which are being conducted on a smaller scale every year worldwide. Moreover, both macrophage polarization and coronary atherosclerosis were measured directly, avoiding measurement bias. Additionally, we developed an imaging processing software that measured the components of coronary plaque and other measurements such as the percentage of arterial obstruction and FCT.¹⁹ To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the association between macrophage polarization in the PvAT and direct measures of plaque components of atherosclerosis in the coronary arteries. The findings of this study provide translational knowledge from animal models to humans. Animal models have several advantages, but they also have some limitations on the characteristics of the atherosclerotic plaques compared with those in humans. Intraplaque hemorrhage and neovascularization are rare in mice, plaque rupture is also rare in pigs, and the site of the lesions in rabbits is different than in humans.⁴⁸ This study therefore brings some insights into how polarized macrophages in the PvAT can cause coronary atherosclerosis for future investigations. Some randomized clinical trials on this topic are currently under investigation. The CANTOS (Canakinumab Anti-inflammatory

Thrombosis Outcomes Study) trial is investigating the anti-inflammatory agent canakinumab that acts in the IL-1 β (interleukin-1 β), which has a role in macrophage polarization.⁴⁹ Also, the COLCOT (Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial) is investigating colchicine, which suppresses the inflammasome and decrease levels of IL-1 β and IL-18 (interleukin-18).⁵⁰

In conclusion, the proinflammatory M1 macrophage profile in the periplaque PvAT was correlated with plaque progression and destabilization. Additionally, M1 macrophages in the periplaque PvAT were associated with a higher risk of coronary thrombosis. Anti-inflammatory M2 macrophages in the periplaque PvAT were correlated with plaque size, increased calcification and necrotic content, and decreased the number of vasa vasorum in the adventitia layer. We did not find any associations between the density of polarized macrophages in the periplaque PvAT and intraplaque hemorrhage.

ARTICLE INFORMATION

Received July 16, 2021; accepted December 21, 2021.

Affiliations

Department of Pathology (D.S.F.-I., C.A.P., L.F.d.S., M.Y.-E., R.E.P. L., C.K.S.) and Heart Institute (InCor) (S.H.G.L.), and Discipline of Geriatrics (C.K.S.), University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil; and Control and Automation Engineering, Federal Institute of Education, Science and Technology of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil (R.A.d.A., A.B.C.).

Acknowledgments

The authors acknowledge K. C. S. Bispo and C. Arruda for their support in the execution of the histological techniques, and A. Gomes for her support in the execution of the immunohistochemical techniques.

Sources of Funding

This study was supported by a research grant from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (2013/00335-2, 2017/11313-0). D.S.F.-I. received a scholarship from FAPESP (2013/12290-3, 2017/24066-1).

Disclosures

The authors declare no conflicts of interest.

Supplemental Material

Data S1
Tables S1–S3
Figures S1–S9

REFERENCES

- World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). 2021. Available at: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Accessed November 16, 2021.
- Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Cheng S, Dellings FN, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143:e254–e743. doi: 10.1161/CIR.0000000000000950
- Libby P, Hansson GK. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res*. 2015;116:307–311. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.301313
- Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, Rothenberg FG, Neltner B, Romig-Martin SA, Dickson EW, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence

- of high-fat feeding. *Circ Res*. 2009;104:541–549. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.182998
- Öhman MK, Luo W, Wang H, Guo C, Abdallah W, Russo HM, Eitzman DT. Perivascular visceral adipose tissue induces atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011;219:33–39. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.012
- Skiba DS, Nosalski R, Mikolajczyk TP, Siedlinski M, Rios FJ, Montezano AC, Jawien J, Olszanecki R, Korbut R, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1–7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2017;174:4055–4069. doi: 10.1111/bph.13685
- Pierzynová A, Šrámek J, Cinkajzlová A, Kratochvílová H, Lindner J, Haluzík M, Kučera T. The number and phenotype of myocardial and adipose tissue CD68+ cells is associated with cardiovascular and metabolic disease in heart surgery patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2019;29:946–955. doi: 10.1016/j.numecd.2019.05.063
- Shimabukuro M, Hirata Y, Tabata M, Dagvasumberel M, Sato H, Kurobe H, Fukuda D, Soeki T, Kitagawa T, Takahashi S, et al. Epicardial adipose tissue volume and adipocytokine imbalance are strongly linked to human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1077–1084. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300829
- Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, Motoki T, Akaike M, Nishio C, Higashida M, Mikasa H, Nakaya Y, Takahashi S, et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:248–255. doi: 10.1016/j.jacc.2011.01.048
- Gurses KM, Ozmen F, Kocyigit D, Yersal N, Bilgic E, Kaya E, Kopru CZ, Soyalt T, Doganci S, Tokgozoglul L, et al. Netrin-1 is associated with macrophage infiltration and polarization in human epicardial adipose tissue in coronary artery disease. *J Cardiol*. 2017;69:851–858. doi: 10.1016/j.jcc.2016.08.016
- Fitzgibbons TP, Lee N, Tran K-V, Nicoloso S, Kelly M, Tam SKC, Czech MP. Coronary disease is not associated with robust alterations in inflammation gene expression in human epicardial fat. *JCI Insight*. 2019;4:e124859. doi: 10.1172/jci.insight.124859
- Mikami T, Furuhashi M, Sakai A, Numaguchi R, Harada R, Naraoka S, Kamada T, Higashiura Y, Tanaka M, Ohori S, et al. Antiatherosclerotic phenotype of perivascular adipose tissue surrounding the saphenous vein in coronary artery bypass grafting. *J Am Heart Assoc*. 2021;10:18905. doi: 10.1161/JAHA.120.018905
- Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, da Silva LFF, Campos FM, Bittencourt MS, da Silva KCS, Leite REP, Grinberg LT, Ferretti-Rebustini REDL, et al. B lymphocytes and macrophages in the perivascular adipose tissue are associated with coronary atherosclerosis: an autopsy study. *J Am Heart Assoc*. 2019;8:e013793. doi: 10.1161/JAHA.119.013793
- Numaguchi R, Furuhashi M, Matsumoto M, Sato H, Yanase Y, Kuroda Y, Harada R, Ito T, Higashiura Y, Koyama M, et al. Differential phenotypes in perivascular adipose tissue surrounding the internal thoracic artery and diseased coronary artery. *J Am Heart Assoc*. 2019;8:e011147. doi: 10.1161/JAHA.118.011147
- Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009;42:377–381. doi: 10.1016/j.jbi.2008.08.010
- Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, Silva LFF, Campos FM, Silva KCSD, Leite REP, Grinberg LT, Ferretti-Rebustini REL, Jacob Filho W, et al. Perivascular adipose tissue inflammation and coronary artery disease: an autopsy study protocol. *JMIR Res Protoc*. 2016;5:e211. doi: 10.2196/resprot.6340
- Suemoto CK, Ferretti-Rebustini REL, Rodriguez RD, Leite REP, Soterio L, Brucki SMD, Spera RR, Cippiciani TM, Farfel JM, Chiavegatto Filho A, et al. Neuropathological diagnoses and clinical correlates in older adults in Brazil: a cross-sectional study. *PLoS Med*. 2017;14:e1002267. doi: 10.1371/journal.pmed.1002267
- Yahagi K, Kolodgie FD, Otsuka F, Finn AV, Davis HR, Joner M, Virmani R. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13:79–98. doi: 10.1038/ncardio.2015.164
- Andrade RA, Farias-Itao DS, Nishizawa A, Campos FM, Pasqualucci CA, Suemoto CK, Campo AB. Processamento de Imagens para Análise da Composição de Placa de Aterosclerose: Estudo Preliminar em Material de Autópsia. 2017. Available at: <https://eventos.ufabc.edu.br/siimsp/files/id59.pdf>. Accessed May 16, 2021.

20. Suemoto CK, Nitrini R, Grinberg LT, Ferretti REL, Farfel JM, Leite RE, Menezes PR, Fregni F, Jacob-Filho W, Pasqualucci CA, et al. Atherosclerosis and dementia: a cross-sectional study with pathological analysis of the carotid arteries. *Stroke*. 2011;42:3614–3615. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.628156
21. Nakatani S, Yamagishi M, Tamai J, Goto Y, Umeno T, Kawaguchi A, Yutani C, Miyatake K. Assessment of coronary artery distensibility by intravascular ultrasound: application of simultaneous measurements of luminal area and pressure. *Circulation*. 1995;91:2904–2910. doi: 10.1161/01.CIR.91.12.2904
22. Narula J, Nakano M, Virmani R, Kolodgie FD, Petersen R, Newcomb R, Malik S, Fuster V, Finn AV. Histopathologic characteristics of atherosclerotic coronary disease and implications of the findings for the invasive and noninvasive detection of vulnerable plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:1041–1051. doi: 10.1016/j.jacc.2012.10.054
23. University of California, Los Angeles: Institute for Digital Research & Education. Regression with Stata Chapter 4—beyond OLS. Available at: <https://stats.idre.ucla.edu/stata/webbooks/reg/chapter4/regression-with-statachapter-4-beyond-ols-2/>. Accessed October 24, 2019.
24. University of California, Los Angeles: Statistical Consulting Group. How can I use countfit in choosing a count model? Available at: <https://stats.idre.ucla.edu/stata/faq/how-can-i-use-countfit-in-choosing-a-count-model/>. Accessed February 1, 2021.
25. McClain J, Hsu F, Brown E, Burke G, Carr J, Harris T, Kritchevsky S, Szklo M, Tracy R, Ding J. Pericardial adipose tissue and coronary artery calcification in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Obesity*. 2013;21:1056–1063. doi: 10.1002/oby.20090
26. Kroll L, Nassenstein K, Jochims M, Koitka S, Nensa F. Assessing the role of pericardial fat as a biomarker connected to coronary calcification—a deep learning based approach using fully automated body composition analysis. *J Clin Med*. 2021;10:356. doi: 10.3390/jcm10.020356
27. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev*. 2014;262:153–166. doi: 10.1111/immr.12218
28. Kitagawa T, Yamamoto H, Sentani K, Takahashi S, Tsumura H, Senoo A, Yasui W, Sueda T, Kihara Y. The relationship between inflammation and neoangiogenesis of epicardial adipose tissue and coronary atherosclerosis based on computed tomography analysis. *Atherosclerosis*. 2015;243:293–299. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.09.013
29. Shioi A, Ikari Y. Plaque calcification during atherosclerosis progression and regression. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25:294–303. doi: 10.5551/jat.RV17020
30. Montanaro M, Scimeca M, Anemona L, Servadei F, Giacobbi E, Bonfiglio R, Bonanno E, Urbano N, Ippoliti A, Santeusano G, et al. The paradox effect of calcification in carotid atherosclerosis: microcalcification is correlated with plaque instability. *Int J Mol Sci*. 2021;22:395. doi: 10.3390/ijms22010395
31. Verhagen SN, Buijsrogge MP, Vink A, van Herwerden LA, van der Graaf Y, Visseren FLJ. Secretion of adipocytokines by perivascular adipose tissue near stenotic and non-stenotic coronary artery segments in patients undergoing CABG. *Atherosclerosis*. 2014;233:242–247. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.005
32. Konishi M, Sugiyama S, Sato Y, Oshima S, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Matsubara J, Sumida H, Nagayoshi Y, et al. Pericardial fat inflammation correlates with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2010;213:649–655. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.007
33. Margaritis M, Antonopoulos AS, Digby J, Lee R, Reilly S, Coutinho P, Shirodaria C, Sayeed R, Petrou M, De Silva R, et al. Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation*. 2013;127:2209–2221. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001133
34. Takaoka M, Suzuki H, Shioda S, Sekikawa K, Saito Y, Nagai R, Sata M. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1576–1582. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207175
35. McKenney-Drake ML, Rodenbeck SD, Bruning RS, Kole A, Yancey KW, Alloosh M, Sacks HS, Sturek M. Epicardial adipose tissue removal potentiates outward remodeling and arrests coronary atherogenesis. *Ann Thorac Surg*. 2017;103:1622–1630. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.11.034
36. Kanaji Y, Hirano H, Sugiyama T, Hoshino M, Horie T, Misawa T, Nogami K, Ueno H, Hada M, Yamaguchi M, et al. Pre-percutaneous coronary intervention pericoronary adipose tissue attenuation evaluated by computed tomography predicts global coronary flow reserve after urgent revascularization in patients with non-ST-segment-elevation acute coronary syndrome. *J Am Heart Assoc*. 2020;9:e016504. doi: 10.1161/JAHA.120.016504
37. Hedgire S, Baliyan V, Zucker EJ, Bittner DO, Staziaki PV, Takx RAP, Scholtz J-E, Meyersohn N, Hoffmann U, Ghoshhajra B. Perivascular epicardial fat stranding at coronary CT angiography: a marker of acute plaque rupture and spontaneous coronary artery dissection. *Radiology*. 2018;287:808–815. doi: 10.1148/radiol.2017171568
38. Oikonomou EK, Marwan M, Desai MY, Mancio J, Alashi A, Hutt Centeno E, Thomas S, Herdman L, Kotanidis CP, Thomas KE, et al. Non-invasive detection of coronary inflammation using computed tomography and prediction of residual cardiovascular risk (the CRISP CT study): a post-hoc analysis of prospective outcome data. *Lancet*. 2018;392:929–939. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31114-0
39. Cho KY, Miyoshi H, Kuroda S, Yasuda H, Kamiyama K, Nakagawara J, Takigami M, Kondo T, Atsumi T. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2013;22:910–918. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2012.11.020
40. Tanaka K, Nagata D, Hirata Y, Tabata Y, Nagai R, Sata M. Augmented angiogenesis in adventitia promotes growth of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011;215:366–373. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.016
41. Ito H, Wakatsuki T, Yamaguchi K, Fukuda D, Kawabata Y, Matsuura T, Kusunose K, Ise T, Tobiume T, Yagi S, et al. Atherosclerotic coronary plaque is associated with adventitial vasa vasorum and local inflammation in adjacent epicardial adipose tissue in fresh cadavers. *Circ J*. 2020;84:769–775. doi: 10.1253/circj.CJ-19-0914
42. Ohyama K, Matsumoto Y, Takanami K, Ota H, Nishimiya K, Sugisawa J, Tsuchiya S, Amamizu H, Uzuka H, Suda A, et al. Coronary adventitial and perivascular adipose tissue inflammation in patients with vasospastic angina. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:414–425. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.046
43. Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston A, T, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Raff-Dubois S, Nicoletti A, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One*. 2010;5:e8852. doi: 10.1371/journal.pone.0008852
44. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175–184. doi: 10.1172/JCI29881
45. Ferretti REDL, Damin AE, Brucki SMD, Morillo LS, Perroco TR, Campora F, Moreira EG, Balbino ES, Lima MDCDA, Battela C, et al. Post-Mortem diagnosis of dementia by informant interview. *Dement Neuropsychol*. 2010;4:138–144. doi: 10.1590/S1980-57642010DN40200011
46. Farfel JM, Nitrini R, Suemoto CK, Grinberg LT, Ferretti REL, Leite REP, Tampellini E, Lima L, Farias DS, Neves RC, et al. Very low levels of education and cognitive reserve: a clinicopathologic study. *Neurology*. 2013;81:650–657. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a08f1b
47. Fernández-Friera L, Fuster V, López-Melgar B, Oliva B, Sánchez-González J, Macías A, Pérez-Asenjo B, Zamudio D, Alonso-Farto JC, España S, et al. Vascular inflammation in subclinical atherosclerosis detected by hybrid PET/MRI. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73:1371–1382. doi: 10.1016/j.jacc.2018.12.075
48. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donck C, Martinet W, De Meyer GRY. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017;816:3–13. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.05.010
49. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377:1119–1131. doi: 10.1056/NEJMoa1707914
50. Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, Pinto FJ, Ibrahim R, Gamra H, Kiwan GS, et al. Efficacy and safety of low-dose colchicine after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2019;381:2497–2505. doi: 10.1056/NEJMoa1912388

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Macrophage polarization in the perivascular fat was associated with coronary atherosclerosis

Short title: Macrophage inflammation and atherosclerosis

Authors:

Daniela Souza Farias-Itao, BSN MSc;¹ Carlos Augusto Pasqualucci, MD PhD;¹ Renato Araújo de Andrade BE PSM;² Luiz Fernando Ferraz da Silva, MD PhD;¹ Maristella Yahagi-Estevam, BPT;¹ Silvia Helena Gelas Lage, MD PhD,³ Renata Elaine Paraízo Leite, BPT PhD;¹Alexandre Brincalpe Campo, BE PhD;² Claudia Kimie Suemoto, MD MSc PhD^{1,4}

Affiliations:

¹ Department of Pathology, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil;

² Control and Automation Engineering, Federal Institute of Education, Science and Technology of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil;

³ Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil;

⁴ Discipline of Geriatrics, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil.

Materials & Correspondence

Daniela Souza Farias-Itao BSN MSc
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
455 Avenida Doutor Arnaldo, sala 1355
01246-903
São Paulo, SP, Brazil,
Phone and Fax: +55-11-3061-8249
E-mail: dsfarias@usp.br

SUPPLEMENTARY METHODS

Hematoxylin-eosin stain technique

The slides were stained with hematoxylin-eosin, as per the following steps: deparaffinization and hydration of the slides; after, stained with Harris's hematoxylin for five minutes; and washed under running water. The slides were differentiated in acid-alcohol; turned blue with ammoniacal acid; washed under running water; bathed in 95% of ethanol diluted in deionized water; bathed in eosin for two minutes; washed under running water, dehydrated, diaphanized, and mounted on slides. We prepared the hematoxylin-eosin by dissolving in alcohol and dissolving the alum in the water, heating it without boiling. It was then removed from heat and the two solutions were mixed. It was brought to the boil quickly, always stirring with a glass stick (time should not exceed 1 minute). After that, it was removed from the heat and cooled under running water (thermal shock). The next day, the solution was heated again and the mercury oxide added. It was then cooled quickly, under running water.

1% Eosin stock solution:

Yellow Eosin Y: 1 g

Distilled water: 100 mL

1% Phloxine stock solution

Phloxine B: 1g

Distilled water: 100 ml

Eosin-Phloxine Solution

1% Eosin stock solution: 100 mL

1% Phloxine stock solution: 10mL

96% Alcohol: 780 mL

Glacial acetic acid: 5 mL

Masson's trichrome stain technique

The slides were stained with *Masson's trichrome* according to the steps: the slides were deparaffinized and hydrated; stained with Weigert's iron hematoxylin for ten minutes, washed in current water for ten minutes, and bathed with deionized water. Next, we stained with Scarlet Biebrich solution for one minute, washed under running water, and bathed with deionized water. We then, differentiated with Phosphotungstic-Phosphomolybdic Acid solution for 10 to 15 minutes, stained with aniline blue for 10 to 15 minutes, followed by bathing in deionized water, dehydration, and diaphanization, and finally, the slides were mounted in resin.

Weigert's Ferric Hematoxylin

Solution A

Hematoxylin powder 1 g
95% Alcohol 100mL

Solution B

Aqueous 30% Ferric Chloride solution 4 mL
Distilled water..... 95 mL
Concentrated Hydrochloric Acid 1 mL
Working solution: combine equal parts of solutions A and B at the time of use.

Biebrich's Scarlet Solution

Aqueous solution of Scarlet Biebrich 1% 90 mL.
Aqueous solution of Acid Fuchsin 1% 10 mL
Glacial Acetic Acid 1% 1mL

Phosphotungstic-Phosphomolybdic Acid Solution

Phosphotungstic Acid 2.5 g

Phosphomolybdic acid 2.5 g
Distilled water 100 mL

Aniline Blue Solution

Aniline Blue 2.5 g
Glacial Acetic Acid 2mL
Distilled water 100 mL

Boil the water, then dissolve the blue and filter; add the acid last.

Verhoeff stain technique

The slides were stained with Verhoeff according to the following steps: the slides were deparaffinized and hydrated; bathing in Bouin for one minute and washing until the yellow color came out. Then, we stained with hematoxylin-eosin for 25 minutes, washed under running water, differentiated in 2% Ferric Chloride until the elastic fibers were clearly visualized, washed under running water for five minutes, bathed in 96% alcohol for five minutes, and washed under running water for five minutes. Next, we stained with Van-Gieson dye for one minute, washed, dehydrated, and mounted on slides.

Bouin

Picric Acid 800 mL
Pure formaldehyde 200 mL

Alcoholic Hematoxylin 5% 30 mL

Hematoxylin 5 g
Absolute alcohol 100mL

10% Ferric Chloride 12mL

Ferric Chloride 10 g
Distilled water 100 mL

Lugol - 12 ml

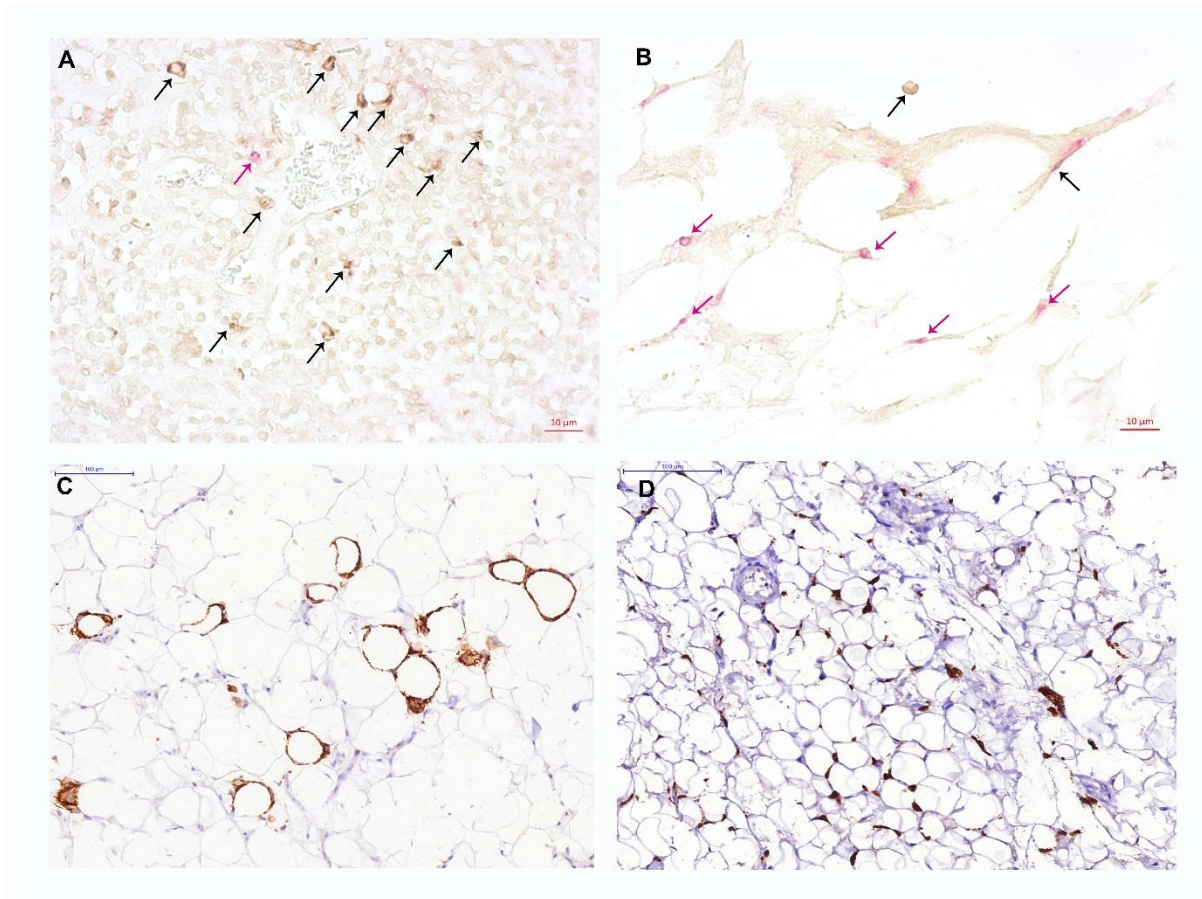
Potassium iodide 4 g
Iodine..... 2 g
Distilled water 100mL

Dissolve the Potassium Iodide and then the iodine, together with the water.

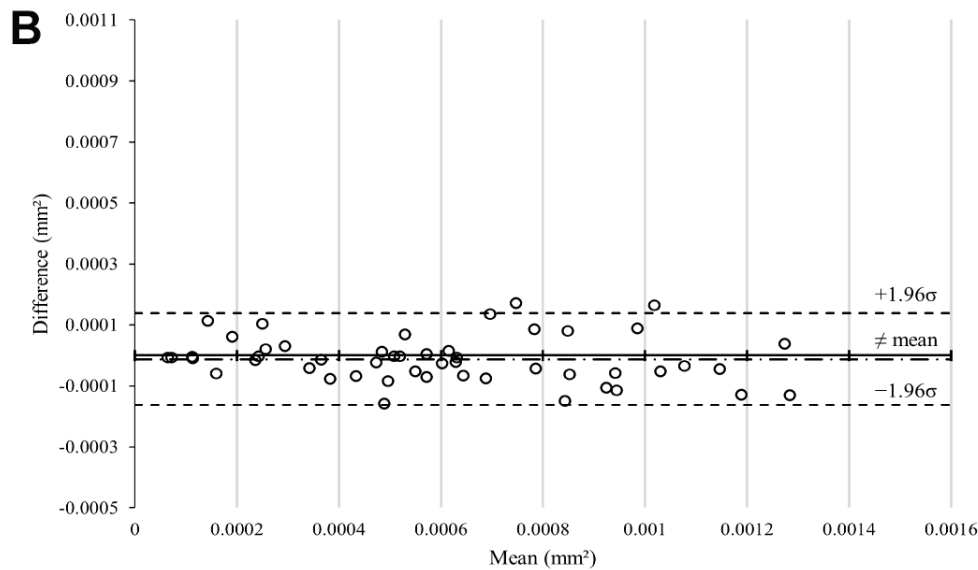
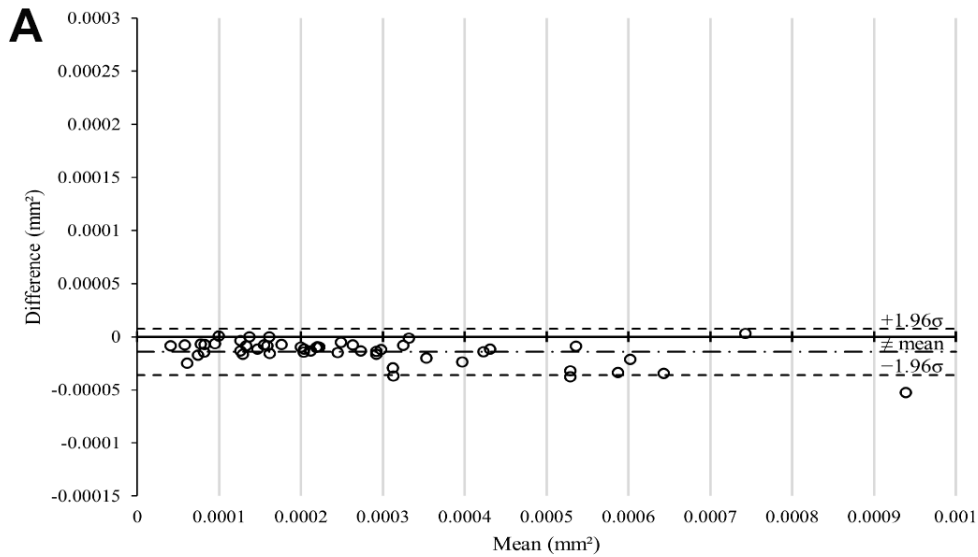
Van-Gieson

Saturated aqueous solution of picric acid 97.5 mL
Acid fuchsin 1% aqueous solution 2.5 mL

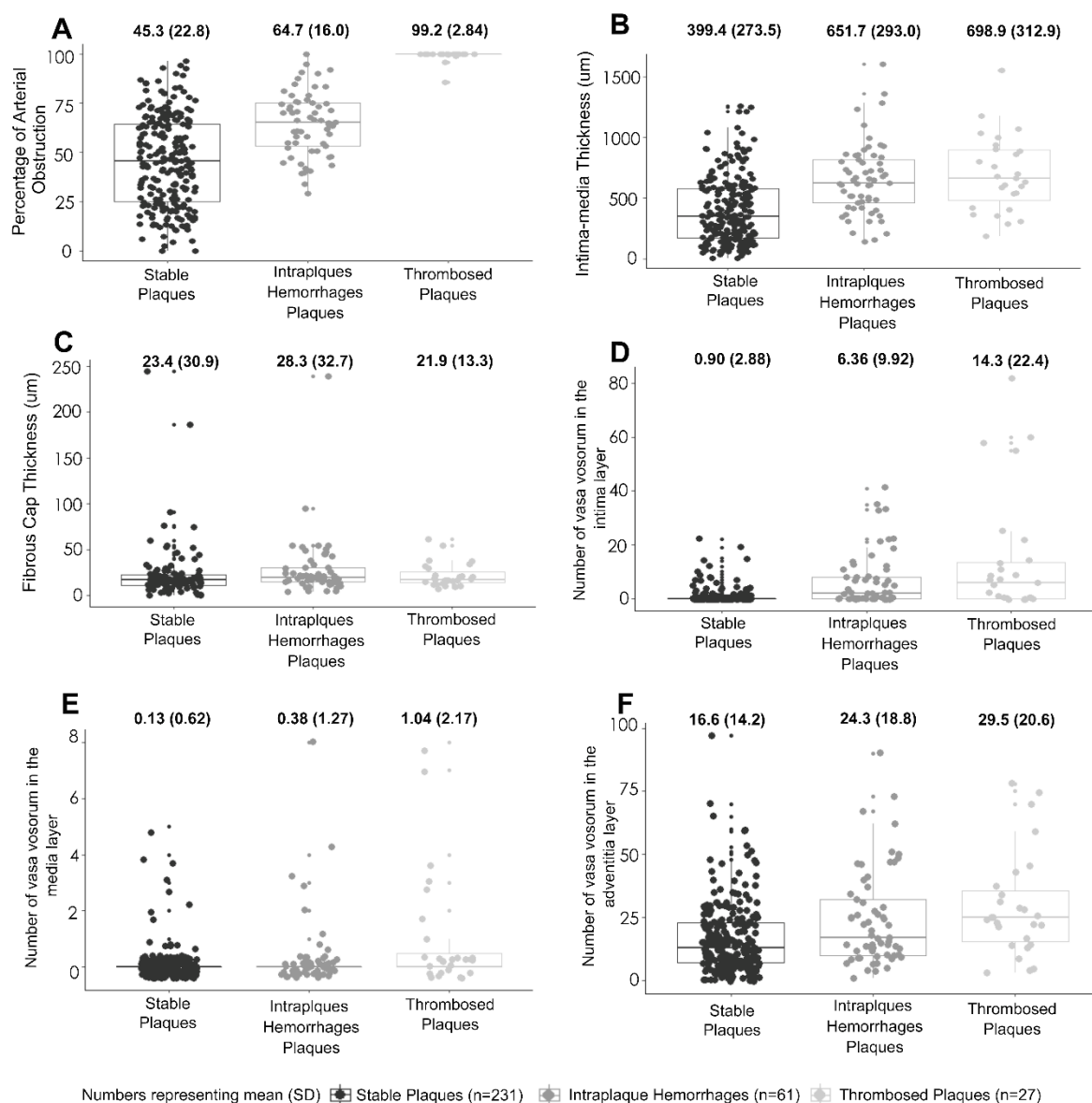
SUPPLEMENTARY FIGURES



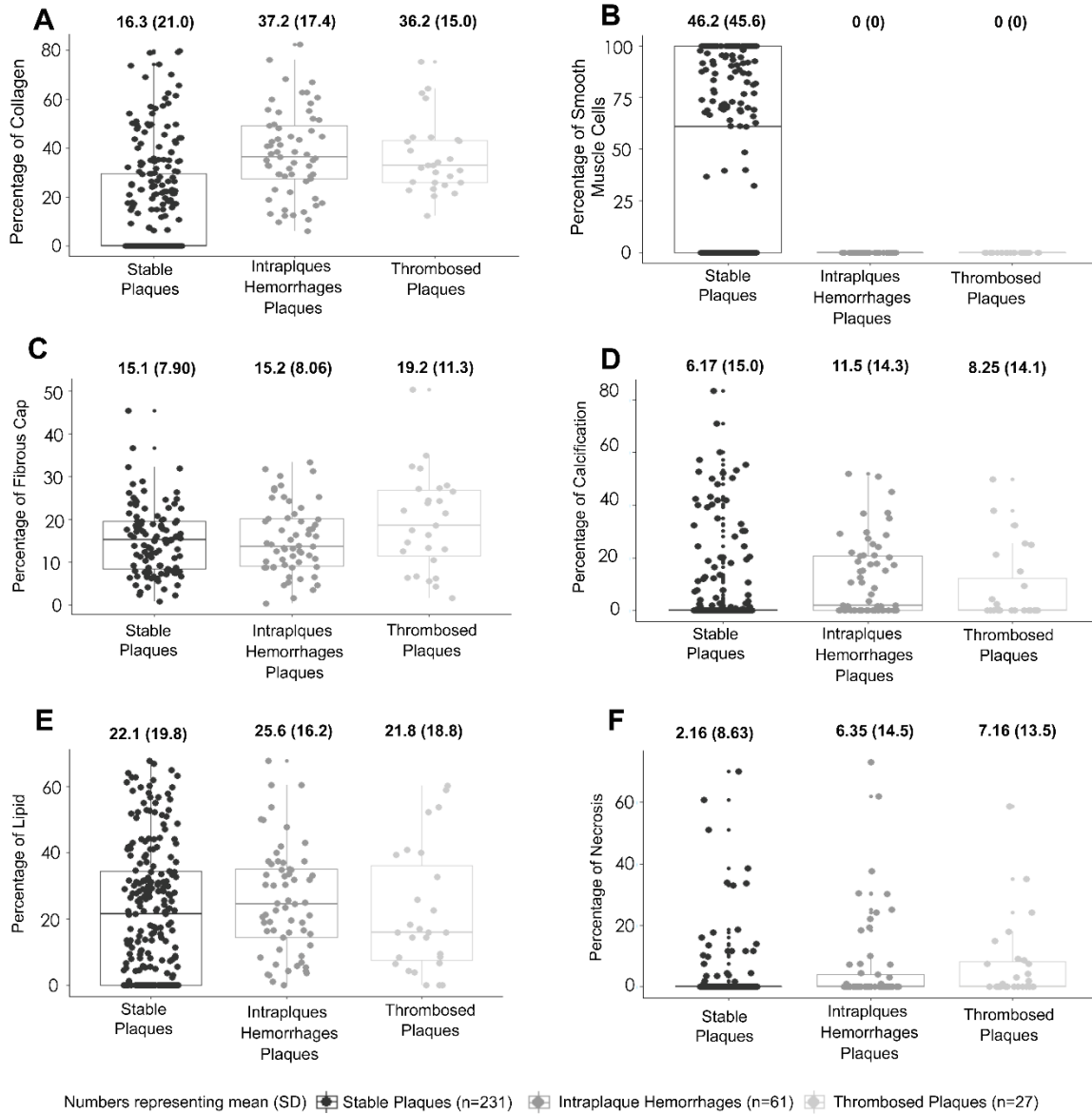
Supplementary Figure I. Polarized macrophages in the periadipose pericoronary adipose tissue. A: Pharyngeal tonsil double-stained using immunohistochemistry technique with M1 macrophages CD11c⁺ (black arrows) and M2 macrophages CD206⁺ (pink arrows); B: Perivascular adipose tissue adjacent to coronary artery with atherosclerotic plaque double-stained using immunohistochemistry technique with M1 macrophages CD11c⁺ (black arrows) and M2 macrophages CD206⁺ (pink arrows); C: Perivascular adipose tissue adjacent to the coronary artery with atherosclerotic plaque using immunohistochemistry with M1 macrophages (brown immunostaining). Macrophages M1 forming a crown-like structures around the adipocyte in death or death process.



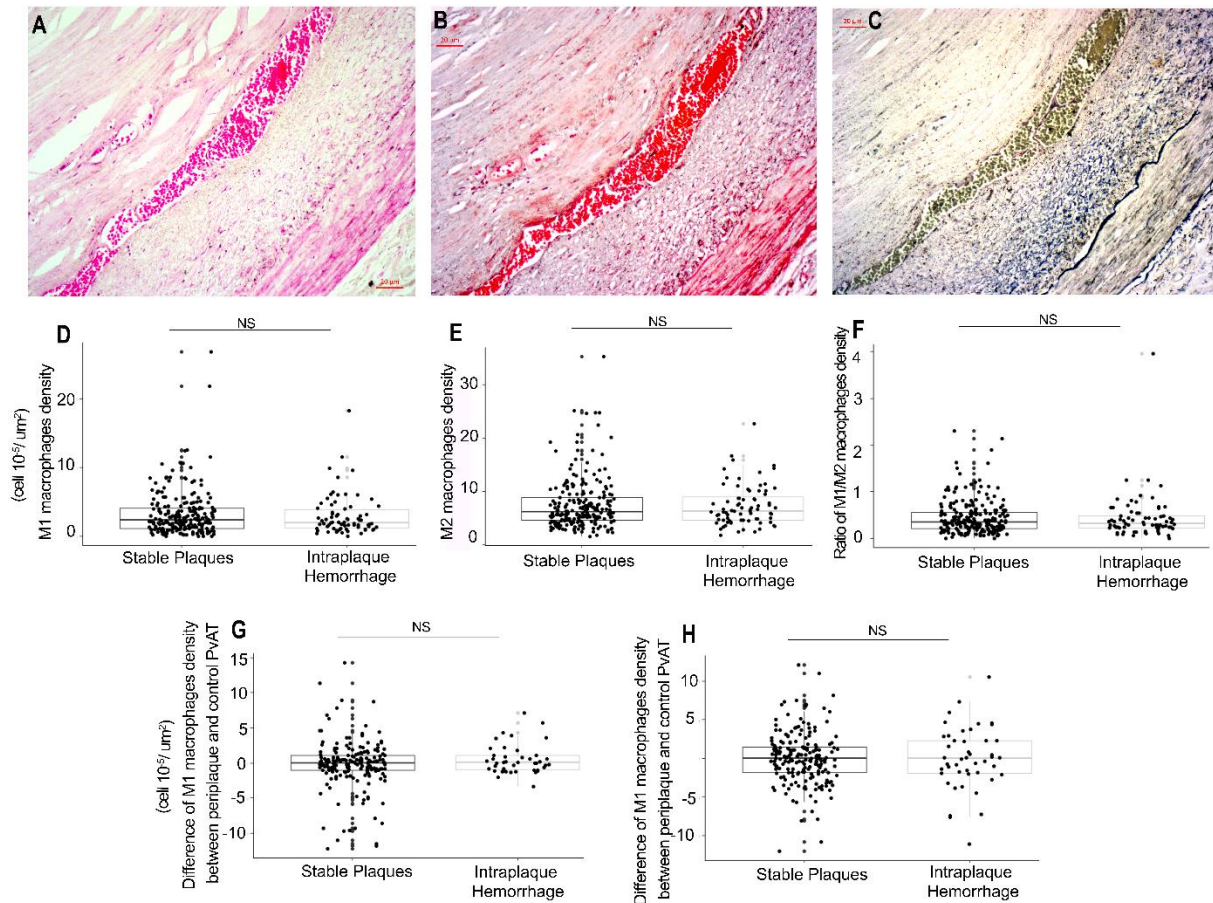
Supplementary Figure II. Agreement of lumen and internal elastic lamina measurements made by artificial intelligence and expertise in the APA software (n=50 arterial segments). A: Bland-Altman graph showing the difference between the contour of lumen when executed by the APA software and when measured manually by a human expert. The circles inside the interval $+1.96\sigma$ to -1.96σ correspond to 94% agreement. B: Bland-Altman graph showing the difference between the contour of internal elastic lamina measured by the APA software and manually by a human expert. The circles inside the interval $+1.96\sigma$ to -1.96σ correspond to 94% agreement.



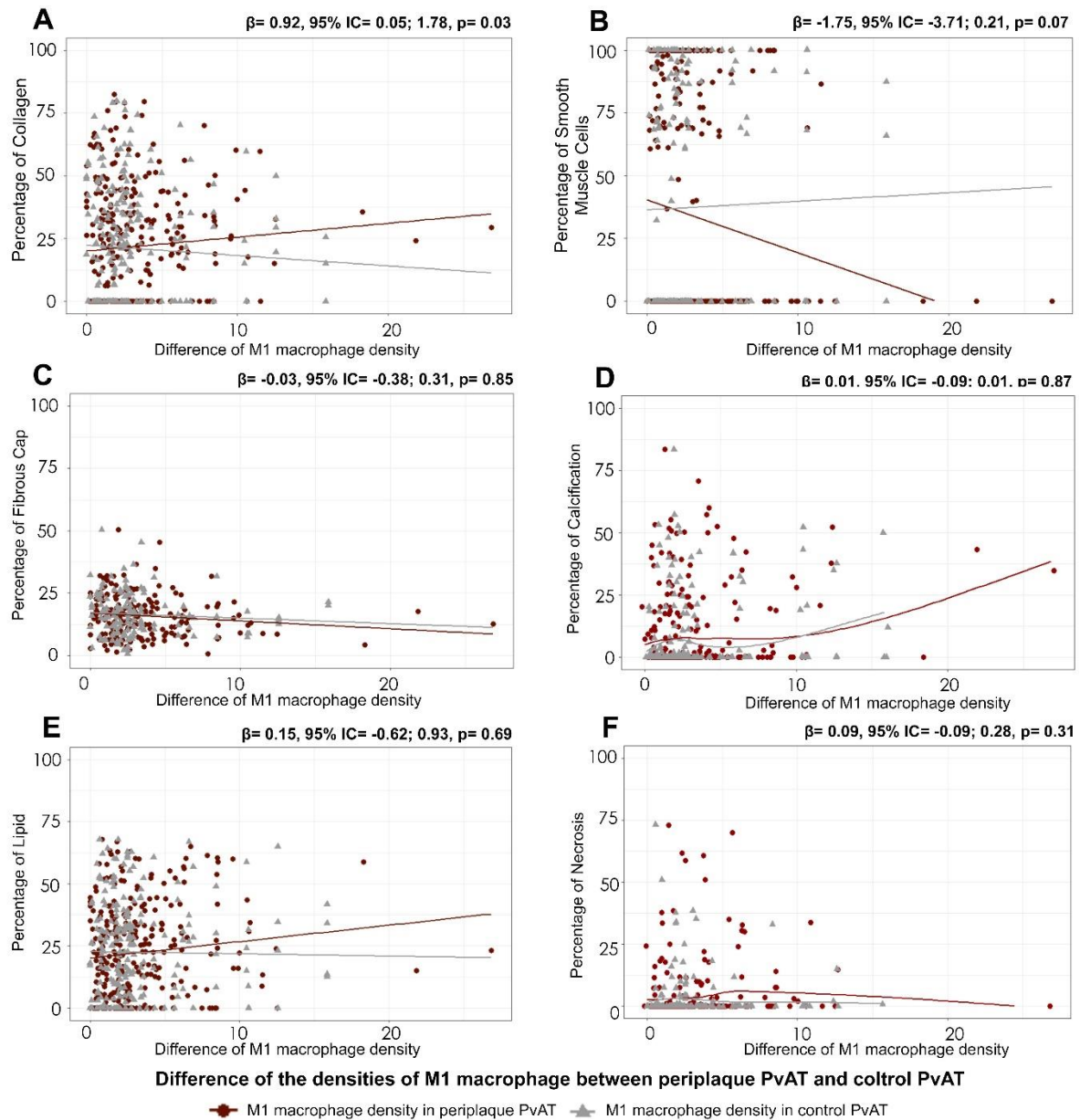
Supplementary Figure III. Boxplot with jitter plot of atherosclerotic plaque measurements in coronary arteries by plaque classification (n=319 arterial segments). A: Boxplot with jitter plot of percentage of arterial obstruction by plaque classification; B: Boxplot with jitter plot of intima-media thickness by plaque classification; C: Boxplot with jitter plot of fibrous cap thickness by plaque classification; D: Boxplot with jitter plot of the number of *vasa vasorum* in the intima layer by plaque classification; E: Boxplot with jitter plot of the number of *vasa vasorum* in the media layer by plaque classification; F: Boxplot with jitter plot of the number of *vasa vasorum* in the adventitia layer by plaque classification.



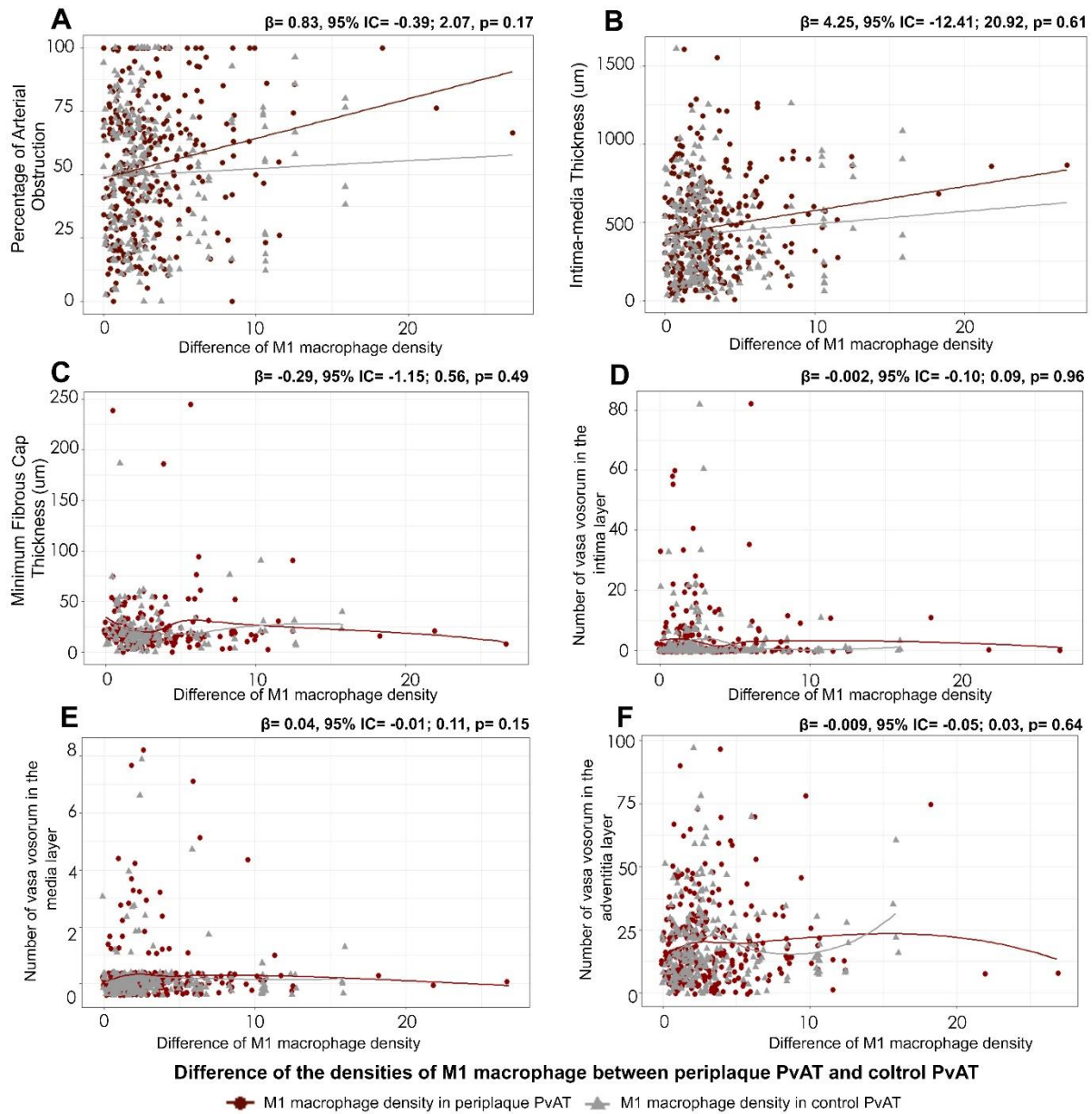
Supplementary Figure IV. Boxplot with jitter plot of atherosclerotic plaque components in coronary arteries by plaque classification (n=319 arterial segments). A: Boxplot with jitter plot of percentage of collagen content in atherosclerotic plaques by plaque classification; B: Boxplot with jitter plot of percentage of smooth muscle cell content in atherosclerotic plaques by plaque classification; C: Boxplot with jitter plot of percentage of fibrous cap content in atherosclerotic plaques by plaque classification; D: Boxplot with jitter plot of percentage of calcification content in atherosclerotic plaques by plaque classification; E: Boxplot with jitter plot of percentage of lipid content in atherosclerotic plaques by plaque classification; F: Boxplot with jitter plot of percentage of necrosis in atherosclerotic plaques by plaque classification.



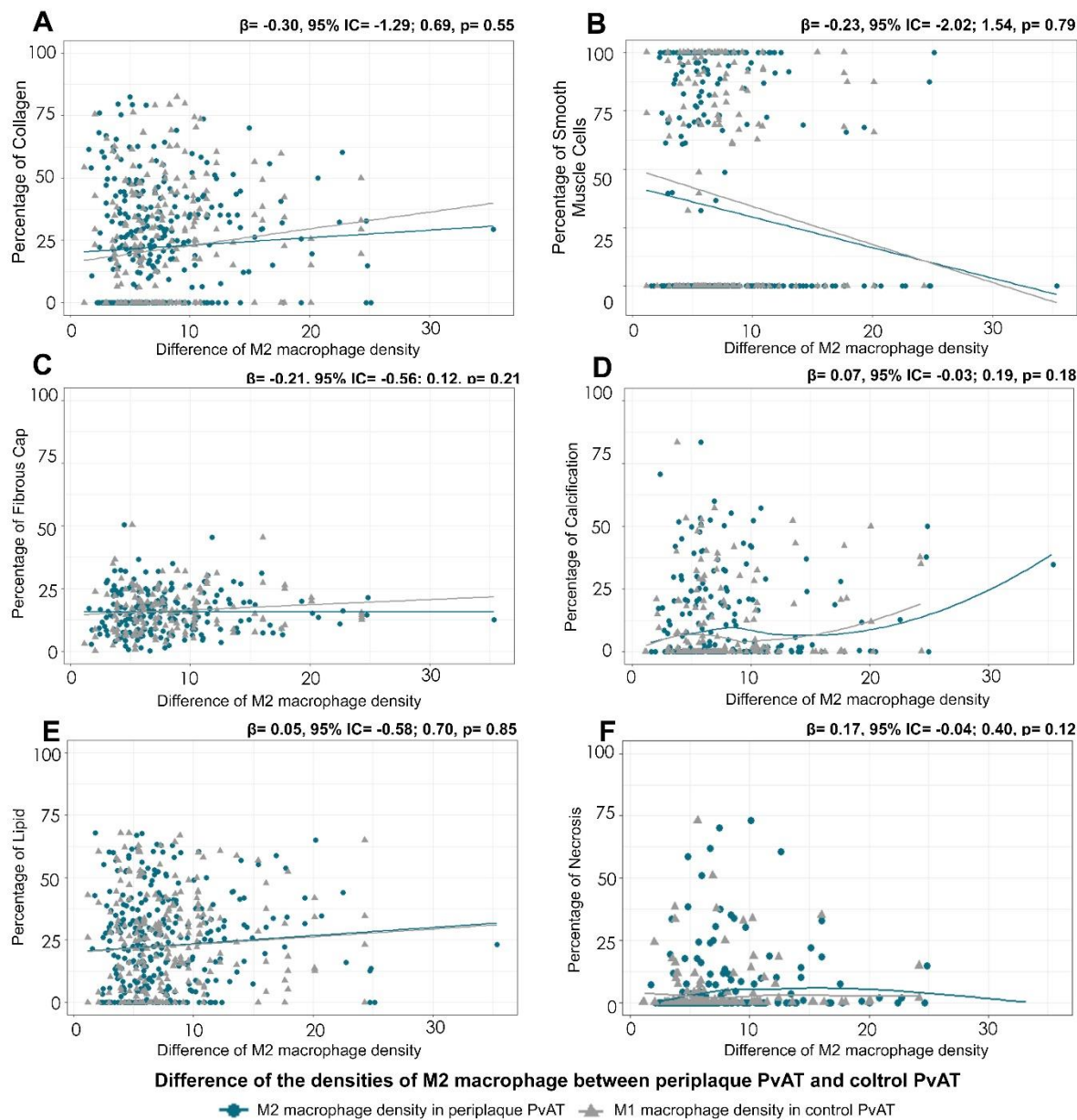
Supplementary Figure V. Association between the polarized macrophages density in the perivascular adipose tissue and intraplaque hemorrhage (n=319 arterial segments). A: Atherosclerotic plaque with the presence of intraplaque hemorrhage, hematoxylin-eosin stain; B: Atherosclerotic plaque with the presence of intraplaque hemorrhage, Masson's Trichrome stain; C Atherosclerotic plaque with the presence of intraplaque hemorrhage, Verhoeff stain; D-H: Association between the polarized macrophages density in the PvAT and atherosclerotic plaques with intraplaque hemorrhage (n=319 arterial segments). NS: non-significant.



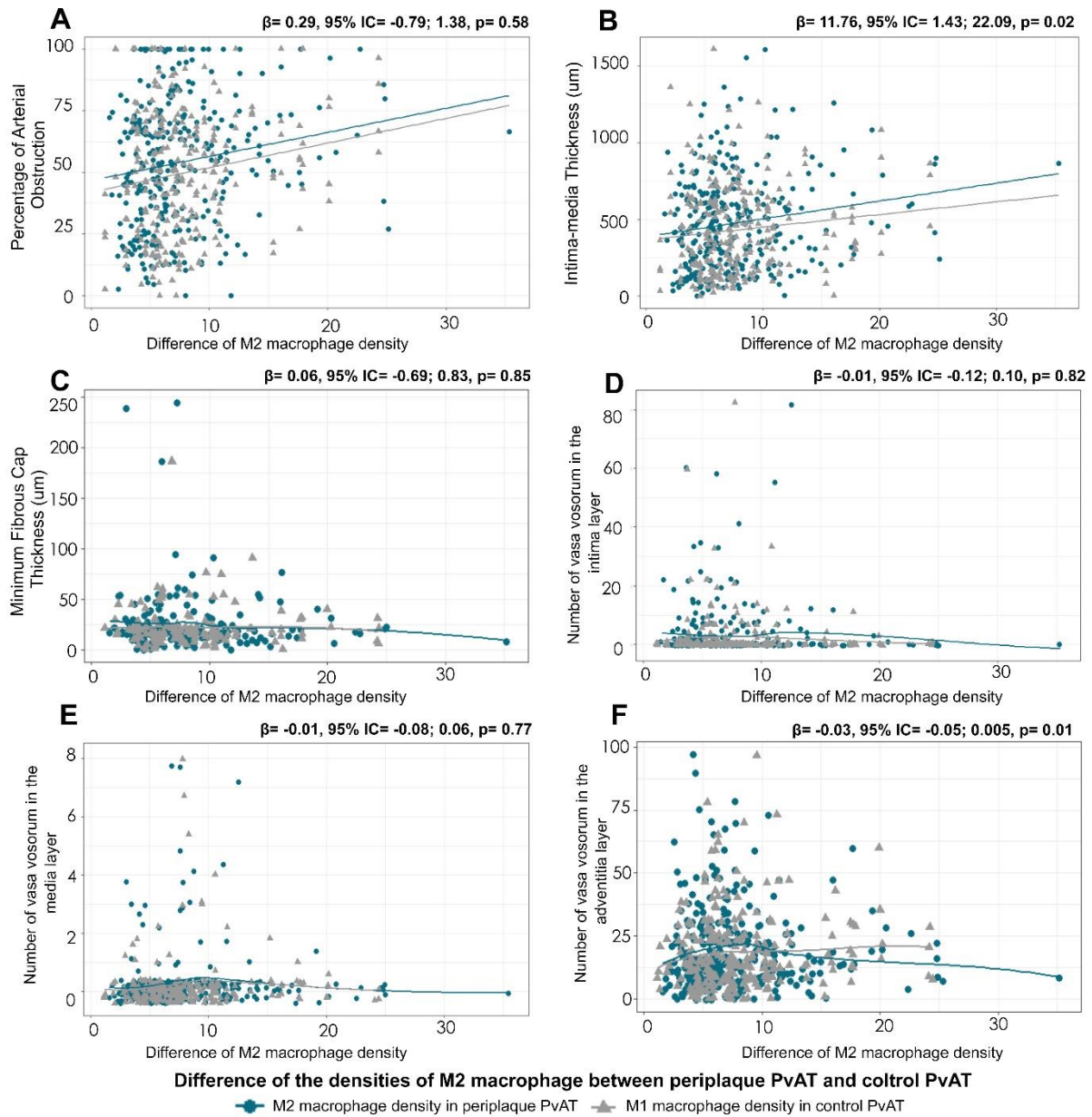
Supplementary Figure VI. Association of the difference of M1 macrophage density in the periplaque PvAT and control PvAT with the measures of atherosclerotic plaque components in coronary arteries (n=319 coronary arteries). A, B, C, and E: Linear regression adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors (i.e. age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol consumption, and smoking); D and F: Negative binomial adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors.



Supplementary Figure VII. Association of the difference of M1 macrophage density in the periplaque PvAT and control PvAT with the measures of atherosclerotic plaque in coronary arteries (n=319 coronary arteries). A and B: Linear regression adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors (i.e. age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol consumption, and smoking); C: Negative binomial regression adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors. D, E and F: Poisson regression adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors.



Supplementary Figure VIII. Association of the difference of M2 macrophage density in the periplaque PvAT and control PvAT with the measures of atherosclerotic plaque components in coronary arteries (n=319 coronary arteries). A, B, C and E: Correlation using linear regression adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors (i.e. age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol consumption, and smoking); D and F: Correlation using negative binomial adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors.



Supplementary Figure IX. Association of the difference of M2 macrophage density in the peri plaque PvAT and control PvAT with the measures of atherosclerotic plaque in coronary arteries (n=319 coronary arteries). A and B: Correlation using linear regression adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors (i.e. age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol consumption, and smoking); C: Correlation using negative binomial regression adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors. D, E and F: Correlation using Poisson regression adjusted for repeated measures in the same individual and confounding factors.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table I. Characterization of the sample (n=82 subjects).

| Variable | Mean (SD) or n (%) |
|--|--------------------|
| Age (years) | 69.0 (14.4) |
| Female | 41 (50%) |
| Race | |
| <i>White</i> | 48 (58%) |
| <i>Black and Asian</i> | 34 (42%) |
| Education (years), median (IQR) | 4 (1-6) |
| Hypertension | 61 (74%) |
| Diabetes | 30 (36%) |
| CAD symptoms | 10 (12%) |
| Heart failure | 19 (23%) |
| Stroke | 10 (12%) |
| Dyslipidemia | 14 (17%) |
| BMI (kg/m²) | 24.4 (5.8) |
| Physical inactivity | 56 (68%) |
| Current smoking | 12 (15%) |
| Current alcohol use | 24 (29%) |
| <i>Antihypertensive drugs</i> | 45 (55%) |
| <i>Hypoglycemic drugs</i> | 24 (29%) |
| <i>Insulin</i> | 7 (8%) |
| <i>Lipid-lowering drugs</i> | 6 (7%) |
| Density of M1 CD11c⁺macrophages periplaque PvAT (cell 10⁵/um²)* | 3.18 (3.17) |
| Density of M2 CD206⁺macrophages periplaque PvAT (cell 10⁵/um²) † | 7.55 (4.57) |
| Ratio of the densities between M1 CD11c⁺/M2 CD206⁺ periplaque PvAT ‡ | 0.44 (0.40) |
| Difference of M1 CD11c⁺ between periplaque and control PvAT § | -0.10 (3.34) |
| Difference of M2 206⁺ between periplaque and control PvAT | 0.02 (3.48) |

SD: standard deviation; IQR: interquartile interval; CAD: coronary artery disease; BMI: body mass index.

* Number of periplaque PvAT quantified for M1 CD11c⁺macrophages: 305.

† Number of periplaque PvAT quantified for M2 CD11c⁺macrophages: 308.

‡ Number of periplaque PvAT calculated for the ratio M1 CD11c⁺/M2 CD206⁺ macrophages: 299.

§ Number of subtractions of M1 CD11c⁺ between periplaque and control PvAT: 228.

|| Number of subtractions of M2 CD206⁺ between periplaque and control PvAT: 240.

Supplementary Table II. Correlation of the M2 CD206⁺ macrophage density of in the peri-plaque PvAT with coronary artery atherosclerosis (n=319 arterial segments).

| M2 CD206 ⁺ macrophages density (cell 10 ⁻⁵ /um ²) | Unadjusted Model | | | Adjusted Model* | | |
|--|------------------|-------------|-------|-----------------|-------------|------|
| | Coef. | 95% CI | p | Coef. | 95% CI | p |
| Arterial Obstruction, (%) † | 0.97 | 0.33; 1.61 | 0.003 | 0.77 | 0.12; 1.42 | 0.02 |
| IMT, μm † | 11.62 | 4.57; 18.68 | 0.002 | 9.09 | 1.54; 16.63 | 0.01 |
| Collagen, (%) † | 0.30 | -0.38; 0.98 | 0.38 | 0.05 | -0.59; 0.70 | 0.87 |
| Smooth Muscle Cell, (%) † | -1.30 | -2.64; 0.02 | 0.05 | -0.74 | -1.93; 0.43 | 0.21 |
| Fibrous Cap, (%) † | -0.001 | -0.24; 0.23 | 0.99 | 0.02 | -0.25; 0.30 | 0.86 |
| Minimum FCT, μm ‡ | -0.38 | -0.96; 0.20 | 0.19 | -0.41 | -1.08; 0.24 | 0.21 |
| Calcification, (%) ‡ | 0.02 | -0.01; 0.06 | 0.18 | 0.09 | 0.01; 0.18 | 0.03 |
| Lipid, (%) † | 0.32 | -0.10; 0.76 | 0.14 | 0.15 | -0.30; 0.60 | 0.50 |
| Necrosis, (%) ‡ | 0.07 | -0.03; 0.17 | 0.18 | 0.06 | -0.06; 0.19 | 0.31 |
| Intraplaque Hemorrhage, (%) ‡ | 0.03 | -0.07; 0.13 | 0.55 | 0.05 | -0.07; 0.18 | 0.40 |
| Vasa vasorum intima layer, n § | -0.02 | -0.10; 0.04 | 0.50 | -0.04 | -0.11; 0.02 | 0.23 |
| Vasa Vasorum media layer, n § | 0.01 | -0.04; 0.06 | 0.68 | -0.03 | -0.10; 0.04 | 0.40 |
| Vasa vasorum adventitia layer, n § | -0.003 | -0.02; 0.01 | 0.72 | -0.007 | -0.02; 0.01 | 0.49 |

Coef.: Coefficient; CI: confidence level; IMT: Intima-media thickness; FCT: fibrous cap thickness.

* Adjusted for age, sex, hypertension, diabetes, body mass index, physical inactivity, alcohol consumption, and smoking.

† Linear regression with standard error adjusted for repeated measures in the same individual.

‡ Negative binomial regression with standard error adjusted for repeated measures in the same individual.

§ Poisson regression with standard error adjusted for repeated measures in the same individual.

Supplementary Table III. Association of the polarized macrophage density in the PvAT with unstable atherosclerotic plaques (n=319 arterial segments).

| Unstable Plaques | <u>Unadjusted Model</u> | | | <u>Adjusted Model</u> | | |
|--|-------------------------|------------|------|-----------------------|------------|------|
| | OR | 95% CI | p† | OR | 95% CI | p‡ |
| Periplaque PvAT (cell 10⁻⁵/um²) | | | | | | |
| <i>Thrombosis</i> | | | | | | |
| . Macrophages M1 CD11c ⁺ | 1.10 | 1.01; 1.20 | 0.02 | 1.11 | 1.01; 1.23 | 0.03 |
| . Macrophages M2 CD206 ⁺ | 1.04 | 0.98; 1.10 | 0.15 | 1.04 | 0.97; 1.11 | 0.22 |
| . Ratio M1 CD11c ⁺ /M2 CD206 ⁺ | 1.92 | 0.97; 3.82 | 0.06 | 1.95 | 1.05; 3.61 | 0.03 |
| <i>Intraplaque Hemorrhage</i> | | | | | | |
| . Macrophages M1 CD11c ⁺ | 0.97 | 0.87; 1.07 | 0.60 | 0.95 | 0.85; 1.07 | 0.45 |
| . Macrophages M2 CD206 ⁺ | 0.98 | 0.91; 1.07 | 0.80 | 0.97 | 0.90; 1.06 | 0.64 |
| . Ratio M1 CD11c ⁺ /M2 CD206 ⁺ | 0.98 | 0.40; 2.36 | 0.97 | 0.96 | 0.41; 2.22 | 0.92 |
| Difference of PvAT periplaque and control (cell 10⁻⁵/um²) | | | | | | |
| <i>Thrombosis</i> | | | | | | |
| . Macrophages M1 CD11c ⁺ | 1.22 | 1.03; 1.44 | 0.01 | 1.19 | 0.98; 1.45 | 0.07 |
| . Macrophages M2 CD206 ⁺ | 1.12 | 0.91; 1.37 | 0.25 | 1.06 | 0.86; 1.31 | 0.53 |
| <i>Intraplaque Hemorrhage</i> | | | | | | |
| . Macrophages M1 CD11c ⁺ | 1.06 | 0.98; 1.15 | 0.09 | 1.05 | 0.97; 1.14 | 0.21 |
| . Macrophages M2 CD206 ⁺ | 0.99 | 0.86; 1.14 | 0.93 | 0.97 | 0.84; 1.12 | 0.75 |

OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval; PvAT: perivascular adipose tissue.

† Logistic regression with standard error adjusted for repeated measures in the same individual.

‡ Logistic regression with standard error adjusted for repeated measures in the same individual adjusted for age, sex, BMI, hypertension, diabetes, physical activity, alcohol consumption, and smoking.

Major Resources Table

In order to allow validation and replication of experiments, all essential research materials listed in the Methods should be included in the Major Resources Table below. Authors are encouraged to use public repositories for protocols, data, code, and other materials and provide persistent identifiers and/or links to repositories when available. Authors may add or delete rows as needed.

Animals (in vivo studies)

| Species | Vendor or Source | Background Strain | Sex | Persistent ID / URL |
|---------|------------------|-------------------|-----|---------------------|
| | | | | |
| | | | | |

Genetically Modified Animals

| | Species | Vendor or Source | Background Strain | Other Information | Persistent ID / URL |
|-----------------|---------|------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Parent - Male | | | | | |
| Parent - Female | | | | | |

Antibodies

| Target antigen | Vendor or Source | Catalog # | Working concentration | Lot # (preferred but not required) | Persistent ID / URL |
|--------------------------------|------------------|---------------|-----------------------|------------------------------------|---|
| Anti-human CD11c clone EP1347Y | Abcam | ab52632 | 1 µl: 400 µl | | https://www.abcam.com/cd11c-antibody-ep1347y-c-terminal-ab52632.html |
| Anti-human CD206 clone 5C11 | Abnova | H00004360-M02 | 1 µl: 1.500 µl | | http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=H00004360-M02 |

DNA/cDNA Clones

| Clone Name | Sequence | Source / Repository | Persistent ID / URL |
|------------|----------|---------------------|---------------------|
| | | | |
| | | | |

Cultured Cells

| Name | Vendor or Source | Sex (F, M, or unknown) | Persistent ID / URL |
|------|------------------|------------------------|---------------------|
| | | | |
| | | | |

Data & Code Availability

| Description | Source / Repository | Persistent ID / URL |
|-------------|---------------------|---------------------|
| | | |
| | | |

Other

| Description | Source / Repository | Persistent ID / URL |
|-------------|---------------------|---------------------|
| | | |
| | | |

DOI [to be added]

5.3 Linfócitos T no TAP e Aterosclerose Coronariana

5.3.1 Composição de Placa Aterosclerótica e Medidas Morfométricas

Realizamos a técnica de imuno-histoquímica de dupla marcação para a identificar a linhagem de linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ e também foi quantificado na mesma lâmina a linhagem de linfócitos Th CD4⁺CXCR3⁻. Obtivemos uma amostra com 191 fragmentos de TAP periplaca adjacente aos seguimentos arteriais.

Encontramos que o aumento da densidade de linfócitos Th no TAP periplaca foi associado com a diminuição do percentual da área da capa fibrosa, independentemente da idade, sexo, HAS, diabetes, IMC, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo ($\beta = -0,79$, IC 95% = -1,50; -0,07, e $p = 0,03$). Nós não encontramos nenhuma correlação com os demais componentes de aterosclerose e medidas morfométricas nas artérias coronárias (Tabela 9).

Tabela 9. Correlação entre a densidade dos linfócitos Th no TAP periplaca com aterosclerose em artérias coronárias (n=191 segmentos arteriais).

| Densidade dos linfócitos TH CD4 ⁺ (células 10 ⁻⁵ /um ²) | <u>Modelo Univariado</u> | | | <u>Modelo Ajustado*</u> | | |
|---|--------------------------|---------------|------|-------------------------|---------------|------|
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%) †</i> | 0,17 | -1,70; 2,05 | 0,85 | -0,36 | -2,07; 1,33 | 0,66 |
| <i>EIM, μm †</i> | 4,73 | -20,64; 30,11 | 0,71 | 1,93 | -20,99; 24,86 | 0,86 |
| <i>Colágeno, (%) ‡</i> | 0,02 | -0,05; 0,09 | 0,55 | 0,003 | -0,09; 0,09 | 0,93 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%) ‡</i> | -0,006 | -0,13; 0,12 | 0,91 | 0,04 | -0,19; 0,28 | 0,71 |
| <i>Capa Fibrosa, (%) †</i> | -0,68 | -1,25; -0,12 | 0,01 | -0,79 | -1,50; -0,07 | 0,03 |
| <i>ECF mínima, μm ‡</i> | -0,03 | -0,10; 0,04 | 0,42 | 0,01 | -0,05; 0,08 | 0,66 |
| <i>Calcificação, (%) ‡</i> | -0,08 | -0,24; 0,06 | 0,27 | -0,15 | -0,36; 0,05 | 0,15 |
| <i>Lipídio, (%) †</i> | 0,38 | -0,97; 1,73 | 0,57 | 0,06 | -1,26; 1,38 | 0,92 |
| <i>Necrose, (%) ‡</i> | 0,01 | -0,20; 0,23 | 0,89 | -0,06 | -0,32; 0,20 | 0,65 |
| <i>Hemorragia Intraplaca, (%) ‡</i> | -0,05 | -0,30; 0,19 | 0,67 | 0,06 | -0,21; 0,34 | 0,64 |
| <i>Vv camada íntima, n §</i> | -0,13 | -0,41; 0,15 | 0,37 | -0,16 | -0,43; 0,11 | 0,24 |
| <i>Vv camada média, n §</i> | -0,08 | -0,31; 0,14 | 0,47 | -0,15 | -0,42; 0,11 | 0,25 |

| | | | | | | |
|----------------------------------|--------|-------------|------|--------|-------------|------|
| <i>Vv camada adventícia, n §</i> | -0,007 | -0,06; 0,04 | 0,80 | -0,007 | -0,06; 0,04 | 0,79 |
|----------------------------------|--------|-------------|------|--------|-------------|------|

TAP: tecido adiposo perivascular; Coef: Coeficiente; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; Vv: *vasa vasorum*.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

A linhagem Th1 CD4⁺CXCR3⁺, considerada predominantemente pró-inflamatória, correlacionou-se com o percentual da área ocupada por colágeno e calcificação. A cada aumento do número de linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ no TAP periplaca foi associado com o aumento em média de 0,58% da área de colágeno ($\beta = 0,58$, IC 95% = 0,009; 1,16, e $p = 0,046$) e com uma diminuição em média de 1,44% da área de calcificação ($\beta = -1,44$, IC 95% = -2,69; -0,20, e $p = 0,02$) (Tabela 10).

Tabela 10. Correlação entre a densidade dos linfócitos Th1 no TAP periplaca com aterosclerose em artérias coronárias (n=191 segmentos arteriais).

| Densidade dos linfócitos TH1 CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ (células 10 ⁻⁵ /um ²) | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | |
|---|-------------------|-----------------|------|------------------|-----------------|-------|
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%) †</i> | 1,74 | -12,04; 15,53 | 0,80 | -0,98 | -13,37; 11,40 | 0,87 |
| <i>EIM, µm †</i> | 21,88 | -145,21; 188,97 | 0,79 | 15,77 | -144,44; 175,99 | 0,84 |
| <i>Colágeno, (%) ‡</i> | 0,48 | 0,02; 0,94 | 0,04 | 0,58 | 0,009; 1,16 | 0,046 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%) ‡</i> | -0,90 | -2,46; 0,64 | 0,25 | -0,53 | -2,56; 1,48 | 0,60 |
| <i>Capa Fibrosa, (%) †</i> | -1,35 | -5,75; 3,04 | 0,54 | -1,31 | -6,003; 3,37 | 0,57 |
| <i>ECF mínima, µm ‡</i> | -0,15 | -0,66; 0,35 | 0,54 | 0,003 | -0,45; 0,46 | 0,98 |
| <i>Calcificação, (%) ‡</i> | -1,06 | -2,36; 0,23 | 0,10 | -1,44 | -2,69; -0,20 | 0,02 |
| <i>Lipídio, (%) †</i> | 7,18 | -0,02; 14,39 | 0,05 | 5,83 | -2,38; 14,04 | 0,16 |
| <i>Necrose, (%) ‡</i> | -0,08 | -1,34; 1,16 | 0,89 | -0,009 | -1,96; 1,94 | 0,99 |
| <i>Hemorragia Intraplaca, (%) ‡</i> | 0,87 | -1,22; 2,97 | 0,41 | 0,84 | -1,37; 3,07 | 0,45 |
| <i>Vv camada íntima, n §</i> | 1,01 | -0,58; 2,61 | 0,21 | 1,17 | -0,06; 2,41 | 0,06 |
| <i>Vv camada média, n §</i> | 0,89 | -0,75; 2,53 | 0,28 | 0,92 | -0,02; 1,86 | 0,05 |
| <i>Vv camada adventícia, n §</i> | 0,01 | -0,34; ,37 | 0,93 | 0,05 | -0,30; 0,41 | 0,78 |

TAP: tecido adiposo perivascular; Coef: Coeficiente; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; Vv: *vasa vasorum*.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

Realizamos a razão da densidade dos linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ com a densidade de linfócitos Th CD4⁺CXCR3⁻ para investigar se o aumento da proporção de linfócitos da linhagem predominantemente pró-inflamatória em relação aos linfócitos T auxiliares de modo geral se correlaciona com a aterosclerose em artérias coronárias. Nenhuma correlação foi encontrada (Tabela 11).

Tabela 11. Correlação entre a razão das densidades dos linfócitos Th1/Th no TAP periplaca com aterosclerose em artérias coronárias (n=191 segmentos arteriais).

| Densidade da Razão de linfócitos TH1/TH (células 10 ⁻⁵ /um ²) | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | |
|--|-------------------|-----------------|------|------------------|-----------------|------|
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%)</i> † | -10,93 | -32,55; 10,68 | 0,31 | -7,20 | -27,32; 12,91 | 0,47 |
| <i>EIM, μm</i> † | 10,93 | -267,32; 289,19 | 0,93 | 25,61 | -222,49; 273,71 | 0,83 |
| <i>Colágeno, (%)</i> ‡ | 0,09 | -0,90; 1,09 | 0,84 | 0,34 | -0,73; 1,42 | 0,53 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%)</i> ‡ | 0,16 | -0,92; 1,25 | 0,76 | -0,64 | -2,59; 1,29 | 0,51 |
| <i>Capa Fibrosa, (%)</i> † | 1,99 | -6,51; 10,51 | 0,64 | 4,28 | -5,05; 13,62 | 0,36 |
| <i>ECF mínima, μm</i> ‡ | 0,41 | -0,49; 1,31 | 0,37 | 0,12 | -0,67; 0,92 | 0,75 |
| <i>Calcificação, (%)</i> ‡ | 0,21 | -1,27; 1,71 | 0,77 | -0,37 | -1,93; 1,17 | 0,63 |
| <i>Lipídio, (%)</i> † | -6,90 | -22,15; 8,35 | 0,37 | -3,57 | -18,91; 11,76 | 0,64 |
| <i>Necrose, (%)</i> ‡ | -0,28 | -2,51; 1,95 | 0,80 | -0,95 | -3,32; 1,41 | 0,42 |
| <i>Hemorragia Intraplaca, (%)</i> ‡ | 1,70 | -0,14; 3,54 | 0,07 | 1,01 | -0,68; 2,72 | 0,24 |
| <i>Vv camada íntima, n</i> § | 0,84 | -0,32; 2,01 | 0,15 | 0,92 | -0,55; 2,41 | 0,22 |
| <i>Vv camada média, n</i> § | 1,15 | -0,15; 2,46 | 0,08 | 1,56 | -0,06; 3,19 | 0,05 |
| <i>Vv camada adventícia, n</i> § | 0,15 | -0,49; 0,81 | 0,63 | 0,19 | -0,44; 0,84 | 0,54 |

TAP: tecido adiposo perivascular; Coef: Coeficiente; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; Vv: *vasa vasorum*.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

Foi utilizado o marcador de superfície CD45RO⁺ para identificarmos as células Treg ativadas e consideradas efetoras CD45RO⁺FoxP3⁺. Na análise isolada com a densidade das células T CD45RO⁺FoxP3⁻ no TAP periplaca, encontramos uma correlação negativa para hemorragia intraplaca nas artérias coronárias ($\beta = -0,81$; IC 95% = -1,61; -0,01, e $p = 0,045$) (Tabela 12).

Tabela 12. Correlação entre a densidade dos linfócitos T CD45RO⁺ FoxP3⁺ no TAP periplaca com aterosclerose em artérias coronárias (n=226 segmentos arteriais).

| Densidade dos linfócitos T CD45RO ⁺ (células 10 ⁻⁵ /um ²) | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | |
|---|-------------------|----------------|------|------------------|----------------|-------|
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%) †</i> | 6,19 | -6,21; 18,61 | 0,32 | 3,19 | -7,95; 14,33 | 0,57 |
| <i>EIM, µm †</i> | 78,71 | -69,59; 227,03 | 0,29 | 40,34 | -95,14; 175,83 | 0,55 |
| <i>Colágeno, (%) ‡</i> | 0,09 | -0,30; 0,50 | 0,63 | 0,03 | -0,48; 0,55 | 0,90 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%) ‡</i> | -0,34 | -1,16; 0,47 | 0,40 | -0,09 | -1,04; 0,84 | 0,83 |
| <i>Capa Fibrosa, (%) †</i> | 0,11 | 3,01; 3,24 | 0,94 | -0,36 | -4,20; 3,46 | 0,84 |
| <i>ECF mínima, µm ‡</i> | -0,17 | -0,54; 0,20 | 0,37 | -0,03 | -0,34; 0,27 | 0,84 |
| <i>Calcificação, (%) ‡</i> | 0,23 | -0,31; 0,78 | 0,40 | 0,84 | -0,37; 2,07 | 0,17 |
| <i>Lipídio, (%) †</i> | -0,23 | -7,50; 7,04 | 0,95 | -2,16 | -9,75; 5,43 | 0,57 |
| <i>Necrose, (%) ‡</i> | 0,73 | -0,95; 2,42 | 0,39 | 0,97 | -1,15; 3,11 | 0,37 |
| <i>Hemorragia Intraplaca, (%) ‡</i> | -0,27 | -1,16; 0,62 | 0,55 | -0,81 | -1,61; -0,01 | 0,045 |
| <i>Vv camada íntima, n §</i> | 0,57 | -0,63; 1,78 | 0,35 | 0,40 | -0,63; 1,44 | 0,44 |
| <i>Vv camada média, n §</i> | 0,85 | 0,08; 1,62 | 0,03 | 0,43 | -0,16; 1,02 | 0,15 |
| <i>Vv camada adventícia, n §</i> | 0,01 | -0,23; 0,26 | 0,91 | 0,001 | -0,27; 0,28 | 0,99 |

TAP: tecido adiposo perivascular; Coef: Coeficiente; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; Vv: *vasa vasorum*.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

A densidade dos linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca correlacionou-se positivamente com o aumento do tamanho da placa aterosclerótica em artérias coronárias. O aumento de cada unidade de linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ aumentou em média 36,78% a porcentagem de obstrução arterial ($\beta= 36,78$, IC 95%= 16,39; 57,17, e $p=0,001$) e aumentou em média 575 μm a medida média da EIM ($\beta= 574,78$, IC 95%= 266,01; 883,56, e $p<0,001$). Entretanto, o intervalo de confiança é largo em ambos resultados, dificultando a interpretação do tamanho do efeito na população real (Tabela 13).

Em contrapartida, o aumento da densidade de linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ associou-se com um menor percentual de área de CML ocupada na placa aterosclerótica ($\beta= -5,65$, IC 95%= -9,72; -1,58, e $p=0,006$). Além disso, também se associou com o aumento em média de 3,66% da área calcificada na placa aterosclerótica ($\beta= 3,66$; IC 95%= 1,08; 6,24, e $p=0,005$) (Tabela 14).

Tabela 13. Correlação entre a densidade dos linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca com aterosclerose em artérias coronárias (n=226 segmentos arteriais).

| Densidade dos linfócitos Treg CD45RO ⁺ FoxP3 ⁺ (células 10 ⁻⁵ /um ²) | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | |
|---|-------------------|----------------|--------|------------------|----------------|--------|
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%)</i> † | 41,69 | 17,63; 65,75 | 0,001 | 36,78 | 16,39; 57,17 | 0,001 |
| <i>EIM, μm</i> † | 631,96 | 346,47; 917,45 | <0,001 | 574,78 | 266,01; 883,56 | <0,001 |
| <i>Colágeno, (%)</i> ‡ | 0,32 | -0,78; 1,43 | 0,56 | 0,46 | -0,85; 1,79 | 0,48 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%)</i> ‡ | -4,76 | -9,23; -0,28 | 0,03 | -5,65 | -9,72; -1,58 | 0,006 |
| <i>Capa Fibrosa, (%)</i> † | -0,90 | -7,40; 5,60 | 0,78 | -2,41 | -10,33; 5,50 | 0,54 |
| <i>ECF mínima, μm</i> ‡ | -0,20 | -1,01; 0,59 | 0,61 | -0,20 | -0,93; 0,52 | 0,57 |
| <i>Calcificação, (%)</i> ‡ | 1,54 | 0,21; 2,86 | 0,02 | 3,66 | 1,08; 6,24 | 0,005 |
| <i>Lipídio, (%)</i> † | 7,75 | -13,28; 28,79 | 0,46 | 5,14 | -17,27; 27,56 | 0,64 |
| <i>Necrose, (%)</i> ‡ | 3,40 | -1,27; 8,09 | 0,15 | 4,39 | -1,22; 10,00 | 0,12 |
| <i>Hemorragia Intraplaca, (%)</i> ‡ | 0,46 | -5,51; 6,44 | 0,87 | -2,65 | -6,39; 1,07 | 0,16 |
| <i>Vv camada íntima, n</i> § | -0,04 | -3,15; 3,05 | 0,97 | -0,70 | -3,89; 2,49 | 0,66 |
| <i>Vv camada média, n</i> § | 1,91 | 0,29; 3,53 | 0,02 | 0,87 | -0,87; 2,61 | 0,32 |
| <i>Vv camada adventícia, n</i> § | 0,08 | -0,53; 0,69 | 0,79 | 0,10 | -0,60; 0,81 | 0,77 |

TAP: tecido adiposo perivascular; Coef: Coeficiente; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; Vv: *vasa vasorum*.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

Nós calculamos a razão da densidade dos linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ com a densidade de linfócitos T CD45RO⁺FoxP3⁻ quantificados na mesma lâmina para investigar se o aumento da proporção de linfócitos da linhagem predominantemente com ação ateroprotetora e reparadora em relação aos linfócitos T de modo geral se correlaciona com a aterosclerose em artérias coronárias. Encontramos que o aumento da proporção da densidade de linfócitos Tregs CD45RO⁺FoxP3⁺ em relação aos linfócitos T CD45RO⁺FoxP3⁻ no TAP peri-placa, se correlacionou positivamente com o aumento da EIM e negativamente com a área ocupada pela CML na área da placa aterosclerótica, conforme observado na análise dos linfócitos Treg isoladamente (Tabela 14). Nesta análise, encontramos ainda que o aumento da proporção dos linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ correlacionou com o aumento em média de 5,79% da área da capa fibrosa ocupada na placa aterosclerótica ($\beta= 5,79$, IC 95%= 2,17; 9,41, e $p=0,002$) e com o aumento em média de 8,67% da área de lipídio ($\beta= 8,67$, IC 95%= 1,02; 16,31, e $p=0,02$) (Tabela 14).

Tabela 14. Correlação entre a razão das densidades dos linfócitos Treg/T no TAP periplaca com aterosclerose em artérias coronárias (n=224 segmentos arteriais).

| Densidade da Razão de linfócitos Treg/T (células 10 ⁻⁵ /um ²) | <u>Modelo Univariado</u> | | | <u>Modelo Ajustado*</u> | | |
|--|--------------------------|---------------|-------|-------------------------|---------------|-------|
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%) †</i> | 5,16 | -4,50; 14,82 | 0,29 | 4,06 | -5,13; 13,27 | 0,38 |
| <i>EIM, µm †</i> | 153,95 | 52,85; 255,05 | 0,003 | 145,61 | 48,99; 242,22 | 0,004 |
| <i>Colágeno, (%) ‡</i> | 0,16 | -0,17; 0,50 | 0,34 | 0,16 | -0,26; 0,60 | 0,45 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%) ‡</i> | -1,06 | -2,38; 0,26 | 0,11 | -2,16 | -3,70; -0,62 | 0,006 |
| <i>Capa Fibrosa, (%) †</i> | 5,77 | 2,20; 9,33 | 0,002 | 5,79 | 2,17; 9,41 | 0,002 |
| <i>ECF mínima, µm ‡</i> | -0,22 | -0,89; 0,43 | 0,49 | -0,20 | -0,77; 0,37 | 0,49 |
| <i>Calcificação, (%) ‡</i> | 0,40 | -0,39; 1,21 | 0,32 | 1,06 | -0,11; 2,24 | 0,07 |
| <i>Lipídio, (%) †</i> | 9,09 | 1,51; 16,67 | 0,01 | 8,67 | 1,02; 16,31 | 0,02 |
| <i>Necrose, (%) ‡</i> | 0,03 | -1,37; 1,44 | 0,96 | -0,04 | -1,58; 1,50 | 0,95 |
| <i>Hemorragia Intraplaca, (%) ‡</i> | 0,37 | -1,21; 1,96 | 0,64 | 0,10 | -1,16; 1,37 | 0,87 |
| <i>Vv camada íntima, n §</i> | 0,10 | -0,78; 0,98 | 0,82 | 0,11 | -0,74; 0,96 | 0,79 |
| <i>Vv camada média, n §</i> | 0,14 | -0,70; 0,99 | 0,73 | 0,39 | -0,49; 1,28 | 0,38 |
| <i>Vv camada adventícia, n §</i> | -0,12 | -0,46; 0,21 | 0,48 | -0,12 | -0,45; 0,20 | 0,45 |

TAP: tecido adiposo perivascular; Coef: Coeficiente; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

Nós fizemos a razão da densidade dos linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺, pró-inflamatória, com a densidade de linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺, anti-inflamatória e reparadora, para investigar a linhagem predominante. Encontramos que o aumento de linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ em relação aos linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca se correlacionou com o aumento discreto da área ocupada por colágeno ($\beta= 0,01$, IC 95%= 0,004; 0,02, e p=0,003). Além disso, a predominância de linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ culminou na diminuição do número absoluto de *vasa vasorum* na camada média das artérias coronárias no

seguimento da placa mais importante dentre toda a sua trajetória ($\beta = -0,13$, IC 95% = $-0,023$; $-0,02$, $p = 0,01$), mas também com um tamanho de efeito pequeno (Tabela 15).

Tabela 15. Correlação entre a razão das densidades dos linfócitos Th1/Tregs no TAP peri-placa com aterosclerose em artérias coronárias (n=161 segmentos arteriais).

| Densidade da Razão de linfócitos TH1/Tregs (células $10^{-5}/\mu\text{m}^2$) | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | |
|---|-------------------|--------------|-------|------------------|--------------|-------|
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%)</i> † | 0,21 | -0,08; 0,51 | 0,15 | 0,15 | -0,11; 0,41 | 0,25 |
| <i>EIM, μm</i> † | 2,82 | -1,17; 6,83 | 0,16 | 2,89 | -1,03; 6,82 | 0,14 |
| <i>Colágeno, (%)</i> ‡ | 0,01 | 0,003; 0,02 | 0,004 | 0,01 | 0,004; 0,02 | 0,003 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%)</i> ‡ | -0,05 | -0,12; 0,008 | 0,08 | -0,02 | -0,11; 0,05 | 0,51 |
| <i>Capa Fibrosa, (%)</i> † | -0,05 | -0,18; 0,07 | 0,43 | -0,06 | -0,19; 0,07 | 0,36 |
| <i>ECF mínima, μm</i> ‡ | 0,003 | -0,02; 0,03 | 0,77 | -0,005 | -0,02; 0,01 | 0,54 |
| <i>Calcificação, (%)</i> ‡ | -0,002 | -0,02; 0,02 | 0,87 | 0,01 | -0,01; 0,04 | 0,29 |
| <i>Lipídio, (%)</i> † | 0,03 | -0,19; 0,26 | 0,74 | -0,02 | -0,27; 0,23 | 0,86 |
| <i>Necrose, (%)</i> ‡ | -0,02 | -0,07; 0,01 | 0,23 | -0,03 | -0,10; 0,02 | 0,24 |
| <i>Hemorragia Intraplaca, (%)</i> ‡ | -0,007 | -0,05; 0,03 | 0,74 | -0,01 | -0,04; 0,01 | 0,35 |
| <i>Vv camada íntima, n</i> § | -0,01 | -0,03; 0,01 | 0,49 | -0,006 | -0,04; 0,02 | 0,72 |
| <i>Vv camada média, n</i> § | -0,11 | -0,19; -0,03 | 0,005 | -0,13 | -0,23; -0,02 | 0,01 |
| <i>Vv camada adventícia, n</i> § | 0,0001 | -0,01; 0,01 | 0,98 | -0,004 | -0,01; 0,008 | 0,52 |

TAP: tecido adiposo perivascular; Coef: Coeficiente; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para-erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

5.3.2 Placas Ateroscleróticas Estáveis e Instáveis

As placas de aterosclerose coronariana amostradas foram classificadas em placas estáveis e instáveis de acordo com a análise histopatológica. As densidades dos linfócitos no TAP foram

comparadas nas placas instáveis (i.e., presença de trombo e/ou hemorragia intraplaca) em relação às placas estáveis (categoria de referência).

Nenhuma associação foi encontrada entre placas instáveis e estáveis nas artérias coronárias com a densidade de linfócitos Th CD4⁺ CXCR3⁻, linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺, razão de linfócitos Th1 com Th, e a diferença entre a densidade destes no TAP periplaca com TAP controle (Tabela 16).

Tabela 16. Associação das densidades dos linfócitos Th CD4⁺ CXCR3⁻ e Th1 CD4⁺CXCR3⁺ TAP com placas estáveis e instáveis em artérias coronárias (n=191 segmentos arteriais).

| Densidade dos linfócitos (células 10 ⁵ /um ²) | <u>Modelo Univariado</u> | | | <u>Modelo Ajustado*</u> | | |
|--|--------------------------|-------------|------|-------------------------|-------------|------|
| | OR | IC 95% | p | OR | IC 95% | p |
| <i>Linfócitos Th CD4⁺</i> | | | | | | |
| <i>. Placas instáveis</i> | 1,03 | 0,83; 1,27 | 0,76 | 1,03 | 0,81; 1,30 | 0,78 |
| <i>Linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺</i> | | | | | | |
| <i>. Placas instáveis</i> | 2,62 | 0,58; 11,76 | 0,20 | 2,80 | 0,60; 12,92 | 0,18 |
| <i>Razão dos linfócitos Th1/Th</i> | | | | | | |
| <i>. Placas instáveis</i> | 1,52 | 0,30; 7,56 | 0,60 | 1,66 | 0,30; 9,00 | 0,55 |
| <i>Diferença da densidade de Linfócitos Th CD4⁺ entre TAP periplaca e controle</i> | | | | | | |
| <i>. Placas instáveis</i> | 1,13 | 0,83; 1,53 | 0,43 | 1,12 | 0,80; 1,58 | 0,49 |
| <i>Diferença da densidade de Linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ entre TAP periplaca e controle</i> | | | | | | |
| <i>. Placas instáveis</i> | 0,95 | 0,86; 1,04 | 0,28 | 0,93 | 0,84; 1,04 | 0,22 |

TAP: tecido adiposo perivascular; IC: intervalo de confiança; OR: "Odds Ratio".

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão logística com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo. Categoria de referência: placas com lesões estáveis.

Nenhuma associação para placas instáveis em relação às placas estáveis também não foi encontrada para a densidade dos linfócitos T CD45RO⁺ FoxP3⁻ e Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ (Tabela 17). E também nenhuma associação foi entrada na razão entre a densidade de linfócitos Th1 com Treg (Tabela 18).

Tabela 17. Associação das densidades dos linfócitos T CD45RO⁺ FoxP3⁻ e Treg CD45RO⁺ FoxP3⁺ TAP com placas estáveis e instáveis em artérias coronárias (n=226 segmentos arteriais).

| Densidade dos linfócitos (células 10 ⁵ /um ²) | <u>Modelo Univariado</u> | | | <u>Modelo Ajustado*</u> | | |
|---|--------------------------|--------------|------|-------------------------|-------------|------|
| | OR | IC 95% | p | OR | IC 95% | p |
| Linfócitos T CD45RO⁺ | | | | | | |
| . Placas instáveis | 1,56 | 0,67; 3,62 | 0,29 | 1,49 | 0,64; 3,43 | 0,34 |
| Linfócitos Treg CD45RO⁺ FoxP3⁺ | | | | | | |
| . Placas instáveis | 1,14 | 0,05; 23,25 | 0,93 | 0,86 | 0,05; 13,54 | 0,91 |
| Razão dos linfócitos Treg/T | | | | | | |
| . Placas instáveis | 0,92 | 0,41; 2,07 | 0,84 | 0,83 | 0,36; 1,92 | 0,67 |
| Diferença Linfócitos T CD45RO⁺ entre TAP peri-placa e controle | | | | | | |
| . Placas instáveis | 1,34 | 0,54; 3,35 | 0,51 | 1,10 | 0,55; 2,18 | 0,77 |
| Diferença Linfócitos Treg CD45RO⁺ FoxP3⁺ entre TAP peri-placa e controle | | | | | | |
| . Placas instáveis | 6,05 | 0,15; 239,72 | 0,33 | 3,34 | 0,15; 72,70 | 0,44 |

TAP: tecido adiposo perivasculare; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; OR: Odds Ratio.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão logística com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo. Categoria de referência: placas com lesões estáveis.

Tabela 18. Associação da razão das densidades dos linfócitos Th1 CD4⁺ CXCR3⁺ e Treg CD45RO⁺ FoxP3⁺ no TAP com placas instáveis em artérias coronárias (n=161 segmentos arteriais).

| Razão da Densidade dos linfócitos Th1/Treg (células 10 ⁵ /um ²) | <u>Modelo Univariado</u> | | | <u>Modelo Ajustado*</u> | | |
|--|--------------------------|------------|------|-------------------------|------------|------|
| | OR | IC 95% | p | OR | IC 95% | p |
| . Placas instáveis | 1,01 | 0,97; 1,03 | 0,59 | 1,01 | 0,98; 1,04 | 0,46 |

TAP: tecido adiposo perivasculare; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; OR: Odds Ratio.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão logística com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo. Categoria de referência: placas com lesões estáveis.

5.3.2.1 Análise de Sensibilidade: estratificação entre placas ateroscleróticas estáveis e instáveis

Na análise estratificada, realizamos a correlação entre a densidade de linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ e Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca com as medidas morfométricas e composição de placa de aterosclerose nas artérias coronárias separadamente para lesões estáveis e instáveis.

A densidade dos linfócitos Th1 pró-inflamatórios no TAP periplaca associou-se com a composição de placa somente em placas instáveis. Nós encontramos que o aumento da densidade de linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ correlacionou negativamente, ou seja, o aumento da densidade de linfócitos Th1 foi associado com a diminuição da EIM ($\beta = -192,20$, IC 95% = -355,08; -29,32, e $p=0,02$), embora com intervalo de confiança largo (Tabela 19).

Além disso, o aumento da densidade de linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ no TAP periplaca foi associado com uma redução da área de calcificação. Para cada aumento da unidade de linfócitos Th1 (célula $10^{-5}/\mu\text{m}^2$) houve uma diminuição, em média, de -2,67% ($\beta = -2,67$, IC 95% = -4,35; -0,99, e $p=0,002$). Observamos também que o aumento da densidade de linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ foi associado com um aumento do número absoluto de *vasa vasorum* na camada média das artérias coronárias ($\beta = 0,97$; 0,07; 1,86, $p=0,03$) (Tabela 19).

Por outro lado, a densidade dos linfócitos Tregs CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca se associaram a componentes de placa de aterosclerose em ambas as placas estáveis e instáveis, porém majoritariamente em placas estáveis (Tabela 20).

Nas placas estáveis se associaram com o tamanho da placa aterosclerótica. O aumento da densidade de linfócitos Tregs CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca correlacionou positivamente com o aumento da obstrução arterial ($\beta = 56,42$, IC 95% = 34,42; 78,50, e $p<0,001$) e com o aumento da EIM em sua medida média ($\beta = 687,58$, IC 95% = 351,14; 1024,03, e $p<0,001$), embora, principalmente a medida de EIM obteve um intervalo de confiança largo. Já com os

componentes de placa de aterosclerose, o aumento de linfócitos Tregs CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca se associou com a diminuição da área ocupada por CML, reduzindo em média 5,59% a cada aumento de uma unidade da densidade de linfócitos Treg ($\beta = -5,59$, IC 95% = -9,29; -1,90, e $p=0,003$). Além disso, observamos também que o aumento de linfócitos Treg se associou com o aumento da área ocupada por calcificação com uma média de aumento de 9,58% da área calcificada ($\beta = 9,58$, IC 95% = 3,93; 15,23, e $p=0,001$). E finalmente, ainda nas placas estáveis, encontramos uma correlação positiva com o número absoluto de *vasa vasorum* na camada média, com um aumento em média de 1,92 vasos a cada aumento da densidade de linfócitos Treg no TAP ($\beta = 1,92$, IC 95% = 0,11; 3,74, e $p=0,03$) e com o aumento também de *vasa vasorum* na camada adventícia ($\beta = 0,66$, IC 95% = 0,06; 1,27, $p=0,03$) (Tabela 20).

Nas placas instáveis, densidade de linfócitos Tregs CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca se correlacionou negativamente com a área ocupada por colágeno ($\beta = -1,35$, IC 95% = -2,18; 0,52, e $p=0,001$). O aumento de linfócitos Tregs CD45RO⁺FoxP3⁺ se correlacionou com o aumento da área de necrose na placa aterosclerótica ($\beta = 8,06$, IC 95% = 2,44; 13,68, e $p=0,005$) (Tabela 20).

Tabela 19. Comparação da correlação da densidade dos linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ no TAP periplaca com aterosclerose coronariana entre seguimentos arteriais com e sem placas instáveis (n=161 segmentos arteriais).

| Densidade de linfócitos Th1 CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ (células 10 ⁻⁵ /um ²) | Placas estáveis (n=128 artérias coronárias) | | | | | | Placas instáveis (n=63 artérias coronárias) | | | | | |
|--|---|-----------------|-------|------------------|-----------------|------|---|-----------------|--------|------------------|-----------------|-------|
| | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | |
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%)</i> † | 4,18 | -9,10; 17,47 | 0,53 | 1,41 | -14,39; 17,22 | 0,85 | -14,49 | -35,46; 6,46 | 0,16 | -21,10 | -43,28; 1,07 | 0,06 |
| <i>EIM, µm</i> † | 122,31 | -118,90; 363,53 | 0,31 | 89,12 | -155,51; 333,76 | 0,46 | -213,55 | -415,83; -11,27 | 0,03 | -192,20 | -355,08; -29,32 | 0,02 |
| <i>Colágeno, (%)</i> ‡ | 0,57 | -0,32; 1,47 | 0,20 | 0,76 | -0,30; 1,82 | 0,16 | 0,20 | -0,001; 0,40 | 0,05 | 0,07 | -0,12; 0,27 | 0,45 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%)</i> ‡ | -0,59 | -1,90; 0,72 | 0,37 | 0,07 | -1,94; 2,09 | 0,94 | | ∅ | | | ∅ | |
| <i>Capa Fibrosa, (%)</i> † | 0,99 | -5,54; 7,53 | 0,76 | -0,007 | -7,28; 7,27 | 0,99 | -4,56 | -8,93; -0,18 | 0,042 | -5,91 | -14,62; 2,80 | 0,17 |
| <i>ECF mínima, µm</i> ‡ | -0,85 | -1,46; -0,23 | 0,007 | -0,46 | -0,94; 0,02 | 0,06 | 0,26 | -0,03; 0,57 | 0,08 | 0,32 | -0,29; 0,94 | 0,31 |
| <i>Calcificação, (%)</i> ‡ | -0,25 | -1,79; 1,27 | 0,74 | 0,03 | -2,28; 2,35 | 0,97 | -2,85 | -4,28; -1,42 | <0,001 | -2,67 | -4,35; -0,99 | 0,002 |
| <i>Lipídio, (%)</i> † | 5,93 | -4,18; 16,04 | 0,24 | 4,31 | -8,23; 16,86 | 0,49 | 8,004 | -0,38; 16,39 | 0,06 | 8,56 | -1,95; 19,07 | 0,10 |
| <i>Necrose, (%)</i> ‡ | -0,05 | -1,56; 1,45 | 0,94 | 2,30 | -0,50; 5,11 | 0,10 | -0,95 | -2,94; 1,03 | 0,34 | -1,22 | -3,43; 0,99 | 0,28 |
| <i>Vv camada íntima, n</i> § | 1,08 | -0,51; 2,69 | 0,18 | 1,54 | -0,65; 3,75 | 0,17 | 0,56 | -1,26; 2,40 | 0,54 | 0,71 | -0,63; 2,05 | 0,30 |
| <i>Vv camada média, n</i> § | -1,08 | -4,26; 2,08 | 0,50 | -1,96 | -8,78; 4,85 | 0,57 | 1,04 | -0,40; 2,48 | 0,15 | 0,97 | 0,07; 1,86 | 0,03 |
| <i>Vv camada adventícia, n</i> § | -0,13 | -0,59; 0,32 | 0,56 | -0,08 | -0,55; 0,38 | 0,71 | 0,02 | -0,44; 0,50 | 0,91 | 0,01 | -0,58; 0,61 | 0,96 |

TAP: tecido adiposo perivasculare; Coef: Coeficiente; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; Vv: *vasa vasorum*.

∅ Ausência de observações que contenham percentual de área de CML.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

Tabela 20. Comparação da correlação da densidade dos linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca com aterosclerose coronariana entre seguimentos arteriais com e sem placas instáveis (n=226 segmentos arteriais).

| Densidade de linfócitos Treg (células 10 ⁻⁵ /um ²) | Placas estáveis (n=159 artérias coronárias) | | | | | | Placas instáveis (n=67 artérias coronárias) | | | | | |
|---|---|----------------|--------|------------------|-----------------|--------|---|-----------------|------|------------------|------------------|-------|
| | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | |
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%) †</i> | 57,16 | 32,06; 82,25 | <0,001 | 56,46 | 34,42; 78,50 | <0,001 | -4,01 | -38,80; 30,78 | 0,81 | 7,13 | -29,73; 44,01 | 0,69 |
| <i>EIM, µm †</i> | 674,43 | 414,66; 934,21 | <0,001 | 687,58 | 351,14; 1024,03 | <0,001 | 489,46 | -29,06; 1007,98 | 0,06 | 400,81 | -228,11; 1029,74 | 0,20 |
| <i>Colágeno, (%) ‡</i> | 1,02 | -0,63; 2,69 | 0,22 | 1,44 | -0,20; 3,10 | 0,08 | -0,94 | -1,90; 0,02 | 0,05 | -1,35 | -2,18; -0,52 | 0,001 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%) ‡</i> | -4,66 | -8,93; -0,39 | 0,03 | -5,59 | -9,29; -1,90 | 0,003 | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ | ∅ |
| <i>Capa Fibrosa, (%) †</i> | -1,56 | -6,83; 3,70 | 0,55 | -3,56 | -11,67; 4,55 | 0,38 | 13,41 | -24,19; 51,03 | 0,47 | 13,39 | -35,09; 61,87 | 0,57 |
| <i>ECF mínima, µm ‡</i> | -0,37 | -1,25; 0,49 | 0,39 | -0,35 | -1,02; 0,31 | 0,29 | 1,64 | -0,46; 3,75 | 0,12 | 2,14 | -0,20; 4,50 | 0,07 |
| <i>Calcificação, (%) ‡</i> | 1,85 | -0,26; 3,97 | 0,08 | 9,58 | 3,93; 15,23 | 0,001 | 1,06 | -0,52; 2,65 | 0,18 | -0,69 | -3,08; 1,68 | 0,56 |
| <i>Lipídio, (%) †</i> | 13,51 | -13,91; 40,94 | 0,32 | 10,20 | -13,59; 33,99 | 0,39 | -8,17 | -38,05; 21,71 | 0,58 | -8,82 | -45,27; 27,62 | 0,62 |
| <i>Necrose, (%) ‡</i> | 3,01 | -6,46; 12,48 | 0,53 | 5,85 | -6,75; 18,47 | 0,36 | 3,50 | -0,92; 7,93 | 0,12 | 8,06 | 2,44; 13,68 | 0,005 |
| <i>Vv camada íntima, n §</i> | 1,27 | -0,99; 3,54 | 0,27 | 2,86 | -0,75; 6,48 | 0,12 | -0,81 | -5,89; 4,26 | 0,75 | -2,22 | -7,69; 3,23 | 0,42 |
| <i>Vv camada média, n §</i> | 1,92 | 0,55; 3,30 | 0,006 | 1,92 | 0,11; 3,74 | 0,03 | 2,06 | -0,60; 4,73 | 0,12 | 0,93 | -2,31; 4,18 | 0,57 |
| <i>Vv camada adventícia, n §</i> | 0,50 | -0,0003; 1,003 | 0,05 | 0,66 | 0,06; 1,27 | 0,03 | -0,98 | -2,44; 0,47 | 0,18 | -0,24 | -2,06; 1,56 | 0,78 |

TAP: tecido adiposo perivascular; Coef: Coeficiente; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; Vv: *vasa vasorum*.

∅ Ausência de observações que contenham percentual de área de CML.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

5.2.3 Análise da diferença entre TAP periplaca e controle

Realizamos a análise da diferença subtraindo a densidade dos linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ no TAP periplaca com a densidade dos linfócitos Th1 no TAP controle. O mesmo foi feito com a densidade dos linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺, para identificar se a inflamação no TAP se restringe somente à área imediatamente adjacente ao seguimento da artéria coronária com a lesão mais importante, ou se a inflamação é difusa no TAP ao longo de todo o trajeto da artéria coronária.

A densidade de linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ foi maior no TAP periplaca comparada à região controle em associação com o aumento percentual da área ocupada pela capa fibrosa na placa aterosclerótica ($\beta = 0,43$, IC 95% = 0,11; 0,74, e $p = 0,008$). Além disso, a maior densidade de linfócitos Th1 no TAP periplaca em relação à região controle foi associada com uma diminuição no percentual da área de hemorragia intraplaca nas artérias coronárias ($\beta = -0,12$; IC 95% = -0,19; -0,04, e $p = 0,001$), embora um tamanho de efeito muito pequeno (Tabela 21).

Tabela 21. Correlação entre a diferença das densidades dos linfócitos Th1 CD4⁺CXCR3⁺ no TAP periplaca e região controle com aterosclerose em artérias coronárias (n=143 segmentos arteriais).

| Diferença e linfócitos TH1 CD4 ⁺ CXCR3 ⁺ entre TAP periplaca e controle (células 10 ⁻⁵ /um ²) | <u>Modelo Univariado</u> | | | <u>Modelo Ajustado*</u> | | |
|--|--------------------------|---------------|------|-------------------------|---------------|-------|
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%)</i> † | 0,10 | -0,92; 1,14 | 0,83 | 0,21 | -0,94; 1,37 | 0,71 |
| <i>EIM, μm</i> † | -0,13 | -16,35; 16,07 | 0,98 | -0,15 | -15,70; 15,40 | 0,98 |
| <i>Colágeno, (%)</i> ‡ | -0,001 | -0,03; 0,03 | 0,97 | 0,005 | -0,04; 0,05 | 0,83 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%)</i> ‡ | 0,03 | -0,13; 0,2002 | 0,68 | 0,03 | -0,22; 0,28 | 0,80 |
| <i>Capa Fibrosa, (%)</i> † | 0,37 | 0,02; 0,71 | 0,03 | 0,43 | 0,11; 0,74 | 0,008 |
| <i>ECF mínima, μm</i> ‡ | 0,01 | -0,01; 0,05 | 0,32 | 0,006 | -0,01; 0,03 | 0,60 |
| <i>Calcificação, (%)</i> ‡ | -0,01 | -0,07; 0,04 | 0,60 | 0,009 | -0,05; 0,07 | 0,76 |
| <i>Lipídio, (%)</i> † | 0,30 | -0,12; 0,73 | 0,15 | 0,37 | -0,15; 0,89 | 0,16 |
| <i>Necrose, (%)</i> ‡ | -0,01 | -0,06; 0,03 | 0,59 | -0,003 | -0,08; 0,08 | 0,93 |
| <i>Hemorragia Intraplaca, (%)</i> ‡ | -0,04 | -0,10; 0,01 | 0,13 | -0,12 | -0,19; -0,04 | 0,001 |

| | | | | | | |
|----------------------------------|-------|-------------|------|-------|-------------|------|
| <i>Vv camada íntima, n §</i> | 0,14 | -0,12; 0,41 | 0,28 | 0,05 | -0,17; 0,27 | 0,63 |
| <i>Vv camada média, n §</i> | 0,13 | -0,22; 0,49 | 0,46 | 0,14 | -0,46; 0,76 | 0,64 |
| <i>Vv camada adventícia, n §</i> | 0,008 | -0,01; 0,02 | 0,42 | 0,004 | -0,01; 0,02 | 0,69 |

TAP: tecido adiposo perivasculares; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; Coef: Coeficiente; Vv: *vasa vasorum*.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

A densidade de linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ foi maior no TAP periplaca comparada à região controle em associação com o aumento do número absoluto de *vasa vasorum* na camada média ($\beta = 1,55$, IC 95% = 0,04; 3,07, e $p = 0,043$). Não encontramos nenhuma diferença entre a densidade de linfócitos Treg no TAP periplaca e controle em associação com os demais componentes de placa de aterosclerose e medidas morfométricas nas artérias coronárias (Tabela 22).

Tabela 22. Correlação entre a diferença das densidades dos linfócitos Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca e região controle com aterosclerose em artérias coronárias (n=171 segmentos arteriais).

| Diferença e linfócitos Treg CD45RO ⁺ FoxP3 ⁺ entre TAP periplaca e controle (células 10 ⁻⁵ /um ²) | Modelo Univariado | | | Modelo Ajustado* | | |
|--|-------------------|-----------------|------|------------------|-----------------|------|
| | Coef. | IC 95% | p | Coef. | IC 95% | p |
| <i>Obstrução Arterial, (%)</i> † | 20,76 | -20,02; 61,55 | 0,31 | 17,30 | -21,63; 56,23 | 0,37 |
| <i>EIM, µm</i> † | 132,78 | -583,47; 849,03 | 0,71 | 119,64 | -450,77; 690,06 | 0,67 |
| <i>Colágeno, (%)</i> ‡ | 0,45 | -1,08; 1,99 | 0,55 | 0,65 | -1,39; 2,70 | 0,52 |
| <i>Célula Muscular Lisa, (%)</i> ‡ | -1,29 | -4,98; 2,38 | 0,49 | -3,79 | -8,45; 0,86 | 0,11 |
| <i>Capa Fibrosa, (%)</i> † | 4,38 | -7,31; 16,08 | 0,45 | 4,88 | -8,51; 18,27 | 0,46 |
| <i>ECF mínima, µm</i> ‡ | 1,06 | 0,05; 2,07 | 0,04 | 0,48 | -0,49; 1,47 | 0,33 |
| <i>Calcificação, (%)</i> ‡ | 0,40 | -1,49; 2,30 | 0,67 | 2,36 | -0,69; 5,41 | 0,12 |
| <i>Lipídio, (%)</i> † | -13,81 | -39,44; 11,81 | 0,28 | -16,10 | -43,43; 11,21 | 0,24 |
| <i>Necrose, (%)</i> ‡ | 2,04 | -1,35; 5,44 | 0,23 | 0,60 | -5,50; 6,71 | 0,84 |

| | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|-------------|--------|-------|-------------|-------|
| Hemorragia Intraplaca, (%) ‡ | 2,32 | -2,43; 7,07 | 0,33 | -1,15 | -5,12; 2,80 | 0,56 |
| Vv camada íntima, n § | 0,51 | -2,21; 3,24 | 0,71 | -0,39 | -3,52; 2,73 | 0,80 |
| Vv camada média, n § | 2,37 | 1,13; 3,62 | <0,001 | 1,55 | 0,04; 3,07 | 0,043 |
| Vv camada adventícia, n § | -0,04 | -0,94; 0,84 | 0,91 | -0,30 | -1,38; 0,78 | 0,58 |

TAP: tecido adiposo perivascular; IC: intervalo de confiança; EIM: Espessura Íntima-Média; ECF: espessura de capa fibrosa; Coef: Coeficiente; Vv: *vasa vasorum*.

* Modelo ajustado para idade, sexo, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, índice de massa corpórea, sedentarismo, alcoolismo e tabagismo.

† Regressão linear com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

‡ Regressão de binômio negativo com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

§ Regressão de Poisson com ajuste para erros padrões robustos para medidas repetidas no mesmo indivíduo.

6. DISCUSSÃO

A discussão da investigação dos macrófagos polarizados no TAP periplaca com a aterosclerose coronariana já foi previamente realizada e publicada em artigo científico apresentado no capítulo de resultados.¹³⁷ Aqui discutiremos os resultados da associação entre o perfil inflamatório dos linfócitos T e a aterosclerose em artérias coronárias.

Ambas as linhagens pro-inflamatória Th1 CD4⁺CXCR3⁺ e anti-inflamatória/reparadora Treg CD45RO⁺FoxP3⁺ no TAP periplaca se correlacionaram com os componentes de placa de aterosclerose. A linhagem Th1 no TAP periplaca foi associada com aumento da área de colágeno e diminuição da calcificação na placa de aterosclerose. Embora não tenhamos encontrado nenhuma diferença na densidade de linfócitos Th1 no TAP periplaca entre placas estáveis e instáveis, na análise de sensibilidade a linhagem Th1 no TAP teve associações somente nas placas instáveis, apresentando diminuição da área de EIM, diminuição de calcificação e aumento de vasa vasorum na camada média.

A linhagem Treg no TAP periplaca se correlacionou com o aumento do tamanho da placa de aterosclerose, diminuição da área ocupada por CML e aumento de calcificação. Além disso, as associações com o tamanho da placa e diminuição de CML se mantiveram com o aumento da proporção de linfócitos Treg em relação às demais células T. Nenhuma diferença entre a densidade de linfócitos Treg no TAP periplaca entre placas estáveis e instáveis foi encontrada. Entretanto, na análise de sensibilidade, encontramos que as associações encontradas foram predominantes em placas estáveis com aumento do tamanho da placa de aterosclerose (EIM e porcentagem de obstrução), diminuição da área ocupada por CML, aumento de calcificação e aumento de *vasa vasorum* na camada média e adventícia. Nas placas instáveis, ao contrário da nossa hipótese, a linhagem Treg também teve correlação com a diminuição da área ocupada por colágeno e aumento da área de necrose nas placas ateroscleróticas em artérias coronárias.

Em nosso estudo prévio,⁴³ investigamos a correlação entre a densidade dos macrófagos CD68⁺, linfócitos T CD3⁺ e B CD20⁺ ativados no TAP periplaca com a porcentagem de obstrução

arterial e comparamos as densidades destas células no TAP periplaca adjacente entre placas ateroscleróticas estáveis e instáveis. Contudo, nenhuma correlação foi encontrada entre a densidade de linfócitos T CD3⁺ com a porcentagem de obstrução arterial em artérias coronárias. Também não encontramos nenhuma diferença entre o TAP adjacente às placas estáveis e instáveis,⁴³ conforme havíamos hipotetizado. Uma possível explicação é que marcador CD3⁺ é expresso em todas as células T ativadas,¹⁴⁴ incluindo linhagens com atuações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias sem diferenciá-las.⁴³ Hirata e colaboradores (2011)³⁶ encontraram maior densidade de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ no TAE de pacientes com DAC comparado com pacientes sem DAC. Também encontraram maior densidade destas células no TAE comparado com o tecido adiposo subcutâneo no mesmo indivíduo. Entretanto, esses achados foram investigados em outra linhagem de linfócitos T, não foi contemplada neste estudo. Os mesmos autores não encontraram diferença para os linfócitos Th CD4⁺ entre pacientes com DAC e sem DAC.³⁶ Em nosso estudo, o aumento da densidade de linfócitos Th CD4⁺ no TAP periplaca foi associado com uma diminuição da área ocupada pela capa fibrosa. Para os demais componentes de placa aterosclerótica e medidas morfométricas não encontramos nenhuma associação, assim como também não encontramos diferença entre as densidades quando comparamos placas estáveis e instáveis. Dessa forma, nossos resultados corroboram com o estudo prévio,³⁶ exceto pela correlação negativa com a área ocupada pela capa fibrosa. Essa divergência pode ser explicada pelas diversas linhagens que compõe este grupo celular, com atuações distintas tanto aterogênicas como ateroprotetora.⁹⁹ Além disso, alguns fatores devem ser considerados. Os objetivos propostos entre nossos estudo e de Hirata e colaboradores (2011) foram distintos.³⁶ O estudo prévio comparou a densidade de linfócitos Th CD4⁺ entre amostras de TAE de indivíduos com DAC submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio e sem DAC submetidos à cirurgia de troca de valva aórtica ou mitral.³⁶ Nosso estudo avaliou a associação entre linfócitos Th CD4⁺ com a área ocupada por cada componente da placa aterosclerótica e medidas morfométricas, contemplando os diversos estágios de desenvolvimento da placa aterosclerótica. Além disso, eles não realizaram a avaliação da linhagem dos linfócitos Th1 e Treg, linhagens com atuações mais específicas.

As amostras estudadas também têm origens diferentes. Estudos de autópsia permitem o acesso do TAP adjacente à placa aterosclerótica, que possui morfologia, propriedades funcionais^{126,128} e transcriptoma diferentes do TAE.¹²⁵ Nosso tamanho de amostra (n=82 indivíduos) foi muito superior comparado ao estudo prévio (pacientes com DAC= 8 e sem DAC=9).³⁶ Nosso estudo em material de autópsia permitiu também avaliar as quatro principais artérias coronárias. O número de campos avaliados no TAP foi superior, pois analisamos 20 campos aleatórios com 1500 µm de diâmetro, permitindo maior representatividade de cada amostra. A análise estatística foi mais adequada devido ao ajuste para medidas repetidas no mesmo indivíduo e principalmente pelo ajuste de possíveis variáveis de confusão, que não foi realizado previamente. Finalmente, a avaliação das artérias coronárias foi feita por método histopatológico, com a avaliação das medidas dos componentes de placa por medida direta no material coletado durante a autópsia.

No nosso melhor conhecimento, até esta data, não há estudos prévios em humanos que tenham investigado a associação da aterosclerose com as linhagens dos linfócitos Th1 e Treg no TAP. Diferentemente da densidade dos macrófagos no TAP, onde estudos prévios apresentaram forte evidência que a densidade é maior em pacientes com DAC em comparação aos controles. Além disso, os macrófagos no TAP também se correlacionam com o tamanho da placa, componentes de placa de aterosclerose relacionados à instabilidade, incluindo maior risco de trombo nas artérias coronárias.^{36,39,43,125,137,141,145-147}

Exames de imagem são incapazes de caracterizar quais células imunes estão ativas e atuantes no TAP, mas conseguem estimar se há ou não inflamação pela característica do tecido adiposo. FAI (*"fat attenuation index"*) é um método desenvolvido por Antonopoulos e colegas (2017)¹⁴⁸ que utiliza tomografia computadorizada reconstruída para avaliar a atenuação média ou redução de sinal do tecido adiposo dentro de um determinado volume. O tecido adiposo apresenta duas fases: (1) a primeira que é lipídica, no qual o adipócito é maduro com grande acúmulo de lipídio intracelular e a (2) fase aquosa, onde os adipócitos são menores, menos maduros com

menos lipídio intracelular. O método foi validado por estudo que utilizou *PET-scan* (Tomografia por Emissão de Pósitrons) com FDG (8F-Fluorodeoxiglicose) que avalia indiretamente o grau de inflamação. A inflamação foi validada por método histopatológico e por expressão gênica. O FAI obteve alta acurácia para diagnosticar inflamação no tecido adiposo (90% de sensibilidade e 100% de especificidade). O FAI do TAP apresenta valores mais negativos à medida que se afasta das artérias coronárias, evidenciando que os adipócitos adjacentes às artérias coronárias são menores e mais inflamadas, como já evidenciado por Chaterjee e colaboradores (2009) através de métodos histopatológicos.¹²⁶ Dessa forma, o TAP perivascular, e não o TAE, está relacionado a uma alta carga da placa e presença de DAC independente de idade, sexo, HAS, dislipidemia, diabetes, tabagismo, e volume do tecido adiposo torácico.¹⁴⁸

Nossos resultados estão em parte de acordo com os resultados desse estudo.¹⁴⁸ O FAI do TAP adjacente às lesões instáveis responsáveis por desencadear SCA foi maior comparado com o FAI de lesões estáveis em pacientes com até 72h de IAM.¹⁴⁸ É possível que esse aumento da inflamação adjacente às lesões instáveis seja pró-inflamatória, pois previamente mostramos que a densidade de macrófagos polarizados M1 foi associada ao maior risco de trombose coronariana e está correlacionada com características de placa relacionadas à instabilidade.¹³⁷ Aqui, o aumento da densidade de linfócitos Th1, também pró-inflamatórios, está associado à diminuição de calcificação, enquanto nas lesões estáveis não encontramos associação. Área de calcificação na placa aterosclerótica é uma característica relacionada à estabilidade da placa por ser secundária a uma resolução das células em apoptose e dos restos necróticos celulares.¹⁴⁹ Além disso, encontramos que o aumento da densidade de Treg no TAP está associado com componentes de placa relacionados à estabilidade em placas crônicas e estáveis. O mesmo foi encontrado para macrófagos polarizados M2,¹³⁷ sugerindo uma possível atuação supressora da inflamação. Outra evidência que suporta que nas lesões estáveis há uma supressão da atividade inflamatória é que o FAI adjacente às lesões culpadas reduziu significativamente após 5 semanas de IAM, enquanto nas lesões estáveis não houve diferença.¹⁵⁰ Resultados semelhantes foram encontrados em outro grande estudo.¹⁵¹ Essas evidências sugerem que ao redor das placas instáveis há uma inflamação

aguda e pró-inflamatória no TAP periplaca, da qual sugerimos que pode ser mediada por macrófagos com fenótipo M1¹³⁷ e linfócitos Th1.

Os linfócitos Th1 e Treg já foram investigados na placa de aterosclerose. Maior densidade de linfócitos Treg em placas estáveis foi encontrada em placas ateroscleróticas avançadas humanas de artérias carótidas amostradas por endarterectomia quando comparadas com placas vulneráveis. Os locais que mostraram maior densidade de linfócitos Treg foram na capa fibrosa e no ombro da placa. O ombro da placa é especialmente uma região que possui maior propensão de neovascularização e desse modo maior infiltração dos linfócitos.¹⁵² Embora não tenhamos feito correlação dos linfócitos Tregs entre TAP periplaca com Tregs na placa de aterosclerose, nossos achados podem ser biologicamente plausíveis, pois o aumento da proporção dos linfócitos Treg em relação aos linfócitos T foi correlacionado com um aumento da área da capa fibrosa nas artérias coronárias. As lesões estáveis,¹⁵² apresentaram maior expressão gênica associada aos linfócitos Treg como expressão de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10.¹⁵² Além disso, a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como INF- γ ,¹⁵² considerada assinatura dos linfócitos Th1,^{6,95} foi predominante nas placas ateroscleróticas consideradas vulneráveis.¹⁵² Apesar de não ser possível a comparação direta dos nossos achados com o estudo prévio,¹⁵² os resultados estão na mesma linha, uma vez que a densidade dos linfócitos Treg no TAP periplaca se correlacionaram com os componentes de aterosclerose coronariana, principalmente nas placas ateroscleróticas estáveis (tamanho da placa de aterosclerose, diminuição da área ocupada por CML e aumento de calcificação). Dessa forma, sugere-se que o fenótipo da placa de aterosclerose depende da classificação do seu estadiamento.

Pacientes com pelo menos duas artérias com estenose $\geq 50\%$, identificada por angiografia coronariana, tiveram maiores níveis de linfócitos Treg e de IL-10 no sangue periférico em comparação com pacientes pareados com o mesmo grau de lesões e com presença de SCA.¹⁰⁵ Embora o estudo tenha sido realizado em uma amostra pequena (23 pacientes com SCA e 21 pacientes controles), o resultado é similar a outro estudo¹⁵³ com uma amostra de 85 pacientes que

mostrou que o nível de linfócitos Treg no sangue periférico de pacientes com IAM ou angina instável é menor em comparação com pacientes com angina estável. Esses achados sugerem a possibilidade de que pacientes com eventos coronarianos agudos tenham uma redução sistêmica de linfócitos Treg, além da redução do número de linfócitos Treg na placa aterosclerótica. Em contrapartida, as placas ateroscleróticas em carótidas que apresentaram maior cluster de linfócitos Th1 foram associadas à eventos cerebrovasculares, mas não com a classificação da placa pela *American Heart Association*.¹⁵⁴ A diferença deste estudo prévio¹⁵⁴ com o nosso estudo pode ser explicada pelas diferenças de desenho. Apesar de ser uma amostra proveniente de uma coorte e a análise dos linfócitos ter sido feita através de análise de “*single-cell RNA sequencing*”, o corte deste estudo foi transversal com 23 pacientes que gerou uma amostra com 23 fragmentos de artérias carótidas na região da bifurcação.¹⁵⁴

Os estudos em humanos corroboram com os estudos de modelo animal em camundongos. Sharma e colaboradores (2020)¹⁵⁵ mostraram que placas ateroscleróticas em regressão têm um aumento da densidade de linfócitos Treg e uma diminuição de linfócitos Th1 comparada com placas progressivas. Além disso, bloqueio dos linfócitos Treg com tratamento de depleção de células CD25⁺ inibiu a regressão das placas ateroscleróticas e inibiu a diminuição dos linfócitos Th1, o que sugere que os linfócitos Treg têm um papel essencial na regressão da placa de aterosclerose. Esses resultados estão alinhados com o estudo prévio em placas ateroscleróticas humanas¹⁵² e em partes com nossos achados. Em placas estáveis não encontramos nenhuma associação entre a densidade de linfócitos Th1 no TAP periplaca com os componentes de placa de aterosclerose, mas encontramos para linfócitos Treg. Além disso, Sharma e colaboradores (2020)¹⁵⁵ encontraram que o aumento da densidade de macrófagos M2 nas placas ateroscleróticas em regressão parece depender dos linfócitos Treg, que pode ser explicada pela capacidade dos linfócitos Treg de conduzir a polarização dos macrófagos M2 através da secreção de IL-10 e TFG- β . Previamente, demonstramos que a maioria das correlações encontradas entre macrófagos M2 no TAP periplaca com os componentes da placa aterosclerótica também ocorreram em placas estáveis,¹³⁷ semelhante com os resultados linfócitos Treg no TAP neste

estudo. Dessa forma, é possível que os linfócitos Treg possam ter um papel crucial na imunossupressão da inflamação na placa de aterosclerose e no TAP periplaca alterando o fenótipo pró-inflamatório para anti-inflamatório/reparação tecidual. São necessários mais estudos translacionais para confirmar se os achados dos estudos em modelos animais se aplicam para seres humanos, porque os estudos em humanos não realizaram seguimento destes pacientes.^{152,155} Portanto não sabemos se as placas ateroscleróticas estáveis estavam estacionadas em fase de reparação tecidual/cicatrização, ou se poderiam estar em fase de regressão como em estudos de modelo animal.

Contrário à nossa hipótese, encontramos que, em placas instáveis, o aumento da densidade dos linfócitos Treg no TAP periplaca está associado com a diminuição da área de colágeno e aumento da área de necrose. Embora não tenham outros estudos com a mesma questão de pesquisa, resultados inesperados já foram encontrados em estudos prévios em humanos. Linfócitos Treg foram identificados em todos os estágios da placa de aterosclerose (i.e., grupo 1 lesões precoces; grupo 2 placas com fibroateroma; grupo 3 com lesões instáveis e vulneráveis) em artérias carótidas, femorais e aorta. Os autores não encontraram diferença entre a quantidade de linfócitos Treg entre os grupos de placas ateroscleróticas categorizadas de acordo com classificação da AHA (estágio I a VI), mas na comparação entre os três grupos, encontraram que as placas instáveis têm maior número em comparação com as lesões precoces.¹⁵⁶ O que sugere que nossos achados no TAP periplaca podem estar associados com componentes de placa instáveis. Importante ressaltar que os métodos em ambos os estudos foram similares e o mesmo marcador de superfície foi utilizado. Esses resultados podem ser explicados pela plasticidade dos linfócitos Treg. Os linfócitos Treg são considerados como células estáveis, mas estudo em modelo animal de Butcher e colaboradores (2016)¹⁵⁷ mostrou que ratos geneticamente manipulados para desenvolver aterosclerose tiveram altos níveis de Treg que produziram IFN- δ , mas não produziram no mesmo nível que os linfócitos Th1, enquanto em ratos saudáveis foi raro. Esses achados sugerem que o ambiente aterosclerótico pode formar células Treg IFN- δ^+ . Embora elas expressem FoxP3, elas não foram capazes que exercer a supressão da inflamação. Parece que

essas células sofrem plasticidade na própria placa aterosclerótica em respostas às citocinas. Essas células denominadas como “*Th1-like Treg*” ou “Th1/Treg” apresentam fenótipos das duas linhagens: FoxP3^{alto}, IFN- δ ^{intermediário-alto}, GIRT^{baixo}, CD25^{baixo}, PD-1^{alto}, Tbet^{baixo-intermediário}, CXCR3^{negativo-baixo}, CCR5^{alto} e entre outros. Dessa forma, as células “Th1/Treg” praticamente não expressam CXCR3. Análise “*single-cell RNA sequencing*” mostrou que os genes associados à imunossupressão estão pouco expressos e genes associados à linhagem Th1 estão expressos, assim como os genes relacionados à estabilidade destas células.¹⁵⁷ Estudos translacionais são necessários para validar esses achados em amostras humanas de placas ateroscleróticas e TAP periplaca. Ainda não sabemos se elas podem de fato acelerar o desenvolvimento da aterosclerose ou desestabilizar a placa, ou se as células Th1/Treg são apenas incapazes de suprimir a inflamação nas placas ateroscleróticas, mostrando que seu papel ainda é incerto.¹⁵⁷

Linfócitos Th1/Treg foram identificados em sangue periférico humano em um estudo mais recente. Kimura e colaboradores (2018)¹⁵⁸ identificaram que mulheres saudáveis sem aterosclerose subclínica apresentavam Treg “saudáveis”, mas mulheres com aterosclerose subclínica, avaliada através da medida de EIM por ultrassom, apresentaram linfócitos Th1/Treg no sangue periférico. Todavia, o achado mais interessante deste estudo é que células Treg de humanos e camundongos reconhecem a Alipoproteína B (ApoB) peptídeo 18 (p18).¹⁵⁸ A maioria dos anticorpos são dirigidos a epítomos específicos do LDL oxidado, mas as células Th CD4⁺ são capazes de reconhecer a ApoB, a proteína central do LDL, em modelo animal e em humanos.¹⁵⁹ Como as células Treg conseguem identificar o antígeno específico p18 da ApoB, os autores desenvolveram uma vacina contra este antígeno. Essa vacina foi testada em camundongos geneticamente modificados para ter deficiência de ApoB e mostrou eficácia em reduzir a carga da placa aterosclerótica em camundongos e induziu linfócitos Treg antígeno-específicos.¹⁵⁸ Esses achados trazem um novo alvo para o desenvolvimento de terapêuticas preventivas e que também possam atuar na regressão das placas ateroscleróticas humanas diminuindo a morbimortalidade das DCV.¹⁵⁸ Além disso, caso haja esta possibilidade, é necessário determinar se há alguma janela

no período do desenvolvimento da placa de aterosclerose onde possíveis tratamentos que induzam a regressão sejam eficazes.

Há uma possível explicação de como os linfócitos Treg podem chegar aos sítios inflamados, como TAP e a placa de aterosclerose. Os linfócitos Treg são sensíveis e percebem o ambiente que estão e adaptam o seu metabolismo interno como resposta a esta exposição.^{157,160} O aumento de colesterol é um dos fatores percebidos pelos linfócitos Treg, que altera o metabolismo interno e estimula as vias migratórias destes linfócitos para que se desloquem até os locais onde há inflamação, como as placas de aterosclerose.¹⁶⁰ Entretanto, o ambiente da placa aterosclerótica parece ser um ambiente capaz de desestabilizar a célula, tornando-a incapaz de suprimir a inflamação.^{157,160} O TAP periplaca pode ser também um destes locais alvos da migração dos linfócitos Treg. O número de Tregs no tecido adiposo de camundongos é elevado, e parece que os macrófagos têm um grande papel no recrutamento.¹⁶¹ Além disso, há fortes evidências que o TAP em humanos apresenta elevado grau de inflamação como demonstrado em estudos de autópsia,^{35,37,43,137} amostras cirúrgicas,¹⁸ *in vitro*²⁷ e em exames de imagem^{148,151,162} associados com a aterosclerose coronariana. O TAP periplaca tem uma comunicação direta com a camada adventícia das artérias coronárias e mesmo em condições basais apresenta propriedades pró-inflamatórias que podem proporcionar o acúmulo de células imunes.²⁷ Além disso, há a comunicação entre os dois tecidos através da vascularização pelo *vasa vasorum*.²⁸ Mostramos previamente que o aumento da densidade de macrófagos M1/M2 no TAP periplaca e M1 no TAP adjacente às artérias com trombose estão associados com o aumento de *vasa vasorum* na camada adventícia.¹³⁷ Aqui, o aumento de linfócitos Th1 no TAP adjacente às artérias com lesões instáveis foi associado com o aumento do *vasa vasorum* na camada média. Além disso, a diminuição de macrófagos M2 no TAP foi associada com a redução de *vasa vasorum* na camada adventícia.¹³⁷ Esses dados sugerem que o *vasa vasorum* pode ser uma possível via de transferência das células imunes entre o TAP periplaca e artérias coronárias, que parece ser mais abundante na presença de células imunes pró-inflamatórias e mais escassa na presença de células imunossupressoras de inflamação.

Estudos mostram que a inflamação no TAP é um importante biomarcador da inflamação da parede do vaso adjacente e possível de ser avaliado de modo não invasivo.¹⁴⁸ Nosso estudo apresenta possíveis hipóteses para estudos translacionais no desenvolvimento de novos métodos preventivos ou de tratamento. A aplicabilidade destes estudos translacionais traz benefícios extremamente relevantes para a prática clínica, pois podem ser utilizados como coadjuvante na estratificação de risco cardíaco. Um excelente exemplo são os estudos de coorte, que com seguimento de 72 meses mostraram que altos índices de FAI foram associados com alto risco de mortalidade geral com “*hazard ratio*” (HR) ajustado de 2,6 e para mortalidade cardiovascular com HR de 9,04. Além disso, estabeleceram um “*cutoff*” para FAI de -70,1 HU ou maior aumentam o risco de morte por todas as causas (HR 3,69) e morte cardíaca (HR 5,62).¹⁶² A caracterização do perfil inflamatório no nosso estudo permitiu identificar quais células estão ativas no TAP e com quais componentes de placa estão associados.

6.1 Limitações

As interpretações destes resultados devem ser realizadas tendo em mente algumas limitações. Primeiramente, este é um estudo observacional de corte transversal. Dessa forma, não é possível estabelecer relações de causalidade entre as variáveis estudadas. Entretanto, somente um estudo com uso de material de autópsia permite a análise histológica de toda a artéria coronária e com amostragem da região da artéria coronária com a lesão aterosclerótica mais clinicamente relevante com o TAP periplaca e a amostragem de um seguimento controle. Estudos experimentais têm a vantagem de controlar o ambiente do experimento e os animais estudados, o que possibilita estabelecer relações mecanicistas, mas os estudos experimentais apresentam várias limitações, considerando todos os tipos de animais. Alguns exemplos são diferenças nas características das placas ateroscleróticas em animais em relação a humanos, tais como a ausência de hemorragia intraplaca e neovascularização em modelos com camundongos, a trombose por ruptura é muito rara em porcos (ao contrário do que ocorre em humanos), e em coelhos as preferências de localizações de placas ateroscleróticas são muito distintas a dos seres humanos.¹⁶³

A segunda limitação é a falta de seguimento dos participantes, que não nos permitiu realizar a coleta de dados das características clínicas diretamente antes do óbito. A busca ativa através de prontuários não foi possível, devido à descentralização do sistema de saúde e pelo fato de que estes dados não foram coletados de modo uniforme e sistematizado para fins de estudo. Contudo, os critérios de inclusão e exclusão para este estudo foram exigentes, principalmente no que se refere ao informante apto a responder à entrevista clínica e semiestruturada.

Uma importante limitação, é que avaliamos os fenótipos e linhagens celulares e não foi possível avaliar quais citocinas e quimiocinas que estas células imunes estão expressando geneticamente ou secretando diretamente no TAP. Estudos recentes que utilizaram uma nova metodologia “*single-cell RNA sequencing*” traz a ciência para um novo patamar, pois permitem avaliar, em uma única célula, o seu genoma, transcriptoma, epigenética, proteômica, e suas linhagens.¹⁶⁴ Foram essas análises que validaram os achados da plasticidade das células Treg.^{157,159} Entretanto, essa nova abordagem é uma metodologia cara e disponível em apenas poucos centros, reforçando a importância de estudos como o nosso que permitem a investigação de questões e hipóteses mais rapidamente devido ao acesso mais facilitado comparado a esta nova tecnologia. No futuro essas hipóteses geradas com estudos como o nosso podem ser validadas com essas novas abordagens.

Além disso, não pode ser descartado a hipótese de que os participantes possam ter sido acometidos por um processo inflamatório sistêmico desencadeado pelo estado agonal. No entanto, casos com sinais de sepse identificados no exame de autópsia foram excluídos, assim como participantes com doenças inflamatórias sistêmicas e cardíacas. Adicionalmente, células inflamatórias nas artérias coronárias no TAP periplaca e controle não foram quantificadas.

6.2 Pontos Fortes

O acesso ao coração na totalidade permitiu a análise das quatro principais artérias coronárias e a respectiva coleta do TAP adjacente à placa aterosclerótica mais relevante clinicamente. A padronização do método foi previamente aprimorada⁴⁴ para que a artéria coronária fosse aberta para a mensuração da porcentagem de obstrução e a técnica de imunohistoquímica fosse eficaz sem que houvesse artefatos ou viés por não imunomarcção das células.

Desenvolvemos em conjunto com a equipe de engenharia do IFSP um software capaz de realizar o processamento de modo semiautomático das medidas de porcentagem de obstrução arterial e do lúmen. Adicionalmente, através do método manual, foi possível mensurar as áreas dos componentes da placa de ateroma. Até onde sabemos, estudos desta natureza ainda não foram realizados em seres humanos, assim como estudos que associem a densidade de macrófagos polarizados e linhagem dos linfócitos Treg e Th1 no TAP periplaca e controle com grupos de placa de aterosclerose estáveis e instáveis também não foram realizados.

As medidas de inflamação no TAP têm uma representatividade pela análise através de 20 campos com 600 μm de diâmetro para macrófagos e 1500 μm para linfócitos.¹⁶⁵ Estudo prévio utilizou diferentes métodos: dez imagens capturadas com aumento de 400x ou de fotografias de poucos campos.¹⁸ E além disso, no nosso estudo houve cegamento para o fragmento e a localização das células e não houve variabilidade interobservador.

Embora não tenhamos coletado os dados clínicos previamente ao óbito por medidas diretas e exames laboratoriais, a entrevista clínica tem ampla sensibilidade e especificidade demonstrado por estudos prévios.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Além disso, realizamos uma minuciosa análise estatística, que nos permitiu realizar análises de regressões multivariadas ajustadas para possíveis fatores de confusão, que não foram realizadas em estudos prévios. Os estudos prévios também não realizaram ajuste para múltiplas medidas no mesmo indivíduo.^{18,34-39,42}

7. CONCLUSÕES

A aterosclerose em artérias coronárias se associou com a inflamação de ambos os perfis pró e anti-inflamatória no TAP adjacente às artérias coronárias. Houve um predomínio do perfil pró-inflamatório, mediado principalmente por macrófagos M1. O perfil pró-inflamatório no TAP periplaca se associou com componentes de placa de aterosclerose relacionados à desestabilização, principalmente em placas instáveis. O perfil anti-inflamatório teve a maioria das associações com componentes de placa de aterosclerose relacionados à estabilização e lesões crônicas, exceto pelos linfócitos Treg, que também se associaram com componentes de aterosclerose em placas instáveis. A inflamação no TAP foi heterogênea com maior inflamação ao TAP adjacente às artérias coronárias com aterosclerose comparado aos TAP adjacente a seguimentos arteriais controles.

7.1 Macrófagos polarizados M1 e M2 no TAP periplaca e aterosclerose

Os macrófagos M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) no TAP periplaca se associaram com aterosclerose coronariana. A linhagem pró-inflamatória predominou em relação à linhagem anti-inflamatória. Os macrófagos M1 no TAP periplaca se correlacionaram com componentes de placa relacionados à desestabilização, tais como a diminuição da área ocupada por CML e capa fibrosa, como também o aumento de lipídio e número de *vasa vasorum* na camada adventícia. Os macrófagos M2 no TAP periplaca se correlacionaram com o tamanho da placa, aumento de calcificação e diminuição de *vasa vasorum*, sugerindo associação com placas ateroscleróticas avançadas e estáveis.

7.2 Linhagem Th1 e Treg no TAP periplaca e aterosclerose

As linhagens Th1 (pró-inflamatória) e Treg (anti-inflamatória) no TAP periplaca se associaram com a aterosclerose coronariana. Os linfócitos Th1 no TAP periplaca se

correlacionaram com o aumento de colágeno e diminuição da calcificação. Os linfócitos Treg no TAP periplaca se correlacionaram com o tamanho da placa, diminuição da área ocupada por CML e aumento de calcificação, semelhante aos macrófagos M2, e também com o aumento de lipídio e da capa fibrosa, sugerindo associação com placas ateroscleróticas avançadas e estáveis.

7.3 Inflamação no TAP periplaca e placas ateroscleróticas instáveis e estáveis

O perfil pró-inflamatório no TAP periplaca se associou com placas ateroscleróticas instáveis. O aumento dos macrófagos M1 no TAP periplaca se associaram com maior risco de trombo. As associações encontradas para macrófagos M1 e linfócitos Th1 no TAP periplaca foram somente em placas instáveis. Nestas placas, os macrófagos se correlacionaram com componentes de placa relacionados à desestabilização como diminuição da área e espessura da capa fibrosa, aumento de lipídio e *vasa vasorum* na camada adventícia. Os linfócitos Th1 se correlacionaram com menor tamanho de placa e calcificação. Ambos M1 e Th1 se associaram com aumento de *vasa vasorum*. Por outro lado, macrófagos M2 e linfócitos Treg no TAP periplaca foram predominantes em placas estáveis, com o aumento do tamanho da placa e de calcificação. Os linfócitos Treg se associaram com a diminuição da área ocupada por CML, sugerindo placas avançadas. Entretanto, os linfócitos Treg se associaram com diminuição da área ocupada por colágeno e aumento de necrose em lesões instáveis, sugerindo que os linfócitos Treg ainda têm um papel incerto.

7.4 Inflamação no TAP periplaca e controle

A inflamação no TAP adjacente às artérias coronárias associada com a aterosclerose foi heterogênea, com maior inflamação no TAP periplaca comparado ao TAP controle e distal. O aumento de macrófagos M1 no TAP periplaca em relação ao TAP controle se correlacionou com o aumento de colágeno. O aumento de linfócitos Th1 no TAP periplaca comparado ao TAP controle se correlacionou com a diminuição da hemorragia intraplaca e aumento da capa fibrosa

e o aumento de macrófagos M2 se correlacionou com o aumento da EIM. Além disso, o número de macrófagos M1 foi maior no TAP periplaca adjacente às placas instáveis comparado ao TAP controle.

8. FINANCIAMENTOS

Este estudo recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2017/11313-0) e beneficiária a orientadora deste estudo.

A aluna recebeu bolsa de estudos da FAPESP (2017/24066-1).

Agradecemos ao Prof. Raimundo Soares de Azevedo Neto pelo auxílio financeiro no início deste estudo antes da aprovação do financiamento da FAPESP.

9. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

A aluna ingressou no BEE-FMUSP e no Laboratório de Patologia Cardiovascular em 2010 compondo a equipe de entrevistas clínicas, onde fez a seleção dos participantes da pesquisa, recepção e a apresentação do estudo aos informantes e aplicação da entrevista clínica. Tornou-se supervisora da entrevista clínica em 2012 sendo responsável pelo treinamento da equipe, da tabulação dos dados referentes aos critérios de elegibilidade e apresentação da análise descritiva do controle dos casos, além das atividades anteriores até 2015.

No período de 2013 a 2016, a aluna realizou a sua dissertação do mestrado sob orientação da Profa. Dra. Cláudia Kimie Suemoto com bolsa de mestrado concedida pela agência de fomento FAPESP (2013/12290-3). No período do mestrado, a aluna aplicou os critérios de elegibilidade e da entrevista clínica no recrutamento dos participantes deste estudo com o auxílio da equipe de coleta e da técnica do Laboratório de Patologia Cardiovascular no período vespertino. A aluna participou da confecção do desenho do estudo, realizou a padronização da técnica e foi responsável pelo processamento e amostragem do material coletado a fresco do seu estudo e dos estudos realizados neste período no Laboratório de Patologia Cardiovascular. A aluna recebeu treinamento dos médicos patologistas coautores deste estudo na avaliação histopatológica das artérias coronárias e para a análise morfométrica do TAP. A aluna realizou disciplinas e aprendeu com a orientadora a realizar a análise estatística descritiva, univariada e multivariada nos softwares SPSS e Stata. Em 2015, a aluna apresentou os resultados preliminares em formato de pôster no congresso internacional *Scientific Sessions of the American Heart Association*, que ocorreu em Orlando nos Estados Unidos da América.¹⁶⁹ O mestrado foi concluído em 2016, gerou duas publicações, além da contribuição para outros estudos.^{43,44,168,170} Este projeto de pesquisa teve financiamento de pesquisa auxílio regular da FAPESP (2013/00335-2)

Em 2017 a aluna ingressou no doutorado dando continuidade ao tema de pesquisa anterior com bolsa de doutorado da FAPESP (2017/24066-1). Neste período a aluna participou da confecção do desenho do estudo e permaneceu no período de dois anos e meio (2016 a 2019) no

Laboratório da Dra. Ana Maria Gonçalves da Silva no Instituto de Medicina Tropical da FMUSP. A aluna executou a padronização e técnica de imuno-histoquímica de dupla-marcação de todos os imunomarcadores deste estudo com o auxílio da ampla experiência e expertise da Dra. Ana Maria na técnica de imuno-histoquímica de dupla marcação. Além disso, realizou o curso de capacitação em imuno-histoquímica pela Escola de Educação Permanente do Hospital das Clínicas da FMUSP (ANEXO VIII). Neste período, a aluna participou no desenho e auxílio intelectual no desenvolvimento do software APA, desenvolvido pelos engenheiros do IFSP. Ela também recebeu treinamento com os médicos patologistas Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci e Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva para a realização da avaliação morfológica e avaliação dos componentes da placa de aterosclerose das artérias coronárias deste estudo. A aluna aprendeu a gerenciar banco de dados e desenvolver formulário para coleta de dados na plataforma online REDCap,¹⁷¹ onde desenvolveu os formulários dentro desta plataforma para a entrevista clínica para o BEE-FMUSP e de todos os dados gerados no Laboratório de Patologia Cardiovascular. A aluna aprendeu a realizar estatística básica e figuras no software R.

Em relação à produção científica a aluna apresentou presencialmente os resultados preliminares da associação entre aterosclerose coronariana e a densidade dos macrófagos polarizados¹⁷² em formato de pôster no congresso internacional *Scientific Sessions of the American Heart Association*, que ocorreu na Filadélfia Orlando nos Estados Unidos da América em 2019. Neste evento, a aluna recebeu o prêmio *International Early Career Investigator Award* (ANEXO IX) com *travel grant*. Os resultados finais referentes à esta pesquisa foram publicados no periódico *Journal of American Heart Association*.¹³⁷ Apresentou os resultados preliminares deste trabalho em formato de pôster online neste mesmo evento em 2021¹⁷³ e outros resultados no Congresso Internacional da Sociedade Europeia de Cardiologia ESC 2021 em formato pôster online.¹⁷⁴ Além disso, contribuiu com os projetos vinculados ao BEE-FMUSP e Laboratório de Patologia Cardiovascular.^{138,170,175-180}

ANEXOS**Anexo I – Artigo Científico Publicado em Periódico**

B Lymphocytes and Macrophages in the Perivascular Adipose Tissue Are Associated With Coronary Atherosclerosis: An Autopsy Study

Daniela Souza Farias-Itao, BSN, MSc; Carlos Augusto Pasqualucci, MD, PhD; Aline Nishizawa, BSN, PhD; Luiz Fernando Ferraz da Silva, MD, PhD; Fernanda Marinho Campos, BPharm; Márcio Sommer Bittencourt, MD, MPH, PhD; Karen Cristina Souza da Silva, BS; Renata Elaine Paraizo Leite, BPT, PhD; Lea Tenenholz Grinberg, MD, PhD; Renata Eloah de Lucena Ferretti-Rebustini, BSN, PhD; Wilson Jacob-Filho, MD, PhD; Claudia Kimie Suemoto, MD, MSc, PhD

Background—Macrophages and T lymphocytes in the perivascular adipose tissue (PvAT) were previously linked to coronary artery disease. However, the role of these cells and B lymphocytes in the human PvAT adjacent to unstable atherosclerotic plaques has not been investigated. Moreover, previous studies were inconclusive on whether PvAT inflammation was restricted to the surroundings of the atheroma plaque.

Methods and Results—Coronary arteries were freshly dissected with the surrounding PvAT. Atherosclerotic plaques were classified according to the internationally accepted anatomopathological criteria. Immune cells in the PvAT were detected using immunohistochemistry and then quantified. We used linear and logistic regressions with robust standard errors, adjusted for possible confounding factors. In 246 atherosclerotic plaques (205 stable and 41 unstable plaques) from 82 participants (mean age=69.0±14.4 years; 50% men), the percentage of arterial obstruction was positively correlated with the densities of CD68⁺ macrophages ($P=0.003$) and CD20⁺ B lymphocytes ($P=0.03$) in the periplateau PvAT. The number of cells was greater in the periplateau PvAT than in the distal PvAT (macrophages, $P<0.001$; B lymphocytes, $P=0.04$). In addition, the density of macrophages in the periplateau PvAT was greater in the presence of unstable plaques ($P=0.03$) and was also greater near unstable plaques than in the distal PvAT ($P=0.001$). CD3⁺ T lymphocytes were not associated with percentage of obstruction and stable/unstable plaque composition.

Conclusions—The density of CD20⁺ B lymphocytes and CD68⁺ macrophages in periplateau PvAT was increased with plaque size, and the CD68⁺ macrophages were greater near unstable atherosclerotic plaques than near stable lesions. This inflammation was more intense in the periplateau PvAT than in the PvAT distal to the atherosclerotic plaques. (*J Am Heart Assoc.* 2019;8:e013793. DOI: 10.1161/JAHA.119.013793.)

Key Words: atherosclerosis • B cell • coronary artery disease • inflammation • macrophages • pericoronary adipose tissue

Although the frequency of coronary heart disease has declined recently, it remains the leading cause of mortality¹ and disability worldwide.² The main cause of coronary heart disease is atherosclerosis.³ The immune system has a central role in the development of coronary artery disease (CAD).⁴ Therefore, some clinical trials have investigated the role of anti-inflammatory agents to treat patients with CAD. In JUPITER (Justification for the Use of Statins in Prevention: an

Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin), statin therapy was highly effective in decreasing major adverse cardiovascular events in individuals with low-density lipoproteins and high levels of high-sensitivity CRP (C-reactive protein), suggesting an anti-inflammatory action of rosuvastatin.⁵ In CANTOS (Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study), therapy with monoclonal antibody target at interleukin-1 β (canakinumab), which is involved in the interleukin-6 signaling,

From the Department of Pathology (D.S.F.-I., C.A.P., A.N., L.F.F.d.S., F.M.C., K.C.S.d.S., R.E.P.L., L.T.G., R.E.d.L.F.-R., W.J.-F., C.K.S.) and Discipline of Geriatrics (R.E.P.L., W.J.-F., C.K.S.), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil; Center for Clinical and Epidemiological Research and Division of Internal Medicine, University Hospital, University of São Paulo, Brazil (M.S.B.); Preventive Medicine Center and Cardiology Program, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil (M.S.B.); Department of Neurology, Memory and Aging Center, University of California, San Francisco, San Francisco, CA (L.T.G.); and Medical-Surgical Nursing Department, University of São Paulo School of Nursing, São Paulo, Brazil (R.E.d.L.F.-R).

Accompanying Tables S1 through S5 and Figures S1 through S5 are available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/JAHA.119.013793>

Correspondence to: Daniela Souza Farias-Itao, BSN, MSc, University of São Paulo Medical School, 455 Ave Doutor Arnaldo, Room 1355, 01246-903 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: dsfarias@usp.br

Received July 1, 2019; accepted November 4, 2019.

© 2019 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Clinical Perspective

What Is New?

- Our study demonstrated that inflammation mediated by CD68⁺ macrophages and CD20⁺ B lymphocytes in the perivascular adipose tissue (PvAT) adjacent to the most important atherosclerotic plaque increased with the percentage of arterial obstruction in the coronary arteries.
- We are the first to demonstrate that the density of C68⁺ macrophages in the PvAT adjacent to unstable plaques was greater than in the PvAT adjacent to stable plaques.
- Inflammation was more intense in the PvAT adjacent to stenotic and acute lesions than in the adipose tissue distal of lesions and without atherosclerosis.

What Are the Clinical Implications?

- Basic research using human samples of PvAT adjacent to coronary arteries with and without atherosclerosis can expand the findings from animal models on the associations between specific immune cells and atherosclerotic plaque size and composition.
- These studies are important to better determine potential targets for the development of new drugs in the different stages of the atherosclerotic process.

significantly reduced major adverse cardiovascular events independent of lipid levels. However, patients who used canakinumab had more deaths secondary to infections, especially in older adults and patients with diabetes mellitus.⁶

In addition, the perivascular adipose tissue (PvAT) has been reported as a potential trigger for atherosclerosis, independent of traditional approaches, where CAD initiates from endothelial cells and the intima layer.⁷ In experimental studies, PvAT transplanted in low-density lipoprotein-deficient knockout mice promoted endothelial dysfunction and atherosclerosis in aortic and thoracic aorta.⁸ PvAT also showed increased MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) levels after transplantation of perivascular visceral adipose tissue adjacent to carotid arteries, causing large lipid-rich atherosclerotic lesions, high macrophage density, and fibrin deposits compared with mice transplanted with subcutaneous adipose tissue.⁹ However, extrapolation of these results for humans is difficult because of differences between human and animal models, including characteristics of atherosclerotic plaque.¹⁰ Translational studies from experimental to human have reported that inflammation in the epicardial adipose tissue (EAT) and in the PvAT was associated with CAD evaluated by biopsy,^{11–13} autopsy,^{14–17} and cardiac imaging.^{14,18,19} Most studies investigated the role of CD68⁺ macrophages in the EAT^{11–13} and PvAT^{15–17} on stable CAD. The number of CD68⁺ macrophages in the PvAT was also correlated with the number of immune cells in the atherosclerotic plaques.^{15–17}

CD3⁺ T lymphocytes in the PvAT were identified only in studies using biopsy samples.¹¹ The subtype CD8⁺ T lymphocytes in the EAT were more frequent in patients with CAD than in controls, whereas the density of the CD4⁺ T lymphocytes present in the EAT was similar between CAD and control groups.¹² The role of B lymphocytes in the PvAT adjacent to the atherosclerotic plaques remains unknown.²⁰ CD20⁺ B lymphocytes secreted cytokines, which increased the vulnerability of the atherosclerotic plaques by the recruitment of macrophages and increased the necrotic core in advanced lesions.²¹ Moreover, CD20⁺ B lymphocytes produced and secreted antibodies against antigens in the atherosclerosis plaque, such as β -2 glycoprotein I, heat shock proteins (HSP),²² and self-modified antigens.²³ The CD20⁺ B lymphocytes can also present antigens to T lymphocytes, which secrete cytokines and promote a proinflammatory response.²⁴ Indeed, the association of these immune cells with unstable atherosclerotic plaques has not been investigated. In addition, it is unknown whether these immune cells are restricted to the region surrounding the atherosclerotic plaques. A greater inflammation density was detected around culprit lesions compared with nonculprit lesions by imaging methods,^{14,18} whereas previous autopsy studies were inconclusive.^{16,17} Autopsy studies investigated only macrophages in the PvAT.^{15–17} Although biopsy studies explored other types of immune cells,^{11,13} samples obtained during cardiac surgery could initiate an inflammatory response, with an increase in monocytes and heat shock proteins, mainly with the use of extracorporeal circulation.²⁵ Moreover, no studies to date have accounted for confounders in statistical analyses.^{12–17} Therefore, we investigated the association of the density of CD68⁺ macrophages, CD3⁺ T lymphocytes, and CD20⁺ B lymphocytes in the periplaque PvAT with plaque composition and with the percentage of arterial obstruction. In addition, we compared the density of these immune cells in the periplaque PvAT and in the distal PvAT without atherosclerosis. We hypothesized that the density of CD68⁺ macrophages, CD3⁺ T lymphocytes, and CD20⁺ B lymphocytes in the PvAT adjacent to coronary artery lesions would be greater in the presence of larger arterial obstruction and that the density of these immune cells would be greater in PvAT adjacent to coronary arteries with unstable lesions in comparison with stable lesions. In addition, we supposed that the inflammation in periplaque PvAT would be greater than in distal PvAT.

Methods

This study was approved by the local ethics committee, and the next of kin (NOK) signed the informed consent before the sample collection. The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on request.

Subjects

This cross-sectional study included cadavers of subjects who had died from nontraumatic causes.²⁶ The cadavers underwent full-body autopsy at the São Paulo Autopsy Service from 2013 to 2015. Inclusion criteria were as follows: aged ≥ 30 years; postmortem interval < 24 hours; and a NOK with at least weekly interaction with the deceased in the 6 months before death. We excluded participants with cardiovascular conditions that could induce inflammation (ie, presence of a stent, chronic or acute pericarditis, pericardial effusion, myocarditis, endocarditis, Chagas disease, hemopericardium, cardiac tamponade, and previous cardiac surgery, including transplant). We also excluded participants with signs of systemic inflammation: autoimmune diseases, use of corticosteroids, use of immunosuppressive drugs, treatment with chemotherapy or/and radiotherapy, and diagnosis of sepsis before death. Moreover, we evaluated the presence of sepsis signs in the postmortem examination. Although the sepsis diagnosis is clinical, previous studies showed that it is possible to infer its presence by postmortem anatomopathological examination.^{27,28} A pathologist (L.F.F.S.) examined slides stained with hematoxylin-eosin from participants' lung, heart, liver, kidney, and spleen. The presence of at least 2 organs with signs of sepsis combined with focus of infection was necessary for the diagnosis of sepsis.²⁸ For example, we excluded participants with the following: (1) neutrophil infiltration in the lung associated with pleuritis caused by bronchopneumonia (Figure S1A and S1B); (2) acute tubular necrosis in the kidney secondary to shock (Figure S1C); (3) acute splenitis (Figure S1D); and (4) bronchopneumonia with hepatic congestion and steatosis (Figure S1E). We also excluded subjects whose NOKs were unable to provide clinical information.

Collection of Coronary Arteries and PvAT

Hearts were collected and washed in running water. Agar was injected into the ostia of the coronary arteries to avoid the flattening of the coronary arteries. The right coronary, left main coronary, left anterior descending, and circumflex arteries were dissected with 10 mm of PvAT around the coronary artery trajectories. Afterwards, the PvAT was removed and identified at regular intervals of 15 mm. The coronary arteries were fixed in 4% buffered paraformaldehyde for at least 5 days. The PvAT was fixed for 24 hours.²⁶ Samples of coronary arteries and PvAT were immersed in paraffin.

Assessment of Coronary Artery Atherosclerosis

Coronary arteries were cut at 15-mm intervals to match the samples of PvAT. These segments were divided into sections

of 5 mm each to evaluate the atherosclerotic plaques. The sections with the largest arterial obstruction or those suspected of having unstable atherosclerotic plaques were sampled from each coronary artery (periplaque PvAT).^{29,30} To define the main lesion, sampling of unstable plaques was preferred over stable ones. Coronary artery sections without macroscopic lesions and at least 15 mm away from any atherosclerotic plaques also represented a control area (distal PvAT).

Afterwards, these samples were stained with hematoxylin-eosin, Verhoeff, and Masson trichrome. The slides were photographed with the aid of a stereomicroscope (SMZ 1000; Nikon, Tokyo, Japan). We measured the areas delimited by the lumen and by the internal elastic lamina using the software ImageJ;³¹ and we calculated the percentage of arterial obstruction by dividing the difference of the internal elastic lamina area and lumen area by the internal elastic lamina area, and then multiplying the result by 100.³² We classified the atherosclerotic lesions according to the American Heart Association criteria.²⁹ Stable lesions were defined by the presence of fibroatheroma, calcification, lipid core, or whole fibrous cap, whereas the plaque was considered unstable in the presence of ulceration, intraplaque hemorrhage, or total/partial thrombosis (Figures S2 and S3).²⁹

Assessment of PvAT Inflammation

We identified macrophages (Monoclonal Mouse Anti-Human CD68, clone KP1, 1ML Dako-M081401, 1:5000 μ L), T lymphocytes (Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3, 1ML Dako-M045201, 1:1500 μ L), and B lymphocytes (Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, clone L26, 1ML Dako-M075501, 1:12000 μ L) in silanized slides of periplaque and distal PvAT. The slides were scanned with a scanner (Pannoramic Scan 250 Flash III; 3DHISTECH, Hungary) and analyzed with a virtual microscope (Pannoramic Viewer software; 3DHISTECH). The cells were counted into 20 random fields of 600- μ m diameter.

Clinical Data

We collected information on sociodemographic variables (age, sex, race, and education). The deceased's medical history was determined using a semistructured interview applied to the NOK; and the medical history includes information on hypertension, diabetes mellitus, CAD, heart failure, dyslipidemia, stroke, physical activity (defined by the performance of domestic, work, or formal physical activities at least 3 times per week), current alcohol use, and current smoking.³³ Body mass index was obtained by direct measurements of weight and height, with the deceased in the supine position without clothes or shoes.

Statistical Analysis

We estimated a sample size of 78 subjects, considering an effect size of 0.93 for the mean difference in immune cells between CAD and the control group,¹⁴ with power of 90% and α of 5%.

The dependent variables were the percentage of arterial obstruction (continuous variable) and plaque composition (binary variable). The independent variable was the density of the CD68⁺ macrophages, CD3⁺ T lymphocytes, and CD20⁺ B lymphocytes (continuous variables). The associations of cell density in the periplaque PvAT with the percentage of arterial obstruction were tested using linear regression with robust SEs to account for repeated measures in the same individual (3 arterial segments per person) using the Huber-White sandwich estimators.³⁴ The associations of cell density in the periplaque PvAT with plaque composition groups were tested using logistic regression with robust SEs through cluster adjustment, where the model tested the odds to unstable over stable plaques. In addition, we compared the cells in the PvAT around stable plaques and in the PvAT around unstable lesions in the same individual using Wilcoxon matched pairs rank test.

We also calculated the differences between the density of immune cells in the periplaque PvAT and the density of these cells in the distal PvAT. We then tested the association of these differences with the percentage of arterial obstruction and plaque composition using linear and logistic regressions with robust SEs, respectively. All the models were adjusted for potential confounders (age,^{35–39} sex^{40,41}, hypertension,^{42–44} diabetes mellitus,^{42,45} body mass index,^{42,46,47} smoking,^{42,48} physical inactivity,^{49,50} and alcohol use). The significance level was 5%. The statistical software used was Stata 13.0 (Stata Corp, TX).

Results

We included 82 participants (mean age=69.0±14.4 years; 50% men; 58% white; and 67% had <4 years of education). Hypertension (74%) and diabetes mellitus (37%) were most frequent risk factors in our sample. Among participants with hypertension, 55% used antihypertensive drugs; and among those with diabetes mellitus, 29% used hypoglycemic drugs and 8% used insulin (Table 1). Most NOK (85.3%) had daily interaction with the deceased. The most advanced lesions in each coronary artery were represented, which resulted in 246 coronary artery samples. In 54 participants with only stable lesions, we found 162 lesions. In 28 individuals with both stable and unstable lesions, we found 41 unstable lesions and 43 stable lesions (Figure S4). The mean percentage of arterial obstruction of proximal lesions was 56.7±26.0%; and of the distal fragments, 17.3±10.3% (Table S1). We tested

Table 1. Characteristics of the Sample (n=82)

| Variables | Value |
|------------------------------------|-------------|
| Age, y | 69.0 (14.4) |
| Women | 41 (50) |
| White | 48 (58) |
| Education, median (IQR), y | 4 (1–6) |
| Hypertension | 61 (74) |
| Diabetes mellitus | 30 (36) |
| Coronary artery disease | 10 (12) |
| Heart failure | 19 (23) |
| Stroke | 10 (12) |
| Dyslipidemia | 14 (17) |
| Body mass index, kg/m ² | 24.4 (5.8) |
| Physical inactivity | 56 (68) |
| Smoking | 12 (15) |
| Alcohol use | 24 (29) |
| Antihypertensive drugs | 45 (55) |
| Hypoglycemic drugs | 24 (29) |
| Insulin | 7 (8) |
| Lipid-lowering drugs | 6 (7) |
| Postmortem interval, h | 15.6 (3.1) |

Data are given as mean (SD) or number (percentage), unless otherwise indicated. IQR indicates interquartile range.

the correlation between the sociodemographic and clinical data with the density of immune cells and found that age and body mass index correlated with the density of CD68⁺ macrophages (Table S2). In addition, physical inactivity correlated with CD3⁺ T lymphocytes, and no variable correlated with CD20⁺ B lymphocytes (Tables S3 and S4).

CD68⁺ Macrophages

The density of CD68⁺ macrophages in the periplaque PvAT was positively correlated to the percentage of coronary artery obstruction in the multivariable analysis ($\beta=2.06$; 95% CI=0.71–3.41; $P=0.003$) (Table 2, Figure 1, and Figure 2A). The difference between the density of CD68⁺ macrophages in the periplaque PvAT and in the distal PvAT was related to the percentage of coronary artery obstruction ($\beta=2.85$; 95% CI=1.32–4.39; $P<0.001$) (Table 2, Figure 2C). In addition, the density of CD68⁺ macrophages in the periplaque PvAT was greater near unstable plaques than near stable plaques (odds ratio=1.15; 95% CI=1.01–1.31; $P=0.03$) (Table 2, Figure 2B). This finding persisted when we compared the stable and unstable lesions in the same individual ($P=0.008$) (Table S5). Macrophages were more frequent in the periplaque PvAT than

Table 2. Association Between Immune Cells and Coronary Artery Atherosclerosis (n=246 Artery Segments)

| Immune Cell Density | Univariate Model | | | Adjusted Model* | | |
|--|------------------|----------------|---------|-----------------|----------------|---------|
| CD68⁺ macrophages | | | | | | |
| % of obstruction | β | 95% CI | P Value | β | 95% CI | P Value |
| PvATp (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [†] | 2.19 | 0.88 to 3.51 | 0.001 | 2.06 | 0.71 to 3.41 | 0.003 |
| Difference: PvATp and PvATd (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [†] | 2.30 | 0.57 to 4.03 | 0.01 | 2.85 | 1.32 to 4.39 | <0.001 |
| Unstable plaque composition | OR | 95% CI | P Value | OR | 95% CI | P Value |
| PvAT (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [‡] | 1.12 | 1.02 to 1.25 | 0.02 | 1.15 | 1.01 to 1.31 | 0.03 |
| Difference: PvATp and PvATd (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [‡] | 1.42 | 1.14 to 1.78 | 0.002 | 1.77 | 1.28 to 2.47 | 0.001 |
| CD3⁺ T lymphocytes | | | | | | |
| % of obstruction | β | 95% CI | P Value | β | 95% CI | P Value |
| PvATp (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [†] | 3.12 | -1.17 to 7.41 | 0.15 | 3.42 | -0.85 to 7.69 | 0.11 |
| Difference: PvATp and PvATd (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [†] | 1.78 | -2.18 to 5.74 | 0.37 | 2.15 | -1.83 to 6.13 | 0.28 |
| Unstable plaque composition | OR | 95% CI | P Value | OR | 95% CI | P Value |
| PvATp (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [‡] | 1.31 | 0.92 to 1.87 | 0.13 | 1.37 | 0.94 to 2.00 | 0.09 |
| Difference: PvATp and PvATd (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [‡] | 1.49 | 0.85 to 2.59 | 0.15 | 1.55 | 0.77 to 3.11 | 0.21 |
| CD20⁺ B lymphocytes | | | | | | |
| % of obstruction | β | 95% CI | P Value | β | 95% CI | P Value |
| PvAT (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [†] | 40.10 | 7.02 to 73.19 | 0.01 | 36.38 | 1.83 to 70.93 | 0.03 |
| Difference: PvATp and PvATd (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [†] | 37.66 | 3.13 to 72.18 | 0.03 | 39.49 | 1.89 to 77.09 | 0.04 |
| Unstable plaque composition | OR | 95% CI | P Value | OR | 95% CI | P Value |
| PvAT (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [‡] | 26.91 | 1.38 to 523.65 | 0.03 | 23.44 | 0.67 to 812.92 | 0.08 |
| Difference: PvATp and PvATd (10 ⁻⁵ cells/μm ²) [‡] | 13.39 | 0.54 to 332.03 | 0.11 | 8.56 | 0.16 to 447.22 | 0.28 |

OR indicates odds ratio; PvATd, distal perivascular adipose tissue; PvATp, periplaque perivascular adipose tissue.
 *Adjusted for age, hypertension, diabetes mellitus, body mass index, smoking, alcohol use, and physical inactivity.
[†]Linear regression with robust SEs to account for repeated measures in the same individual through cluster adjustment.
[‡]Logistic regression with robust SEs to account for repeated measures in the same individual through cluster adjustment.

in the distal PvAT in the presence of unstable plaques (odds ratio=1.77; 95% CI=1.28–2.47; *P*=0.001) (Table 2, Figure 2D).

CD3⁺ T Lymphocytes

The density of CD3⁺ T lymphocytes in the periplaque PvAT was not associated with percentage of obstruction, nor with plaque composition. Moreover, there was no difference in the cell density between the periplaque PvAT and the distal PvAT (Table 2, Figure 1, Table S5, and Figure S5).

CD20⁺ B Lymphocytes

The percentage of arterial obstruction increased with the density of CD20⁺ B lymphocytes in the periplaque PvAT (β=36.38; 95% CI=1.83–70.93; *P*=0.03), and the density of B cells in the periplaque PvAT was greater compared with distal PvAT (β=39.49; 95% CI=1.89–77.09; *P*=0.04) (Table 2, Figures 1 and 3A). We did not find differences in the B-lymphocyte densities in the periplaque PvAT around unstable

plaques compared with the PvAT around stable plaques (odds ratio=23.44; 95% CI=0.67–812.92; *P*=0.08) (Table 2, Figure 3B). The B-lymphocyte densities in the PvAT were similar around stable and unstable lesions in the same individual (*P*=0.58) (Table S5). In addition, the B-lymphocyte densities near unstable lesions were similar in the periplaque and distal PvAT (odds ratio=8.56; 95% CI=0.16–447.22, *P*=0.28) (Table 2, Figure 1, Figure 3A, 3C and 3D).

Discussion

We found that the densities of CD68⁺ macrophages and CD20⁺ B lymphocytes in the periplaque PvAT were greater in the presence of larger luminal obstruction by atherosclerotic plaques. In addition, the density of CD68⁺ macrophages was greater around unstable lesions than around stable lesions. These findings were more prominent in the PvAT surrounding the most critical atherosclerotic lesions compared with the PvAT near artery regions without macroscopic lesions and distant from the culprit lesions.

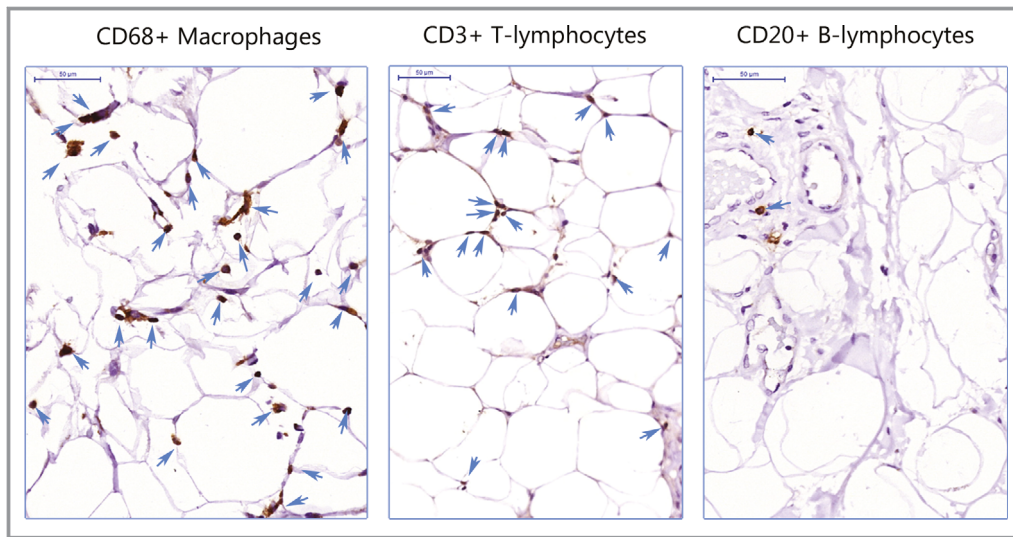


Figure 1. CD68⁺ macrophages, CD3⁺ T lymphocytes, and CD20⁺ B lymphocytes. Immune cells stained in brown and marked with a blue arrow infiltrated into the perivascular adipose tissue (bar=50 µm).

CD68⁺ Macrophages and CAD

The positive correlation between the density of CD68⁺ macrophages and the size of the atherosclerotic plaques was previously described.¹⁶ Infiltrations of CD68⁺ macrophages in the PvAT were similar between patients with dilated cardiomyopathy and patients with CAD.¹⁷ Previous studies demonstrated an association of chronic CAD with CD68⁺ macrophages and polarized macrophages.^{12,13,15,16} However, these studies used EAT samples obtained during surgery, where the collection of the sample adjacent to the most important lesion may be difficult.^{12,13} This is important because the EAT transcriptomic signature varied according to the anatomical region of the PvAT sampling.⁵¹ In autopsy studies,^{15,16} CD68⁺ macrophages were associated with stable plaque composition.¹⁵ However, we were the first to show in humans that CD68⁺ macrophage density in the PvAT adjacent to unstable coronary lesions was greater than near stable lesions. The association between unstable lesions and macrophages was only investigated in samples of carotid arteries and aorta, where the number of polarized macrophages inside the arterial wall was greater in unstable plaques.⁵² This finding suggested that macrophages may be involved with the rupture of the fibrous cap and the progression of disease severity.⁵²

In addition, the association between the density of CD68⁺ macrophages with plaque size and unstable atherosclerotic plaques was greater in the periplaque PvAT than distal PvAT in the same individual, which emphasizes the potential intrinsic role of CD68⁺ macrophages in CAD development. This result is in line with imaging studies, which found more inflammation around the culprit lesion than near nonculprit lesions.^{14,19} In the only autopsy study that examined this association, no difference was found in the density of macrophages in

periplaque and distal pvAT,¹⁶ probably because of differences in sample size and distal PvAT sampling. Our result that inflammation is not equally distributed in the EAT is expected because macrophages are cytokine-secreting phagocytic cells that recruit other cells to the site of inflammation.⁵³ Therefore, macrophages in the PvAT could have an effective role in the atherogenesis severity in humans.

CD3⁺ T Lymphocytes and CAD

We did not find any difference in the density of CD3⁺ T lymphocytes, which are a general marker for T lymphocytes,⁵⁴ between stable and unstable plaque groups, or any correlation between the density of these immune cells and the percentage of arterial obstruction. However, our results cannot be compared directly with previous studies. Although a greater infiltrate of CD3⁺ T lymphocytes, CD68⁺ macrophages, and mast cells was found in the EAT, the assessment was qualitative and only in obese individuals.¹¹ Hirata et al found a greater number of CD8⁺ T lymphocytes in PvAT in patients with CAD compared with a control group.¹²

CD20⁺ T Lymphocytes and CAD

The density of CD20⁺ B lymphocytes in the PvAT was positively correlated with the percentage of arterial obstruction, but this density was similar between stable and unstable plaques. The relationship of these cells in PvAT adjacent to atherosclerotic plaques has not been yet investigated. Our results suggest that CD20⁺ B lymphocytes could play a role in CAD progression.²² On the other hand, macrophages and T cells seem to play an essential role since the early stages of atherosclerosis development.²² We used the CD20 marker,

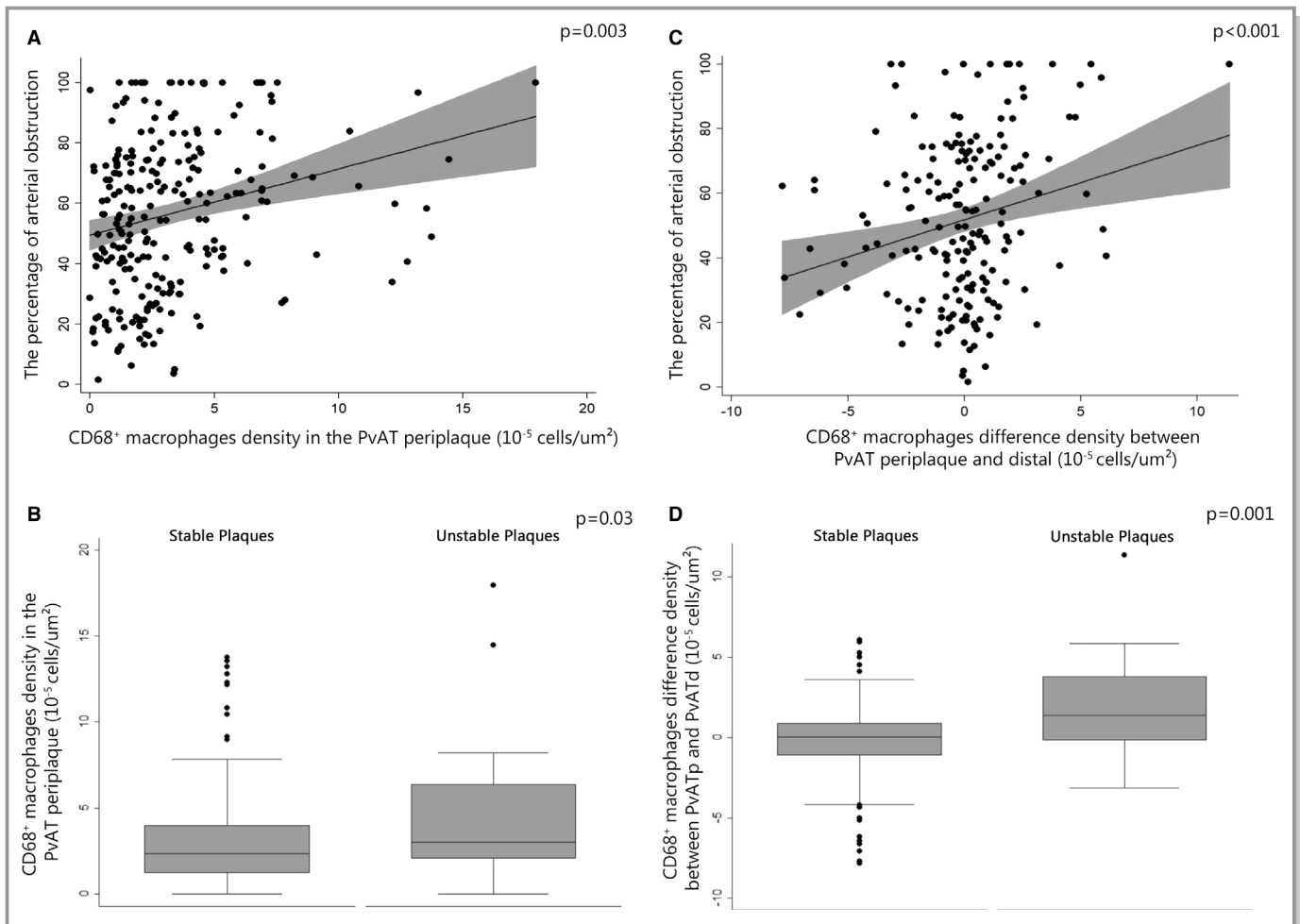


Figure 2. Association between CD68⁺ macrophages and atherosclerosis. **A**, Scatterplot of the density of macrophages in periplaque perivascular adipose tissue (PvAT) with the percentage of arterial obstruction. **B**, Box plot of the density of macrophages in periplaque PvAT in stable and unstable plaque groups. **C**, Scatterplot of the difference of the macrophage density in periplaque PvAT and distal PvAT with the percentage of arterial obstruction. **D**, Box plot of the difference of macrophage density between periplaque PvAT and distal PvAT in stable and unstable plaque groups.

which was related to atherosclerosis progression in animal models.^{55,56} Treatments with anti-CD20 attenuated the atherosclerosis expression.^{55,56} The transfer of CD20⁺ cells to lymphocyte-deficient mice increased the plaque size and macrophage accumulation in these lesions.⁵⁶ In addition, we did not find any difference in the density of B lymphocytes between stable and unstable atherosclerotic plaques. This finding may be caused by the short time interval between the acute coronary event and the individual's time of death. Activated B cells may not have had enough time to complete the process of recruitment, differentiation, and migration to unstable plaque site. In mice models, an increase in B-lymphocyte number in the heart muscle was only present after 5 days of myocardial infarct induction.⁵⁷ More studies should be conducted in experimental models to determine the response time of B-lymphocyte infiltration in the PvAT after acute coronary artery lesions.

Can Inflammation in the Periplaque PvAT Promote Coronary Atherosclerosis?

Periplaque PvAT may promote atherosclerosis³ through 2 possible mechanisms. First, the PvAT can communicate with the atherosclerotic plaque through the infiltration of adipocytes in the adventitial layer,⁵⁸ as we observed in our study. Second, the vasa vasorum that infiltrates the PvAT could bring the inflammatory cells from the PvAT to the coronary artery.

The question of whether the inflammation in PvAT is cause or consequence of atherosclerosis remains unknown. A recent experimental study using apolipoprotein E-deficient mice suggested that inflammation in the PvAT precedes atherosclerotic plaque formation.⁵⁹ Moreover, the infiltration of leukocyte in the PvAT was greater than in the vessel wall,⁵⁹ and the PvAT expresses genes associated with the production of complex lipids, which are also present in

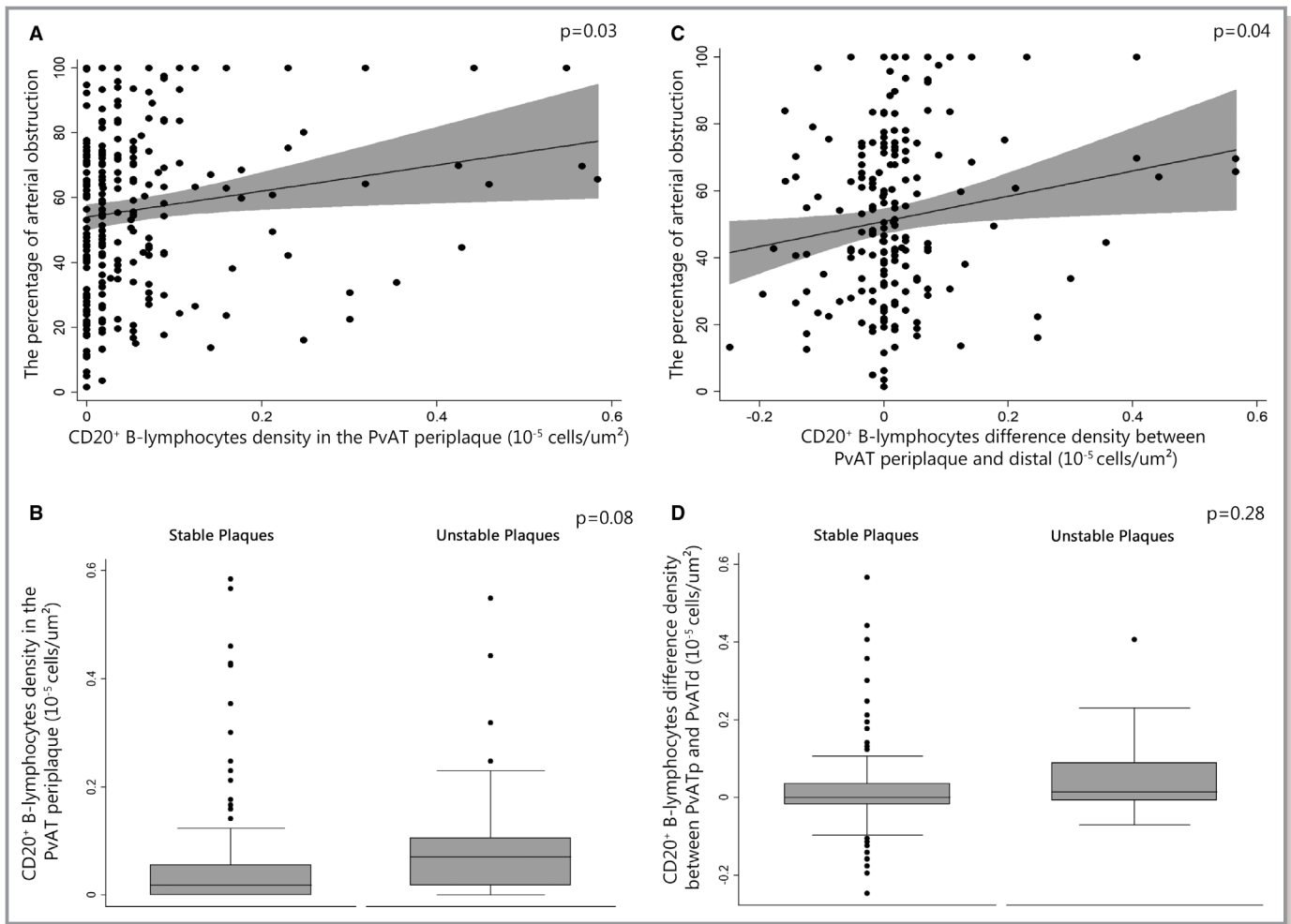


Figure 3. Association between CD20⁺ B lymphocytes and atherosclerosis. **A**, Scatterplot of the density of B lymphocytes in periplaque perivascular adipose tissue (PvAT) with the percentage of arterial obstruction. **B**, Box plot of the density of B lymphocytes in periplaque PvAT in stable and unstable plaque groups. **C**, Scatterplot of the difference of the B-lymphocyte density in periplaque PvAT and distal PvAT with the percentage of arterial obstruction. **D**, Box plot of the difference in density of B lymphocytes between periplaque PvAT and distal PvAT in stable and unstable plaque groups.

atherosclerosis.^{51,60} Macrophages containing lipoproteins were found only in the periplaque PvAT, suggesting that these macrophages carried the lipoproteins from the PvAT to the artery wall.⁶⁰ Although these experimental lines of evidence point to the causality direction from the PvAT to coronary artery wall, a complex bidirectional communication of inflammatory cells between the arterial wall and the PvAT may be present.⁶¹

Limitations and Strengths

Our study has several strengths. We investigated the association of B lymphocytes and T lymphocytes in human PvAT with coronary atherosclerosis using autopsy material. Basic research using human samples is scarce because of the decreased number of autopsies performed worldwide. In addition, we compared the density of these cells in unstable

plaques, and no previous study has performed analyses with adjustment for confounders. However, some limitations should be considered. First, it is possible that a systemic inflammatory process could be triggered by the autopsy procedure. However, the stability of the cell counts is unknown in autopsy studies. Nonetheless, we excluded subjects with sepsis diagnosis, as well as other cardiac or systemic inflammatory conditions. In addition, the post-mortem interval of all samples was <24 hours (mean postmortem interval=15.6 hours), which probably limited the inflammatory process after death.⁶² Moreover, previous studies used samples obtained during surgery,^{11–13} which probably triggers more intense inflammatory responses than the autopsy procedure, mainly when extracorporeal circulation is used.^{25,63} Second, we did not measure serum levels of inflammation and could not adjust our analyses for the presence of this important variable. Third, we cannot establish

relations of causality because this is a cross-sectional study. Finally, we did not follow participants during life, and clinical variables were reported by the NOK. To minimize bias, we only included reliable NOKs. Using this approach, our interview showed high accuracy in previous studies.^{32,33,64,65} Future research in human samples will be necessary to show if specific types of macrophages, B lymphocytes, and T lymphocytes with proatherogenic or atheroprotective roles in the PvAT may have different associations with atherosclerosis pathogenesis.²⁰

In conclusion, a greater density of macrophages and B lymphocytes in the periplateau PvAT was associated with an increase in atherosclerotic obstruction. Moreover, the density of CD68⁺ macrophages was greater in the periplateau PvAT near unstable plaques. Finally, the number of macrophages and B lymphocytes was higher in the PvAT surrounding critical plaques than in segments of PvAT without atherosclerosis.

Sources of Funding

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2013/00335-2, 2013/12290-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (1074888).

Disclosures

Dr Sommer Bittencourt received research support from Sanofi and speaker fees from Boston Scientific for work not related to this study. The remaining authors have no disclosures to report.

References

- Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Jordan LC, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, O'Flaherty M, Pandey A, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, Tsao CW, Turakhia MP, VanWagner LB, Wilkins JT, Wong SS, Virani SS; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2019; 39:e56–e528.
- GBD 2017 Causes of Death Collaborators Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdela J, Abdelalim A, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392:1736–1788.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317–325.
- Libby P, Hansson GK. Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res*. 2015;116:307–311.
- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated c-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359:2195–2207.
- Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med*. 2017;377:1119–1131.
- Blomkalns AL, Chatterjee T, Weintraub NL. Turning ACS outside in: linking perivascular adipose tissue to acute coronary syndromes. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2010;298:H734–H735.
- Horimatsu T, Patel AS, Prasad R, Reid LE, Benson TW, Zazour A, Ogbi M, Bruder do Nascimento T, Belin de Chantemele E, et al. Remote effects of transplanted perivascular adipose tissue on endothelial function and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2018;32:503–510.
- Öhman MK, Luo W, Wang H, Guo C, Abdallah W, Russo HM, Eitzman DT. Perivascular visceral adipose tissue induces atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011;219:33–39.
- Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donck C, Martinet W, De Meyer GRY. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017;816:3–13.
- Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, Sarov-Blat L, O'Brien S, Keiper EA, Johnson AG, Martin J, Goldstein BJ, Shi Y. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003;108:2460–2466.
- Hirata Y, Kurobe H, Akaike M, Chikugo F, Hori T, Bando Y, Nishio C, Higashida M, Nakaya Y, Kitagawa T, Sata M. Enhanced inflammation in epicardial fat in patients with coronary artery disease. *Int Hear J*. 2011;52:139–142.
- Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, Motoki T, Akaike M, Nishio C, Higashida M, Mikasa H, Nakaya Y, Takahashi S, et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:248–255.
- Konishi M, Sugiyama S, Sato Y, Oshima S, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Matsubara J, Sumida H, Nagayoshi Y, et al. Pericardial fat inflammation correlates with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2010;213:649–655.
- Tavora F, Kutys R, Li L, Ripple M, Fowler D, Burke A. Adventitial lymphocytic inflammation in human coronary arteries with intimal atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19:e61–e68.
- Verhagen SN, Vink A, van der Graaf Y, Visseren FLJ. Coronary perivascular adipose tissue characteristics are related to atherosclerotic plaque size and composition: a post-mortem study. *Atherosclerosis*. 2012;225:99–104.
- Kralova Lesna I, Tonar Z, Malek I, Maluskova J, Nedorost L, Pirk J, Pitha J, Lanska V, Poledne R. Is the amount of coronary perivascular fat related to atherosclerosis? *Physiol Res*. 2015;64(suppl 3):S435–S443.
- Mazurek T, Kobylecka M, Zielenkiewicz M, Kurek A, Kochman J, Filipiak KJ, Mazurek K, Huczek Z, Królicki L, Opolski G. PET/CT evaluation of (18)F-FDG uptake in pericoronary adipose tissue in patients with stable coronary artery disease: independent predictor of atherosclerotic lesions' formation? *J Nucl Cardiol*. 2016;24:1075–1084.
- Mazurek T, Kochman J, Kobylecka M, Wilimski R, Filipiak KJ, Królicki L, Opolski G. Inflammatory activity of pericoronary adipose tissue may affect plaque composition in patients with acute coronary syndrome without persistent ST-segment elevation: preliminary results. *Kardiol Pol*. 2014;72:410–416.
- Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Immune-inflammatory responses in atherosclerosis: role of an adaptive immunity mainly driven by T and B cells. *Immunobiology*. 2016;221:1014–1033.
- Tay C, Liu Y-H, Hosseini H, Kanellakis P, Cao A, Peter K, Tipping P, Bobik A, Toh B-H, Kyaw T. B-cell-specific depletion of tumour necrosis factor alpha inhibits atherosclerosis development and plaque vulnerability to rupture by reducing cell death and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2016;111:385–397.
- Ketelhuth DFJ, Hansson GK. Adaptive response of T and B cells in atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:668–678.
- Salonen JT, Korpela H, Salonen R, Nyyssonen K, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Palinski W, Witztum JL. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1992;339:883–887.
- Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, Binder CJ. B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circ Res*. 2014;114:1743–1756.
- Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, Sellevold OF, Espevik T, Sundan A. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*. 2002;105:685–690.
- Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, Silva LFF, Campos FM, da Silva KCS, Leite REP, Grinberg LT, Ferretti-Rebustini REL, Jacob Filho W, Suemoto CK. Perivascular adipose tissue inflammation and coronary artery disease: an autopsy study protocol. *JMIR Res Protoc*. 2016;5:e211.

27. Lucas S. The autopsy pathology of sepsis-related death. *Curr Diagnostic Pathol.* 2007;13:375–388.
28. Tsokos M. Postmortem diagnosis of sepsis. *Forensic Sci Int.* 2007;165:155–164.
29. Stary H. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1177–1178.
30. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1512–1531.
31. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:671–675.
32. Suemoto CK, Nitrini R, Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, Leite RE, Menezes PR, Fregni F, Jacob-Filho W, Pasqualucci CA; Brazilian Aging Brain Study Group. Atherosclerosis and dementia: a cross-sectional study with pathological analysis of the carotid arteries. *Stroke.* 2011;42:3614–3615.
33. Re FERRETTI, Damin A, Bruck S, Morillo L, Perroco T, Campora F, Moreira E, Balbino E, Lima M, Battela C, Ruiz L, et al. Post-mortem diagnosis of dementia by informant interview. *Dement Neuropsychol.* 2010;4:138–144.
34. UCLA: Institute for Digital Research & Education. Regression with Stata chapter 4 – beyond OLS [Internet]. <https://stats.idre.ucla.edu/stata/webbooks/reg/chapter4/regressionwith-statachapter4-beyond-ols-2/>. Accessed October 24, 2019.
35. Xia S, Zhang X, Zheng S, Khanabdalri R, Kalionis B, Wu J, Wan W, Tai X. An update on inflamm-aging: mechanisms, prevention, and treatment. *J Immunol Res.* 2016;2016:1–12.
36. Bailey-Downs LC, Tucsek Z, Toth P, Sosnowska D, Gautam T, Sonntag WE, Csiszar A, Ungvari Z. Aging exacerbates obesity-induced oxidative stress and inflammation in perivascular adipose tissue in mice: a paracrine mechanism contributing to vascular redox dysregulation and inflammation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013;68:780–792.
37. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 2007;128:92–105.
38. Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor? *Hypertension.* 2005;46:454–462.
39. Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res.* 2012;111:245–259.
40. Gu H, Gao Y, Wang H, Hou Z, Han L, Wang X, Lu B. Sex differences in coronary atherosclerosis progression and major adverse cardiac events in patients with suspected coronary artery disease. *J Cardiovasc Comput Tomogr.* 2017;11:367–372.
41. Kosyeva AM, Makarova OV, Kakturskiy LV, Mikhailova LP, Boltovskaya MN, Rogov KA. Sex differences of inflammation in target organs, induced intraperitoneal injection of lipopolysaccharide, depend on its dose. *J Inflamm Res.* 2018;11:431–445.
42. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. *Circ Res.* 2016;118:535–546.
43. Singh P, Castillo A, Islam MT, Majid DSA. Evidence for prohypertensive, proinflammatory effect of interleukin-10 during chronic high salt intake in the condition of elevated angiotensin ii level novelty and significance. *Hypertension.* 2017;70:839–845.
44. Ruan C-C, Ma Y, Ge Q, Li Y, Zhu L-M, Zhang Y, Kong L-R, Wu Q-H, Li F, Cheng L, Zhao AZ, Zhu D-L, Gao P-J. Complement-mediated inhibition of adiponectin regulates perivascular inflammation and vascular injury in hypertension. *FASEB J.* 2017;31:1120–1129.
45. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:98–107.
46. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1983;67:968–977.
47. Hassan M, Latif N, Yacoub M. Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol.* 2012;9:689–702.
48. Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT, Chen YE, Chang L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1621–1630.
49. Wilson PWF. Established risk factors and coronary artery disease: the framingham study. *Am J Hypertens.* 1994;7:7S–12S.
50. Hojbjerg L, Sonne MP, Alibegovic AC, Nielsen NB, Dela F, Vaag A, Bruun JM, Stallknecht B. Impact of physical inactivity on adipose tissue low-grade inflammation in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2011;34:2265–2272.
51. Gaborit B, Venteclef N, Ancel P, Pelloux V, Gariboldi V, Leprince P, Amour J, Hatem SN, Jouve E, Dutour A, Clément K. Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical periaortic, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc Res.* 2015;108:62–73.
52. Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EAL, Daemen MJAP, Lutgens E, de Winther MPJ. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012;225:461–468.
53. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S3–S23.
54. Rehg JE, Bush D, Ward JM. The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. *Toxicol Pathol.* 2012;40:345–374.
55. Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz J-D, Binder CJ, Uytendhove C, Laurans L, Taleb S, Van Vré E, Esposito B, Vilar J, et al. B cell depletion ameliorates whereas its adoptive transfer aggravates atherosclerosis. *J Immunol.* 2010;185:4410–4419.
57. Zouggar Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, Vilar J, Caligiuri G, Tsiantoulas D, Laurans L, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med.* 2013;19:1273–1280.
58. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, Rothenberg FG, Neltner B, Romig-Martin SA, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res.* 2009;104:541–549.
59. Skiba DS, Nosalski R, Mikolajczyk TP, Siedlinski M, Rios FJ, Montezano AC, Jawien J, Olszanecki R, Korbut R, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1-7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. *Br J Pharmacol.* 2017;174:4055–4069.
60. Uchida Y, Uchida Y, Shimoyama E, Hiruta N, Kishimoto T, Watanabe S, Szasz T, Webb C, Lee DE, Kehlenbrink S, et al. Human pericoronary adipose tissue as storage and possible supply site for oxidized low-density lipoprotein and high-density lipoprotein in coronary artery. *J Cardiol.* 2016;69:1–12.
61. Fernández-Alfonso MS, Gil-Ortega M, Arangué I, Souza D, Dreifaldt M, Somoza B, Dashwood MR. Role of PVAT in coronary atherosclerosis and vein graft patency: friend or foe? *Br J Pharmacol.* 2017;174:3561–3572.
62. Gomez-Nicola D, Boche D. Post-mortem analysis of neuroinflammatory changes in human Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2015;7:42.
63. Suleiman M-S, Zacharowski K, Angelini GD. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. *Br J Pharmacol.* 2008;153:21–33.
64. Suemoto CK, Ferretti-Rebustini RE de L, Rodriguez RD, Leite REP, Soterio L, Brucki SMD, Spera RR, Cippiciani TM, Farfel JM, Chiavegatto-Filho A, et al. Neuropathological diagnoses and clinical correlates in older adults in Brazil: a cross-sectional study. *PLoS Med.* 2017;14:e1002267.
65. Farfel JM, Nitrini R, Suemoto CK, Grinberg LT, Ferretti REL, Leite REP, Tampellini E, Lima L, Farias DS, Neves RC, et al. Brazilian Aging Brain Study Group. Very low levels of education and cognitive reserve: a clinicopathologic study. *Neurology.* 2013;81:650–657.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Table S1. Descriptive analysis of coronary artery atherosclerosis and immune cells in the perivascular adipose tissue.

| Variables | Mean (SD) or n (%) |
|---|---------------------------|
| Proximal fragment | |
| . Percentage of arterial obstruction | 56.7 (26.0) |
| . Unstable Atherosclerotic plaques | 41 (16.7%) |
| . Density of macrophages (10^{-5} cells/ μm^2), median (IQR) | 2.44 (1.31; 4.33) |
| . Density of T-lymphocytes (10^{-5} cells/ μm^2), median (IQR) | 0.619 (0.301; 1.07) |
| . Density of B-lymphocytes (10^{-5} cells/ μm^2), median (IQR) | 0.02 (0; 0.07) |
| Distal fragment | |
| . Percentage of arterial obstruction | 17.3 (10.3) |
| . Unstable Atherosclerotic plaques | 0 (0%) |
| . Density of macrophages (10^{-5} cells/ μm^2), median (IQR) | 2.34 (0.99; 4.39) |
| . Density of T-lymphocytes (10^{-5} cells/ μm^2), median (IQR) | 0.601 (0.380.4; 1.12) |
| . Density of B-lymphocytes (10^{-5} cells/ μm^2), median (IQR) | 0.02 (0; 0.05) |
| Difference proximal and distal fragment | |
| . Density of macrophages (10^{-5} cells/ μm^2), median (IQR) | 0.07 (-1.08; 1.10) |
| . Density of T-lymphocytes (10^{-5} cells/ μm^2), median (IQR) | -0.03 (-0.35; 0.40) |
| . Density of B-lymphocytes (10^{-5} cells/ μm^2), median (IQR) | 0 (-0.02; 0.03) |

Table S2. Association of density of CD68⁺ macrophages in the PvAT with sociodemographic and clinical data (n=246).

| Density of CD68⁺ macrophages (10⁻⁵ cells/μm²) | β | 95% CI | p[†] |
|---|----------|----------------|----------------------|
| Age (years), mean (SD) | 0.052 | 0.017; 0.088 | 0.004 |
| Female, n (%) | 0.492 | -0.581; 1.564 | 0.36 |
| White, n (%) | 0.240 | -0.868; 1.349 | 0.66 |
| Education (years), median (IQR) | -0.072 | -0.194; 0.049 | 0.23 |
| Hypertension, n (%) | -0.578 | -1.954; 0.796 | 0.40 |
| Diabetes, n (%) | -0.389 | -1.428; 0.649 | 0.45 |
| CAD symptoms, n (%) | -0.461 | -1.891; 0.968 | 0.52 |
| Cardiac failure, n (%) | -0.298 | -1.341; 0.746 | 0.57 |
| Stroke, n (%) | 0.271 | -1.029; 1.571 | 0.67 |
| Dyslipidemia, n (%) | -0.286 | -1.622; 1.051 | 0.67 |
| BMI, mean (SD) | -0.140 | -0.254; -0.027 | 0.01 |
| Physical inactivity, n (%) | 0.524 | -0.627; 1.675 | 0.36 |
| Current smoking, n (%) | 0.951 | -1.017; 2.920 | 0.33 |
| Current alcohol use, n (%) | -0.414 | -1.542; 0.714 | 0.46 |

[†]Linear regression with robust standard errors to account for repeated measures in the same individual

Table S3. Association of density of CD3⁺ T-lymphocytes in the PvAT with sociodemographic and clinical data (n=246).

| Density of CD3 ⁺ T-lymphocytes (10 ⁻⁵ cells/ μ m ²) | β | 95% CI | p [†] |
|---|---------|---------------|----------------|
| Age (years), mean (SD) | 0.004 | -0.004; 0.013 | 0.30 |
| Female, n (%) | 0.004 | -0.281; 0.289 | 0.97 |
| White, n (%) | -0.156 | -0.459; 0.147 | 0.30 |
| Education (years), median (IQR) | -0.025 | -0.059; 0.007 | 0.12 |
| Hypertension, n (%) | -0.162 | -0.569; 0.245 | 0.43 |
| Diabetes, n (%) | -0.034 | -0.324; 0.255 | 0.81 |
| CAD symptoms, n (%) | 0.029 | -0.300; 0.359 | 0.86 |
| Cardiac failure, n (%) | 0.078 | -0.285; 0.441 | 0.67 |
| Stroke, n (%) | 0.488 | -0.155; 1.131 | 0.13 |
| Dyslipidemia, n (%) | -0.200 | -0.455; 0.054 | 0.12 |
| BMI, mean (SD) | -0.014 | -0.034; .008 | 0.22 |
| Physical inactivity, n (%) | 0.246 | 0.0007; 0.492 | 0.049 |
| Current smoking, n (%) | 0.212 | -0.208; 0.632 | 0.31 |
| Current alcohol use, n (%) | -0.054 | -0.312; 0.203 | 0.67 |

[†]Linear regression with robust standard errors to account for repeated measures in the same individual

Table S4. Association of density of CD20⁺ B-lymphocytes in the PvAT with sociodemographic and clinical data (n=246).

| Density of CD20⁺ B-lymphocytes (10⁻⁵ cells/μm²) | β | 95% CI | p[†] |
|--|---------------------------|----------------|----------------------|
| Age (years), mean (SD) | 0.0004 | -0.0005; 0.001 | 0.35 |
| Female, n (%) | 0.005 | -0.021; 0.031 | 0.69 |
| White, n (%) | -0.020 | -0.047; 0.007 | 0.20 |
| Education (years), median (IQR) | 0.002 | -0.001; 0.005 | 0.20 |
| Hypertension, n (%) | 0.013 | -0.018; 0.045 | 0.40 |
| Diabetes, n (%) | -0.019 | -0.044; 0.005 | 0.11 |
| CAD symptoms, n (%) | -0.017 | -0.059; 0.025 | 0.43 |
| Cardiac failure, n (%) | -0.013 | -0.035; 0.009 | 0.23 |
| Stroke, n (%) | -0.010 | -0.033; 0.013 | 0.40 |
| Dyslipidemia, n (%) | 0.018 | -0.017; 0.052 | 0.31 |
| BMI, mean (SD) | -0.002 | -0.004; 0.0002 | 0.07 |
| Physical inactivity, n (%) | 0.012 | -0.017; 0.040 | 0.41 |
| Current smoking, n (%) | 0.036 | -0.012; 0.084 | 0.13 |
| Current alcohol use, n (%) | 0.014 | -0.015; 0.045 | 0.33 |

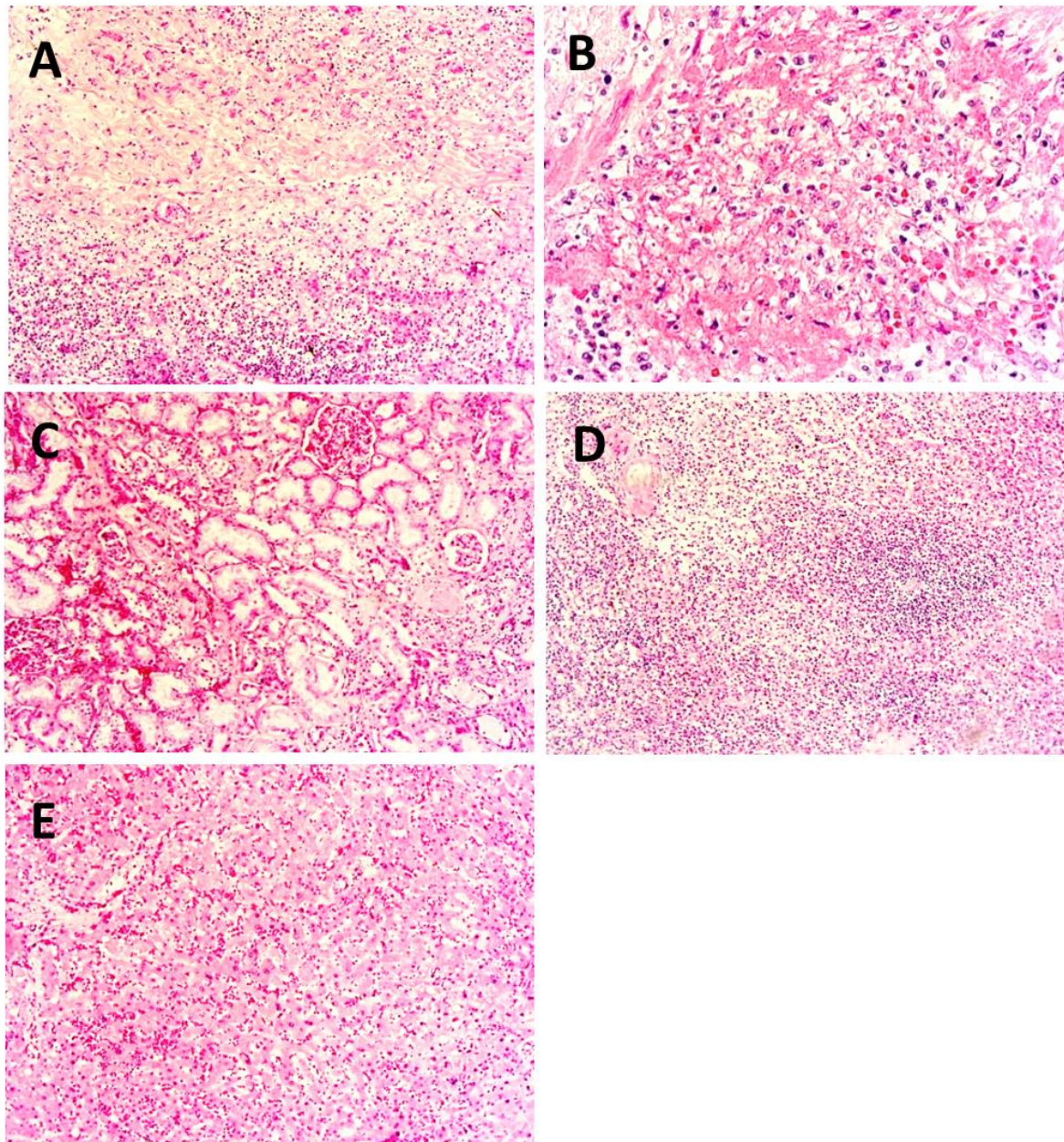
[†]Linear regression with robust standard errors to account for repeated measures in the same individual

Table S5 Comparison of immune cells between perivascular adipose tissue of unstable atherosclerosis and perivascular adipose tissue of stable atherosclerosis in the same individual (n=26 matched pairs).

| The density of immune cells (10^{-5} cells/ μm^2) | Perivascular adipose tissue of unstable atherosclerosis | Perivascular adipose tissue of stable atherosclerosis | p [Ⓜ] |
|--|---|---|----------------|
| . <i>CD68⁺ macrophages</i> | 2.94 (1.93; 6.85) | 3.09 (0.97; 4.33) | 0.008 |
| . <i>CD3⁺ T-lymphocytes</i> | 0.70 (0.28; 1.29) | 0.54 (0.42; 1.11) | 0.19 |
| . <i>CD20⁺ T-lymphocytes</i> | 0.07 (0.02; 0.01) | 0.035 (0.02; 0.07) | 0.58 |

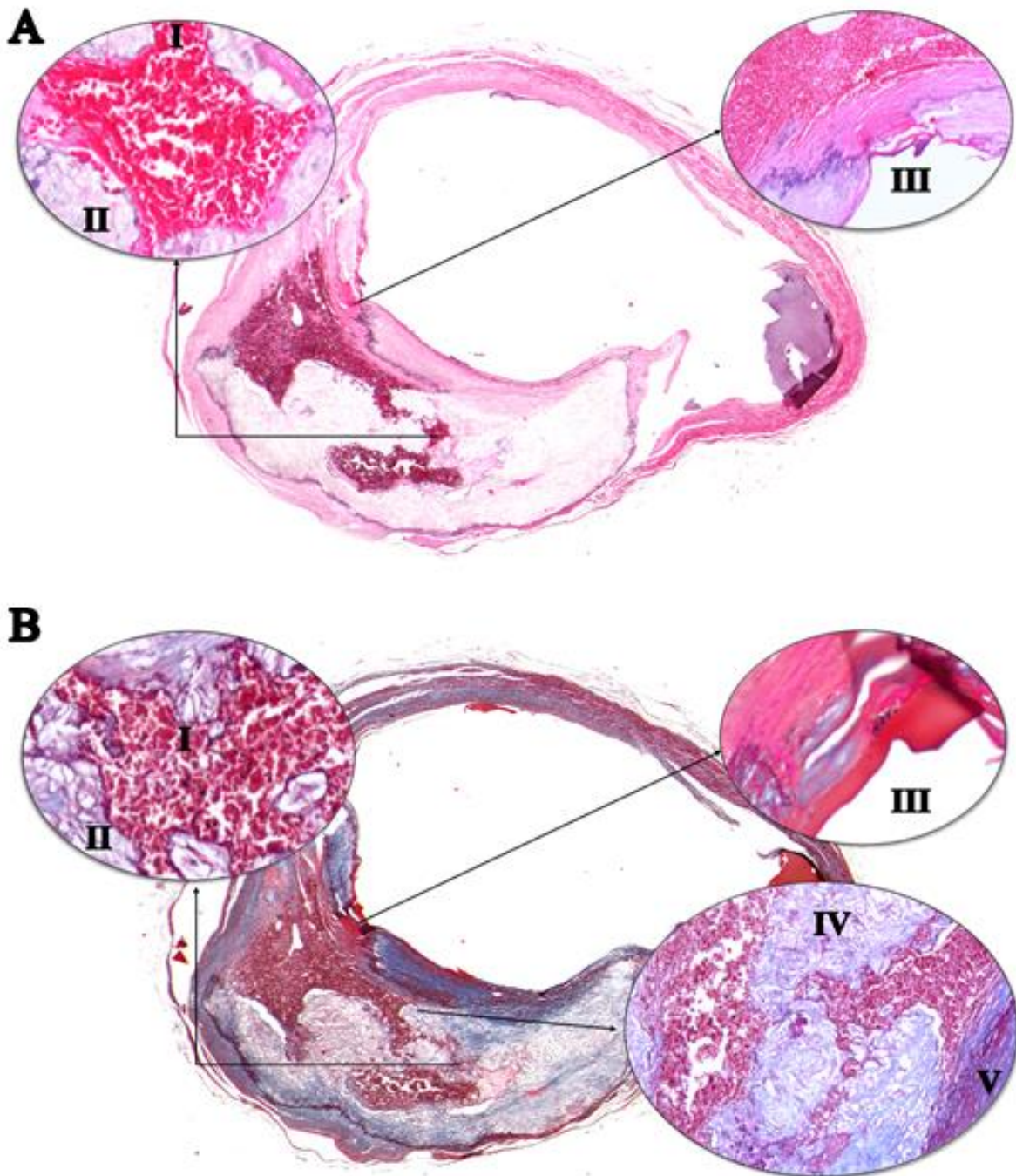
[Ⓜ] Wilcoxon matched pairs signed rank test

Figure S1. Signs of sepsis detected during the anatomopathological post-mortem exam.



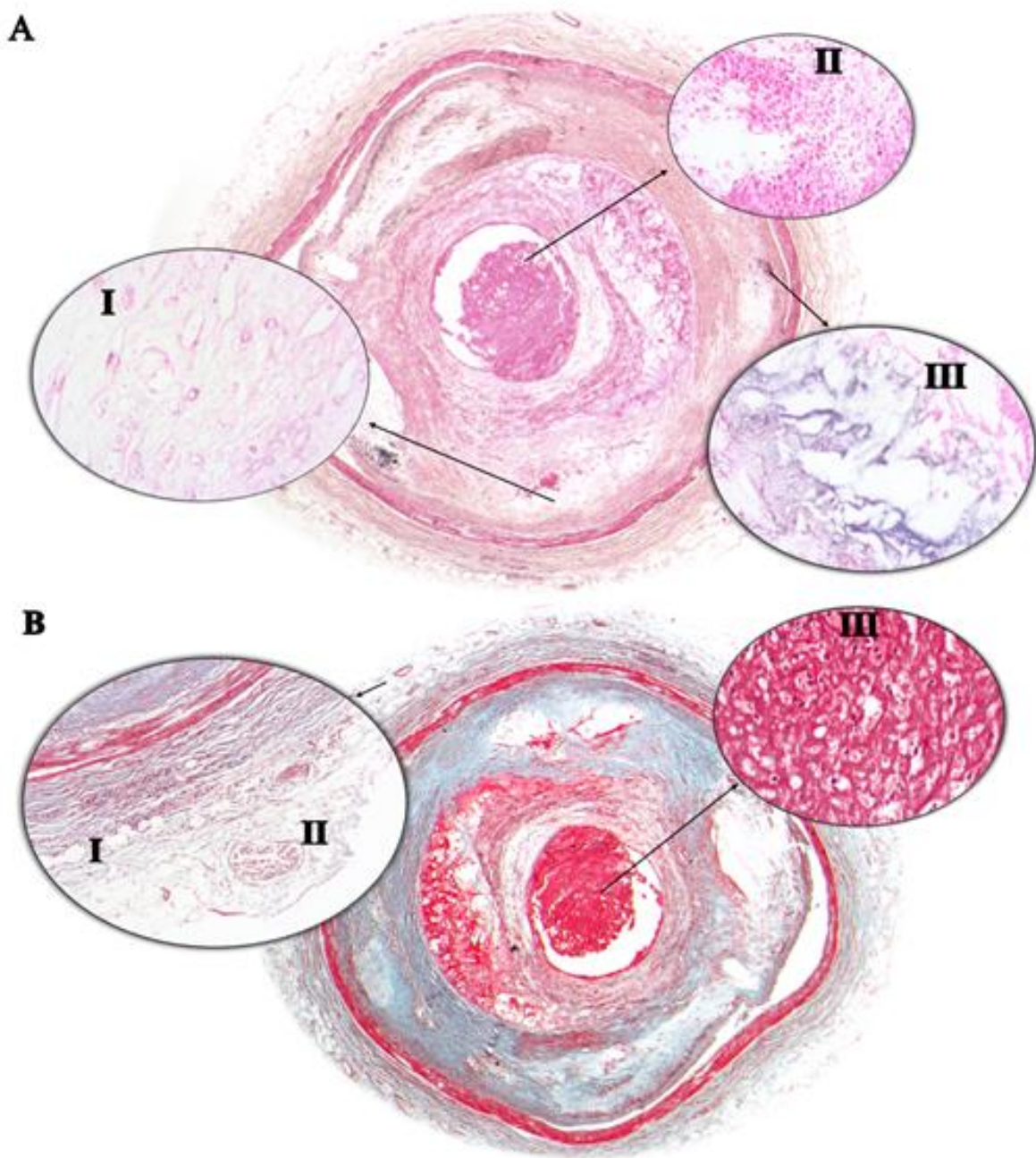
A: microscopic photograph (10x magnification) of lung with neutrophil infiltration due to bronchopneumonia. B: microscopic photograph (40x magnification) of neutrophil infiltrate in the lung. C: microscopic photograph (40x magnification) acute tubular necrosis responsive to shock in the kidney; D: microscopic photograph (10x magnification) of acute splenitis; E: microscopic photograph (10x magnification) of hepatic congestion and steatosis secondary to bronchopneumonia.

Figure S2. Coronary artery with intraplaque hemorrhage.



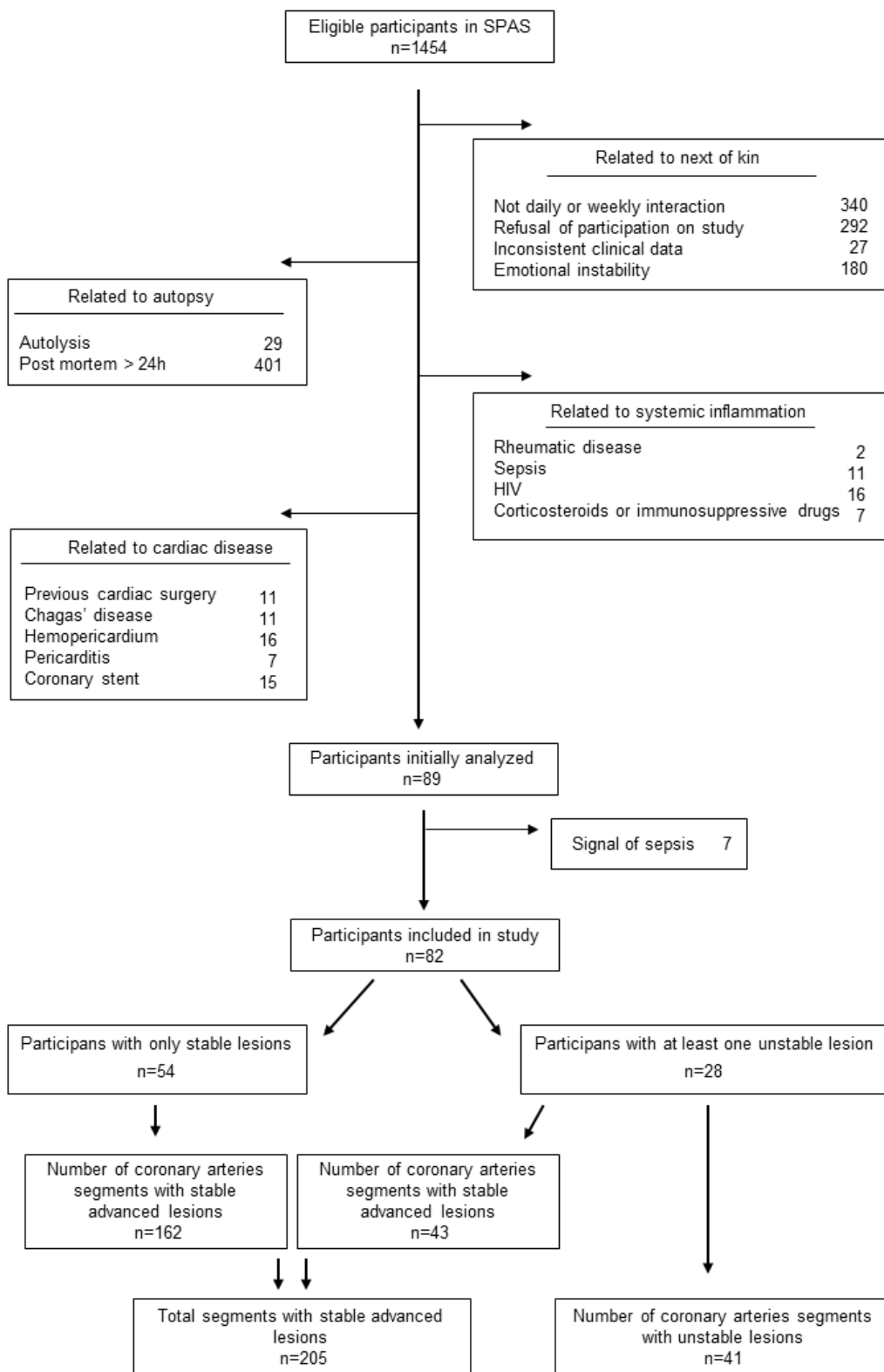
A. Coronary artery fragment stained with haematoxylin-eosin (2x of magnification). I: erythrocytes (40x of magnification); II: lipid core (40x of magnification); III: narrowing of the fibrous cap adjacent to the intraplaque hemorrhage (40x of magnification). B. Coronary artery fragment stained with Masson's trichrome (2x of magnification). I: erythrocytes (40x of magnification); II: lipid core (40x of magnification); III: narrowing of fibrous cap adjacent to intraplaque hemorrhage (40x of magnification); IV: lipid core and intraplaque hemorrhage (10x of magnification) and V: fibroses (10x of magnification).

Figure S3. Coronary artery with thrombus.



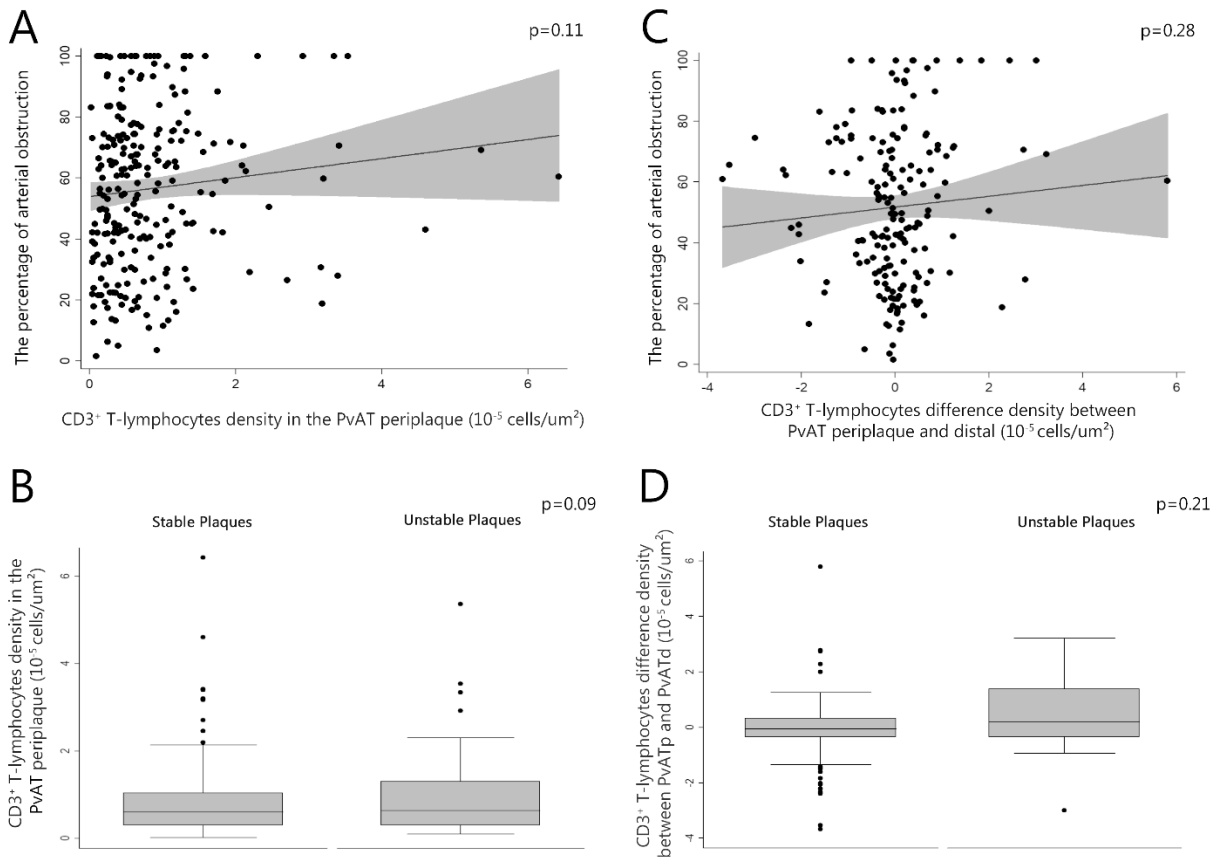
A. Coronary artery fragment stained with haematoxylin-eosin (2x of magnification). I: lipid core (40x of magnification); II: erythrocytes inside the thrombus (40x of magnification); III: calcification (40x of magnification). B. Coronary artery fragment stained with Masson's trichrome (2x of magnification). I: Periplaque perivascular adipose tissue near the adventitia layer (10x of magnification); II: *vasa vasorum* (10x of magnification); III: thrombus (40x of magnification).

Figure S4. Flowchart of study participants.



SPAS: São Paulo Autopsy Service. HIV: Human Immunodeficiency Virus.

Figure S5. Association between CD3⁺ T-lymphocytes and atherosclerosis.



PvATp: periplaque perivascular adipose tissue; PvATd: distal perivascular adipose tissue. A: Scatter plot of the density of CD3⁺ T-lymphocytes in periplaque PvAT with the percentage of coronary artery obstruction. B: Box plot graph of the density of CD3⁺ T-lymphocytes in periplaque PvAT by stable and unstable plaque groups. C: Scatter plot of the difference of the CD3⁺ T-lymphocytes density in periplaque PvAT and distal PvAT with the percentage of coronary artery obstruction. D: Box plot graph of the difference density of CD3⁺ T-lymphocytes between periplaque PvAT and distal PvAT by stable and unstable plaque groups. PvATp: periplaque perivascular adipose tissue; PvATd: distal perivascular adipose tissue.

Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

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

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

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

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci

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

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

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

Muito obrigado por sua atenção.

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

Este estudo ocorrerá da seguinte maneira:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VI. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

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

Data ____/____/____

Assinatura do representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

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

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

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo III – Aprovação do comitê de ética em pesquisa

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR ASSOCIADA À DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA: UM ESTUDO DE AUTÓPSIA

Pesquisador: Claudia Kimie Suemoto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 70793717.0.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.178.718

Apresentação do Projeto:

O projeto foi bem fundamentado com bases em dados atualizados da literatura. O texto é apresentado de forma clara e objetiva. Não envolve participação estrangeira e nem entidade externa. Trata-se de um estudo retrospectivo, observacional de corte transversal com finalidade acadêmica "DOUTORADO" da aluna "Daniela Souza Farias-Itao" com orientação da "Claudia Kimie Suemoto". Este projeto é a continuação do estudo anterior intitulado "Associação entre inflamação do tecido adiposo epicárdico e doença arterial coronariana: um estudo clinicopatológico", conduzido nesta mesma instituição, aprovado pelo CEP da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob número 439/12 e teve como objetivo a titulação acadêmica de mestrado da mesma aluna. O presente estudo será realizado no Laboratório de Patologia Cardiovascular (LIM-22) e serão utilizadas amostras previamente obtidas no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC) da FMUSP pertencentes ao biorepositório do estudo "Correlação entre gordura abdominal visceral e torácica com o grau de aterosclerose sistêmica" aprovado pelo CEP da FMUSP sob número 412/11 e sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário

Investigar a associação do perfil inflamatório no tecido adiposo perivascular (TAP) adjacente às

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.178.718

placas ateroscleróticas de artérias coronárias em um estudo de autópsia.

Objetivos secundários

1. Investigar a associação entre a polarização dos macrófagos no TAP adjacente à principal placa aterosclerótica coronariana com a porcentagem de obstrução arterial e classificação quanto à instabilidade da placa aterosclerótica.
2. Investigar a associação entre a linhagem de linfócitos Tregs e Th1 no TAP adjacente à principal placa aterosclerótica coronariana com a porcentagem de obstrução arterial e classificação quanto à instabilidade da placa aterosclerótica.
3. Investigar a associação entre a linhagem de linfócitos B-1 e B-2 no TAP adjacente à principal placa aterosclerótica coronariana com a porcentagem de obstrução arterial e classificação quanto à instabilidade da placa aterosclerótica.
4. Comparar o perfil inflamatório no TAP adjacente à principal placa aterosclerótica (periplaca) com TAP distal (controle).

As principais hipóteses são:

- i) O TAP periplaca tem um perfil pró-inflamatório caracterizado pela diferença significativa entre a proporção de macrófagos M1, linfócitos Th1 e linfócitos B-2 em comparação com a proporção das linhagens anti-inflamatórias. Além disso, estas células com o perfil pró-inflamatório está associada com lesões ateroscleróticas avançadas: alto grau de obstrução arterial e placas instáveis.
- ii) O TAP distal tem números de células com perfis pró-inflamatórios e anti-inflamatórias sem diferença significativa entre os grupos com placas ateroscleróticas estáveis e instáveis, e não correlação com a porcentagem de obstrução arterial.
- iii) A relação do número de células consideradas pró-inflamatórias tem maior proporção no TAP periplaca do que o TAP distal, e esta diferença será maior na presença de placas ateroscleróticas instáveis em comparação às placas estáveis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco mínimo.

Benefícios:

Não há benefícios diretos para os doadores das amostras em questão. Entretanto, os resultados de um projeto desta magnitude trarão grandes benefícios para o entendimento da associação do perfil inflamatório no TAP adjacente às placas ateroscleróticas de artérias coronárias.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21ª andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.248-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**



Continuação do Parecer: 2.178.718

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo retrospectivo, observacional de corte transversal com financiamento próprio, sem envolvimento de entidades externas e de participantes estrangeiros. Este estudo envolve a obtenção de título acadêmico e tem por finalidade investigar a associação do perfil inflamatório no TAP adjacente às placas ateroscleróticas de artérias coronárias em um estudo de autópsia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação apresentada conforme legislação vigente e normas da instituição.

Recomendações:

Embora o pesquisador não tenha solicitado dispensa do TCLE conforme conta no Cadastro de Pesquisa da Plataforma Brasil, acredito que por se tratar de um estudo retrospectivo, observacional de corte transversal, no qual serão utilizadas amostras pertencentes à um biorepositório previamente aprovado por este CEP, a aplicação do mesmo não se faz necessária.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|----------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_861122.pdf | 29/06/2017 15:48:57 | | Aceito |
| Outros | Cappesq_Daniela_Claudia.pdf | 29/06/2017 15:48:22 | Daniela Souza farias | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_rosto_Daniela_Claudia.pdf | 29/06/2017 15:47:22 | Daniela Souza farias | Aceito |
| Outros | Carta_CEP.pdf | 17/05/2017 00:26:52 | Daniela Souza farias | Aceito |
| Outros | CEP_439_2012.pdf | 17/05/2017 00:25:20 | Daniela Souza farias | Aceito |
| Outros | Termo_Laboratorio.pdf | 17/05/2017 00:23:08 | Daniela Souza farias | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_detalhado.pdf | 17/05/2017 00:21:55 | Daniela Souza farias | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Cardiovascular.pdf | 15/05/2017 15:15:39 | Daniela Souza farias | Aceito |

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
 Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.178.718

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 19 de Julho de 2017

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: oep.fm@usp.br

Anexo IV – Aprovação do Estudo no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



APROVAÇÃO

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

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

Pesquisador (a) Responsável: Claudia Kimie Suemoto

Pesquisador (a) Executante: Daniela Souza Farias

CEP-FMUSP, 19 de Dezembro de 2012.

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

Anexo V – Entrevista clínica

Entrevista Clínica

NSVO: _____ Nº Caso: _____ Destino: _____

Entrevistador: _____

Data do Óbito: _____ Hora do óbito: _____

Data EC: _____ Horário de Início: _____

Data da Autópsia: _____ Hora da Autópsia: _____ IPM: _____

*Dados do Informante:*Nome: _____ Idade: _____ Gênero M F Escolaridade: _____ anosParentesco _____ Convivência: D S M A Resida na mesma casa: N S Com quem residia: _____Tinha cuidador: N S Cuidador: formal informal Cuidador primário: N S NA Acompanhante: _____*Dados do Falecido:*Nome: _____ DN: ____/____/____ Idade ao óbito: _____ Gênero: M FRaça: B N P A Naturalidade: _____ Procedência: _____ Estado Civil: S C V A D Filhos: _____Escolaridade: _____ anos [A <4a <8a <12a >15a] Idioma: Port apenas _____ Lateralidade: Destro Sinistro ADProfissão: do lar doméstica _____ CBO: Grande grupo _____ Subgrupo principal: _____Situação trabalhista: ainda trabalhava aposentado _____ a aposentado por invalidez _____ a pensionista outro _____*Caracterização do óbito:*Como ocorreu o óbito: domicílio hospital durante o trajeto para o hospital (carro ou APH) logradouro público

HPMA: _____

Dados da DO (condições e causa do óbito):

a. _____

b. _____

c. _____

d. _____

*Antecedentes Pessoais*Quanto tempo antes de morrer ele(a) estava doente? Não estava doente, foi súbito horas _____ dias/ mês/ anos Não sabeProcurou cuidados de saúde enquanto esteve doente? N S: Atenção básica (CS-UBS) _____ ESF Consultório médico Hospital Público _____ Hospital privado _____ Outro tipo de assistência: _____ Não sabeAssistência à saúde: SUS Convênio _____ Quando precisava, ele podia contar com a ajuda de alguém para atender suas necessidades? N S - quem? _____ Nega ou desconhece qualquer dos antecedentes patológicos abaixo HAS DM DAC IC (CF _____) Arritmia MP/CDI DLP DVP IRC Hepatite Insuficiência Hepática Gastrite Hipo/hipertireoidismo Bronquite/Asma DPOC Osteoartrose Osteoporose AIDS Sífilis Neoplasia _____ tratada em tratamento RT QT tto cirúrgico AVE (i-h) prévio [há _____ anos - sem sequela com sequela cognitiva com sequela motora outro tipo de sequela _____] TCE S. Down D Parkinson Epilepsia Depressão Esquizofrenia TAB TOC Outra _____Demência diagnosticada em vida? N S Há _____ a - Etiologia: _____ História compatível com demência? não simInício dos sintomas: lento súbito memória comportamento outro _____Curso: lento e progressivo rápido evolução em degraus curso flutuante*Fatores de Risco*P _____ A _____ IMC _____ - Desnutrição Obesidade Perda não intencional de peso nos últimos 6 meses (> 5%) _____Durante a vida, quais dessas substâncias ele(a) usou (sem prescrição médica): derivados do tabaco bebidas alcoólicas drogas (maconha, cocaína, crack) anfetaminas ou éxtase inalantes hipnóticos/sedativos alucinógenos opióides outras _____ usou drogas por injeção Tabagismo: N S Idade de início: _____ Nº de cigarros por dia? _____ Fumava em ambientes abertos fechados ambosTipo de fumo: Cigarro Charuto Cachimbo Cigarilha Narguile Tabaco/ Fumo mascado Não sabe Parou _____ Etilismo: N S - social (uso) alcoolismo (abuso) Tipo de bebida: D F Quantidade: D S M R Parou _____ Menopausa Reposição hormonal

Tratamentos anteriores

Clínicos _____

Cirurgicos _____

 Não fazia tratamento/acompanhamento de saúde atualmente Nunca foi ao médico: recusa/sem acesso/nunca precisouNos últimos 12 meses ele(a) foi hospitalizado? N S Quantas vezes? _____De um modo geral, como ele classificava a saúde dele? Ruim Razoável Boa Muito boa Excelente Não sei dizer**Padrões Funcionais de Saúde**Acuidade visual Preservada Diminuída Óculos Acuidade auditiva Preservada Hipoacusia Prótese auditivaDentição preservada edentulismo parcial/total uso de prótese dentáriaDeglutição preservada disfagia Via de alimentação Oral SNG/SNE GTSEliminação urinária: Normal Nictúria Poliúria Oligo/anúria Fez ou fazia diálise? N S (CAPD DPI HD)Via de eliminação urinária: espontânea cateterismo intermitente SVD Usava fralda IU Incontinência fecalTinha dificuldade para andar N S NSDeambulação: sem auxílio auxílio de PM auxílio de EP auxílio de P Acamado _____Uso de equipamentos auxiliares: não usava usava – qual: _____Integridade da pele Pele íntegra Lesões cutâneas UPP _____ Edema de MMII: N S Amputações: N SAtividade física: Sedentário Atividade Doméstica No trabalho Caminhada Outra: _____ Freq/sem: _____Nos últimos 12 meses ele(a) praticou atividade física regular (> 3x/sem): N S Foi atleta? N S _____Queixava de fadiga? (se sentia cansado) N S NS Conseguia subir 1 lance de escada? N S NSTinha dificuldades para andar uma quadra? : N S NS Conseguia deitar sem travesseiros acordava no meio da noite com falta de ar ou tosseSentia falta de ar: N S NS Se sim, era: parado ou para falar tomar banho, ficar de pé ou andar no plano para subir até 3 lances de escada ou carregar volumes leves no plano para subir mais que 3 lances de escada ou grandes aclives para carregar volumes pesados no plano ou pesos leves em aclives ou para correrUsava oxigênio em casa: N S – qual dispositivo: _____Autonomia: Tomava decisões sozinho Não tomava decisõesIndependência: Independente Parcialmente dependente Totalmente dependente

OBS: _____

Medicações que usava Não usava: não foi prescrito controle inadequado NREF NMED _____ Antihipertensivos Hipoglicemiantes Hipolipemiantes Insulina AAS Cardiotônicos Diuréticos Ca Antiinflamatórios: AINES/ Corticóides Antiparkinsonianos: Levodopa/ Stalevo/ Selegilina/ Rasagilina Anticolinesterásicos: Rivastigmina/ Donepezil/ GalantaminaPsicotrópicos: BZDP _____ NRLP _____ Carbonato de Lítio Ácido valpróico Carbamazepina Lamotrigina

Outros: _____

Automedicação: _____

Antecedentes familiares IAM _____ HAS _____ DM _____ DLP _____ Doença Renal _____ Doença da Tireoide _____ Alergias _____ Asma/Bronquite _____ Tuberculose _____ Câncer _____ Depressão: _____ Demência: _____ Derrame: _____ Epilepsia ou convulsões: _____ Retardo mental ou autismo: _____ Surdez: _____ Cegueira: _____ Desequilíbrio: _____ Tremores: _____ Fraqueza muscular: _____ Parou de andar sem acidente: _____ Episódios de euforia/mania: _____ TOC _____ Tentativa de Suicídio: _____ Dependência Alcoólica _____ Dependência Drogas Ilícitas _____ Outras _____

*Informant questionnaire on cognitive decline in the elderly
(IQCODE – Versão Brasileira¹)*

Gostaríamos que você se lembrasse de como era seu amigo ou familiar há 10 anos atrás e compare com o estado em que ele estava há 3 meses antes de sua morte. Comparada com há 10 anos atrás, como estava a pessoa antes de sua morte:

| | Muito melhor (1) | Um pouco melhor (2) | Não muito alterado (3) | Um pouco pior (4) | Muito pior (5) |
|--|------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------|
| 1. Lembrar de rostos de parentes e amigos | | | | | |
| 2. Lembrar dos nomes de parentes e amigos | | | | | |
| 3. Lembrar de fatos relacionados a parentes e amigos como, por exemplo: suas profissões, aniversários e endereços. | | | | | |
| 4. Lembrar de acontecimentos recentes | | | | | |
| 5. Lembrar-se de conversas depois de poucos dias | | | | | |
| 6. No meio de uma conversa, esquecer o que ele (a) queria dizer | | | | | |
| 7. Lembrar-se de seu próprio endereço e telefone | | | | | |
| 8. Lembrar (saber) que dia e mês era | | | | | |
| 9. Lembrar onde as coisas são usualmente guardadas | | | | | |
| 10. Lembrar-se de onde encontrar as coisas que foram colocadas em lugares fora do comum | | | | | |
| 11. Adaptar-se a qualquer mudança na sua rotina diária | | | | | |
| 12. Saber como funcionam os eletrodomésticos | | | | | |
| 13. Aprender a usar novos eletrodomésticos/ utensílios domésticos | | | | | |
| 14. Aprender coisas novas em geral | | | | | |
| 15. Lembrar-se de coisas que aconteceram em sua vida quando era jovem | | | | | |
| 16. Lembrar-se de coisas que aprendeu quando era jovem | | | | | |
| 17. Entender o significado de palavras não comuns | | | | | |
| 18. Entender o significado do que está escrito em jornais e revistas | | | | | |
| 19. Acompanhar uma estória em um livro ou pela TV | | | | | |
| 20. Escrever uma carta para um amigo ou com fins de trabalho | | | | | |
| 21. Saber sobre eventos históricos importantes do passado | | | | | |
| 22. Tomar decisões com problemas do dia a dia | | | | | |
| 23. Manusear dinheiro para compras | | | | | |
| 24. Lidar com problemas financeiros (ex: pensão, conta bancária) | | | | | |
| 25. Lidar com outros problemas matemáticos, por exemplo: saber quanto comprar de comida, saber quanto tempo se passou entre as visitas dos familiares/ amigos. | | | | | |
| 26. Usar sua inteligência para entender o que está acontecendo e o motivo pelo qual está acontecendo. | | | | | |

Total: _____

1- Ele(a) conseguia ler e entender pequenas frases?

3- Ele(a) conseguia anotar um recado?

¹ ATC em: Sanchez MAS e Lourenço RA. Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly (IQCODE): adaptação transcultural para uso no Brasil. Cad. Saúde Pública, 2009; 25(7):1455-1465.

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA – FOLHA DE REGISTRO

Esta é uma entrevista semi-estruturada. Por favor, faça todas estas perguntas. Faça quaisquer questões adicionais que sejam necessárias para determinar o CDR do sujeito. Por favor, tome nota das informações das perguntas adicionais.

QUESTÕES SOBRE MEMÓRIA PARA O INFORMANTE

1. Ele/ela tinha algum problema com sua memória ou seu pensamento (raciocínio)? SIM NÃO
 1a - Se sim, era um problema constante? (em oposição a eventual, raro) SIM NÃO
2. Ele/ela podia se lembrar de eventos recentes? Frequentemente Às vezes Raramente
3. Ele/ela podia se lembrar de uma lista curta de itens (compras)? Frequentemente Às vezes Raramente
4. Houve algum declínio na memória durante o último ano? SIM NÃO
5. Sua memória está comprometida a tal ponto que teria interferido em suas atividades de vida diária de alguns anos atrás? (ou atividades pré-aposentadoria) (opinião de outros informantes) SIM NÃO
6. Ele/ela se esquecia completamente de um evento importante (ex. viagem, festa, casamento em família) algumas semanas depois do evento? Frequentemente Às vezes Raramente
7. Ele/ela se esquecia de detalhes pertinentes de um evento importante? Frequentemente Às vezes Raramente
8. Ele/ela se esquecia completamente de informações importantes do passado distante (ex. data de nascimento, data de casamento, local do emprego)? Frequentemente Às vezes Raramente
9. OBS - Questão removida por não ser aplicável.

QUESTÕES SOBRE ORIENTAÇÃO PARA O INFORMANTE

Com que frequência ele/ela sabe o exato:

1. Dia do Mês? Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe
2. Mês? Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe
3. Ano? Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe
4. Dia da semana? Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe
5. Ele/ela tinha dificuldades com relações temporais (quando os eventos ocorreram em relação uns com os outros)? Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe
6. Ele/ ela podia achar seu caminho em ruas conhecidas? Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe
7. Com que frequência ele/ela sabia como ir de um lugar para o outro fora de sua vizinhança? Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe
8. Com que frequência ele/ela podia encontrar seu caminho dentro de casa? Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

QUESTÕES SOBRE JULGAMENTO E RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS PARA O INFORMANTE

1. Em geral, se você tivesse que avaliar as habilidades dele/dela para resolver problemas atualmente, você consideraria que elas são:
 - Tão boas quanto sempre foram
 - Boas, mas não tão boas quanto antes
 - Regulares.
 - Ruins.
 - Não há nenhuma habilidade.
2. Avalie sua habilidade em lidar com pequenas quantias de dinheiro (ex.: trocar dinheiro, dar gorjeta):
 - Não há perda
 - Alguma perda
 - Perda grave
3. Avalie sua habilidade em lidar com transações financeiras complicadas (ex.: pagar contas, controle de conta bancária):
 - Não há perda
 - Alguma perda
 - Perda grave.
4. Ele/ela podia lidar com uma emergência doméstica (ex. vazamento nos encanamentos, pequenos incêndios):
 - Tão bem quanto antes.
 - Pior do que antes por causa da dificuldade de pensamento (raciocínio).
 - Pior do que antes, por outra razão (qual) _____
5. Ele/ela podia entender situações ou explicações?
 - Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe
6. Ele/ela se comportava de modo apropriado* [isto é, em sua maneira usual (pré-doença)] em situações sociais e em interação com outras pessoas?
 - Frequentemente Às vezes Raramente Não sabe

* Este item avalia comportamento, não aparência.

QUESTÕES SOBRE ASSUNTOS COMUNITÁRIOS PARA O INFORMANTE

Ocupacional

1. O sujeito ainda estava trabalhando? SIM NÃO N/A
 Se não aplicável - vá para o item número 4
 Se sim - vá para o item número 3
 Se não - vá para o item número 2
2. Os problemas de memória ou de pensamento (raciocínio) contribuíram para a decisão do sujeito de se aposentar? (vá para o item número 4) SIM NÃO N/A
3. O sujeito tinha dificuldade significativa em seu trabalho por causa de problemas com memória ou pensamento (raciocínio)?
 Raramente ou nunca Às vezes Frequentemente Não sabe

Social

4. Ele/ela alguma vez dirigiu carro? SIM NÃO
5. Ele/ela dirigia carros atualmente? SIM NÃO
6. Se não, era devido a problemas de memória ou pensamento (raciocínio)? SIM NÃO
7. Se ele/ela ainda estava dirigindo, havia problemas ou riscos devido ao pensamento (raciocínio) pobre? SIM NÃO
8. Ele/ela era capaz de fazer compras para suas próprias necessidades independentemente?

Raramente ou nunca Às vezes Frequentemente Não Sabe

(Precisa ser acompanhado em qualquer compra)

(Pode comprar um número limitado de itens, compra itens duplicados ou esquece itens necessários)

9. Ele/ela era capaz de fazer atividades independentemente fora de sua casa?

- Raramente ou nunca
 (Frequentemente incapaz de realizar atividades sem ajuda)
- Às vezes
 (Atividades limitadas ou de rotina, por exemplo, participação superficial na igreja ou reuniões, idas a salão de beleza).
- Frequentemente
 (Participação significativa em atividades, por exemplo, votar)
- Não sabe

10. Ele/ela era levado a eventos sociais fora da casa de familiares? SIM NÃO

Se não, por que não? _____

Em que situações ele(a) convivia com muitas pessoas? _____

11. Um observador casual do comportamento do sujeito pensaria que ele está doente? SIM NÃO12. Se institucionalizado, ele/ela participa bem de atividades sociais? SIM NÃO**IMPORTANTE:**

As informações coletadas são suficientes para classificar o nível de comprometimento do sujeito em assuntos comunitários?

Se não, por favor, investigue mais.

Atividades na comunidade: tais como ir à igreja, visitar amigos ou família, atividades políticas, organizações profissionais tais como associações, outros grupos profissionais, clubes sociais, organização de serviços, programas educacionais).

* Por favor, adicione notas se necessário para esclarecer o nível de funcionamento do sujeito nesta área.

QUESTÕES SOBRE O LAR E ATIVIDADES DE LAZER PARA O INFORMANTE

1a) Que mudanças ocorreram em suas habilidades de realizar tarefas domésticas? Nenhuma _____1b) O que ele/ela ainda podia fazer bem? Tudo o que sempre fez _____2a) Que mudanças ocorreram em suas habilidades para realizar seus passatempos (hobbies)? Nenhuma _____2b) O que ele/ela ainda podia fazer bem? Tudo o que sempre fez _____

3) Se institucionalizado, o que ele/ela não podia mais fazer bem (Casa e Hobbies) _____

Ele(a) tocava algum instrumento musical com desenvoltura? N S Qual? _____Praticou ou Praticava algum esporte, profissionalmente? N S Qual? _____

Atividades da vida diária (Blessed):

| | Nenhuma perda | | Perda grave |
|--|---------------|-----|-------------|
| 4) Habilidade para realizar tarefas domésticas | 0 | 0,5 | 1 |

Por favor, descreva: _____

5) Ele/ela era capaz de realizar tarefas domésticas até o nível de: (Escolha uma, o informante não precisa ser perguntado diretamente)

- Sem função significativa - (Realiza atividades simples, tais como fazer a cama, somente com muita supervisão)
- Funciona somente em atividades limitadas - (Com alguma supervisão, lava a louça com limpeza aceitável, coloca a mesa)
- Funciona independentemente em algumas atividades - (Opera equipamentos, tal como aspirador de pó, prepara refeições simples)
- Funciona em atividades usuais mas não no nível usual
- Funciona normalmente em atividades usuais

IMPORTANTE:

As informações coletadas são suficientes para classificar o nível de comprometimento do sujeito em CASA & HOBBIES?

Se não, por favor investigue mais.Tarefas Domésticas: Tais como cozinhar, lavar, limpar, fazer compras, levar o lixo para fora, limpar o quintal, manutenção de cuidados básicos e reparos básicos na casaHobbies: Costurar, pintar, artesanato, leitura, entretenimento, fotografia, jardinagem, ir ao teatro ou concerto, trabalho em madeira, participação em esportes.

QUESTÕES SOBRE O AUTOCUIDADO PARA O INFORMANTE

“Qual sua estimativa da habilidade mental dele (a) nas seguintes áreas:”

| | | | | |
|----------------------------------|--|--|--|--|
| Vestir-se (Blessed) | Sem ajuda (0) | Às vezes não abotoa os botões corretamente. (1) | Sequência errada - esquece itens comumente. (2) | Incapaz de se vestir (3) |
| Lavar-se (Arrumar-se) | Sem ajuda (0) | Necessita de estímulo (1) | Algumas vezes precisa de ajuda (2) | Sempre – ou quase sempre – precisa de ajuda (3) |
| Hábitos À mesa | De modo limpo; utiliza os talheres adequados. (0) | De modo desorganizado; utiliza apenas colher. (1) | Apenas sólidos simples (2) | Tem que ser alimentado (3) |
| Controle de esfíncter | Controle completo normal (0) | Ocasionalmente molha a cama (1) | Frequentemente molha a cama (2) | Duplamente incontinente (3) |

*Escore 1 pode ser considerado se o autocuidado estiver comprometido quando comparado a um estado anterior, mesmo que não receba estímulo.

ESCORE CLÍNICO DE DEMÊNCIA (CDR)

| | | | | | |
|----------------------------------|---|-----|---|---|---|
| Escore Clínico de Demência (CDR) | 0 | 0,5 | 1 | 2 | 3 |
|----------------------------------|---|-----|---|---|---|

| | Comprometimento | | | | |
|---|---|--|---|--|--|
| | Normal 0 | Questionável 0,5 | Leve 1 | Moderada 2 | Grave 3 |
| Memória | Sem perda de memória ou esquecimento leve e inconstante. | Esquecimento leve e constante (em oposição a eventual); recordação parcial de eventos; esquecimento "benigno". | Moderada perda de memória; mais marcada para eventos recentes; déficit interfere nas atividades cotidianas. | Perda de memória grave; somente retém material intensamente aprendido; material novo rapidamente perdido. | Perda de memória grave; restam apenas fragmentos. |
| Orientação | Plenamente orientado. | Plenamente orientado, exceto por leve dificuldade nas relações temporais. | Dificuldade moderada com relações temporais; orientado para lugar do exame; pode ter desorientação geográfica em outros lugares. | Dificuldade grave com relações temporais; usualmente desorientado para o tempo, frequentemente para o espaço. | Orientado apenas para pessoa. |
| Julgamento e resolução de problemas | Resolve bem problemas diários e administra bem negócios e finanças; bom julgamento em relação ao desempenho prévio. | Leve dificuldade em resolver problemas, similaridades e diferenças. | Dificuldade moderada para administrar problemas, similaridades e diferenças; julgamento social usualmente mantido. | Grave dificuldade em administrar problemas, similaridades e diferenças; julgamento social usualmente comprometido. | Incapaz de fazer julgamentos ou de resolver problemas. |
| Assuntos Comunitários | Função independente no nível usual no trabalho, em compras, grupos sociais ou de voluntários. | Leve dificuldade nessas atividades | Incapaz de funcionar independentemente nessas atividades, embora ainda possa engajar-se em algumas; parece normal à inspeção casual. | Nenhuma referência a funcionamento independente fora de casa. Parece estar bem para ser levado a atividades fora de ambiente familiar. | Nenhuma referência a funcionamento independente fora de casa. Parece estar muito doente para ser levado a atividades fora de ambiente familiar |
| Tarefas do Lar e Atividades de Lazer | Vida no lar, passatempos e interesses intelectuais bem mantidos. | Vida no lar, passatempos e atividades intelectuais levemente comprometidos. | Dificuldade leve mas evidente nas funções do lar; tarefas mais difíceis abandonadas; passatempos e interesses mais complexos abandonados. | Somente tarefas simples preservadas, interesses muito restritos e mal sustentados. | Sem função significativa em casa. |
| Autocuidado | Plenamente capaz para o autocuidado. | | Necessita estímulo. | Requer ajuda para vestir-se, higiene e cuidado com objetos pessoais. | Requer muita ajuda para o cuidado pessoal, incontinência frequente. |

SB: _____

Índice de Katz para Atividades de Vida Diária

(Katz, S; Down, TD; Cash, HR, et al – 1970)

| | |
|------------------|--|
| Banho | I - Independente – não necessita de auxílio A - Auxílio – recebe assistência para banhar uma parte do corpo (dorso/pernas) D – Dependente – necessita que alguém o banhe |
| Vestuário | I - Alcança as roupas e se veste sem auxílio A - Necessita de auxílio apenas para amarrar sapatos D - Necessita de auxílio para alcançar as roupas, para se vestir – do contrário não se veste completamente ou permanece totalmente despido |
| Uso de sanitário | I - Consegue chegar ao banheiro, usa o sanitário, e recoloca o vestuário sem auxílio (pode usar equipamento auxiliar como bengala, cadeira de roda, usar comadre e esvaziar pela manhã) A - Necessita de auxílio para ir até o banheiro, ou para sua higienização/ recomposição do vestuário após uso do sanitário/ ou no uso de comadre D - Não usa o banheiro para eliminações |
| Transferência | I - Independente (cama/ cadeira) – pode necessitar de bengala, andador. A - Necessita de ajuda para sentar-se/ deitar-se/ levantar-se D - Não sai da cama |
| Continência | I - Tem controle de esfíncter vesíco-intestinal A - Apresenta “acidentes ocasionais” – perder urina/ conteúdo fecal ocasionalmente D - Necessita de auxílio para o controle urinário/intestinal; uso de SVD; incontinência |
| Alimentação | I - Se alimenta sem auxílio A - Se alimenta sozinho, mas necessita de assistência para cortar os alimentos ou passar manteiga no pão. D - Necessita de auxílio para alimentar-se; usa SNG/SNE; Soroterapia/ Nutrição parenteral. |

I = 1 ponto e D = 0 ponto

TOTAL: _____/6

Avaliação de Parkinsonismo (Adaptado de Tanner et al, 1990)

| | SIM | NÃO |
|---|-----|-----|
| 1. Tinha dificuldade para se levantar de uma cadeira? | | |
| 2. Notou se a letra (escrita) ficou pequena, se reduziu de tamanho? | | |
| 3. Notou ou alguém comentou se a sua voz estava mais baixa ou mais fraca que era antes? | | |
| 4. Tinha alterações do equilíbrio ao caminhar? | | |
| 5. Os pés ficavam presos ou agarrados no chão ao atravessar portas? | | |
| 6. Acha o seu rosto ficou mais “parado”, menos expressivo do que era antes? | | |
| 7. Tinha tremores nos braços ou nas pernas? | | |
| 8. Tinha dificuldades de abotoar as roupas? | | |
| 9. Arrastava os pés ou dava passos curtos ao caminhar? | | |

* Itens em negrito representam os sinais cardinais.

 NA PARK: _____Teve quedas nos últimos 12 meses? N S NSO tremor é unilateral (de um lado só)? N S NSO tremor cessava quando estava parado (repouso) ou quando estava dormindo? N S NSTomava levodopa? N S NS Se sim, houve melhora dos sintomas após o início da medicação?

ESCALA DE ATIVIDADES INSTRUMENTAIS DA VIDA DIÁRIA (IADL)
(Lawton & Brody)

| | | | |
|---|---|--|---|
| A – Habilidade para usa o telefone | | E – Lavanderia | |
| 1. Utiliza o telefone por iniciativa própria | 1 | 1. Lava completamente as roupas | 1 |
| 2. Discos alguns números conhecidos | 1 | 2. Lava pequenas peças: meias, etc | 1 |
| 3. Atende mas não faz ligações | 1 | 3. Toda a roupa deve ser lavada por terceiros | 0 |
| 4. Não usa o telefone de modo algum | 0 | | |
| B – Compras | | F – Transporte | |
| 1. Faz compras independente/e | 1 | 1. Usa independentemente transportes públicos ou dirige seu próprio carro | 1 |
| 2. Faz pequenas compras independente/e | 0 | 2. Chama de táxi, mas não usa transporte público | 1 |
| 3. Precisa ser acompanhado nas compras | 0 | 3. Usa transporte público se acompanhado | 1 |
| 4. Incapaz de fazer compras | 0 | 4. Locomove-se limitadamente de táxi ou carro com auxílio de outros | 0 |
| | | 5. Não sai de casa/ Não usa nenhum transporte | 0 |
| C – Preparo de alimentos | | G – Medicação | |
| 1. Planeja, prepara e serve adequadamente as refeições independentemente | 1 | 1. É responsável por tomar sua medicação em dose e horários corretos | 1 |
| 2. Prepara adequadamente as refeições se alguém lhe fornecer os ingredientes | 0 | 2. Assume responsabilidade por tomar sua medicação se separada anteriormente por outros | 0 |
| 3. Aquece, serve e prepara refeições, mas não garante uma dieta adequada | 0 | 3. Não é capaz de tomar sua medicação | 0 |
| 4. Necessita que alguém prepare e sirva a refeição | 0 | | |
| D – Tarefas domésticas | | H – Finanças | |
| 1. Matem a casa sozinho ou com auxílio ocasional (p.ex: auxílio para tarefas pesadas) | 1 | 1. Controla suas finanças independentemente (conta de banco, talão de cheque, preenche cheques, paga contas) | 1 |
| 2. Realiza tarefas diárias leves, como lavar louça, fazer a cama | 1 | 2. Controla contas no dia a dia, mas necessita de auxílio com banco, compras maiores | 1 |
| 3. Realiza tarefas diárias leves, mas não consegue fazê-las dentro dos padrões de limpeza | 1 | 3. Incapaz de controlar finanças | 0 |
| 4. Necessita de auxílio com todas as tarefas domésticas | 1 | | |
| 5. Não faz/ participa de nenhuma tarefa doméstica | 0 | | |

Lawton, MP; Brody, EM - The instrumental activities of Daily Living Scale. Gerontologist, 1969, 9: 179 - 186

Total: _____ / 8 pontos

Perguntas adicionais:

Ele(a) esquece panela no fogo, torneira aberta ou ferro ligado? _____

Ele(a) pode ser deixado(a) em casa sozinho(a) de forma segura? _____

Inventário Neuropsiquiátrico (NPI-Q)

(Kaufert *et al*, 2000²)

- Responder baseando-se nas mudanças que ocorreram desde que o paciente começou a ter problemas de memória
- Marcar sim apenas quando o sintoma estiver presente no último mês. Do contrário, marcar não.
- Responda honestamente e meticulosamente às questões

| BP5D | | Ausente | Gravidade | | |
|-------------------------------|---|---------|-----------|---|---|
| Delírios | O paciente acredita que alguém está tentando rouba-lo ou prejudica-lo? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Alucinações | O paciente age como se escutasse vozes? Fala com pessoas que não existem? Enxerga coisas ou pessoas que outros não enxergadas por outros? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Agitação/ Agressividade | O paciente é teimoso e rejeita ajuda dos outros? Tem períodos que se recusa a cooperar? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Depressão/ Disforia | O paciente age como se estivesse triste ou de "baixo astral"? Refere sentir-se triste ou deprimido? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Ansiedade | O paciente fica agitado quando se separa de você? Ele apresenta sinais de nervosismo, preocupado, assusta-se por razões não aparentes? Parece muito tenso ou irrequieto? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Elação/ Euforia | O paciente parece animado demais ou excessivamente feliz – sem razão? Acha graça onde outros não acham? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Apatia/ Indiferença | O paciente parece menos interessado em suas atividades habituais ou nas atividades e planos dos outros? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Desinibição | O paciente parece agir impulsivamente? Ex, diz coisas que podem magoar as pessoas sem qualquer constrangimento ou fala abertamente coisas íntimas que em geral não se diz em público? Tira a roupa em frente de outras pessoas/ público – momentos não apropriados? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Irritabilidade/ Labilidade | O paciente é impaciente e mau-humorado? Ele tem dificuldades para lidar com atrasos ou para ficar esperando algo que esteja programado? Seu humor é instável? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Distúrbios Motores | O paciente fica fazendo coisas repetitivas, como lidar andando ao redor da casa, mexendo nos botões da roupa, enrolando um cordão ou fazendo outras coisas repetitivamente? Anda sem motivo aparente? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Comportamentos Noturnos | O paciente acorda você a noite, acorda muito cedo, cochila muito durante o dia? Tem dificuldade para dormir? Ele levanta à noite (não contar vezes que levanta p/ urinar e volta a dormir imediatamente)? Anda ao acaso à noite, veste-se ou perturba seu sono? | 0 | 1 | 2 | 3 |
| Apetite e alimentação | O paciente perdeu ou ganhou peso? Mudou o gosto pelos alimentos? Fazia alguma combinação estranha de alimentos? Comia algum alimento, em particular, excessivamente? O apetite <input type="checkbox"/> aumentou <input type="checkbox"/> diminuiu | 0 | 1 | 2 | 3 |

Total: ____/36 pontos

Gravidade

- 1 – Leve – presente, mas produzindo pouca aflição no paciente
 2 – Moderada – aflitiva e perturbadora
 3 – Marcada – muito perturbadora

Ele(a) se dizia uma pessoa estressada? N S Na sua opinião, ele era estressado? N S

² Kaufert DI, Cummings JL, Ketchel P, Smith V, MacMillan A, Shelley T et al. Validation of the NPI-Q, a Brief Clinical Form of the Neuropsychiatric Inventory. The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences 2000; 12:233–239.

SCID - Episódio Depressivo Maior no Passado

| Critérios para classificar como depressão maior: Cinco (ou mais) dos seguintes critérios presentes durante período maior ou igual a duas semanas, sendo que um dos cinco deve ser ou (1) humor deprimido, ou (2) perda do interesse ou prazer | | Critério |
|--|---|----------|
| HUMOR DEPRIMIDO: 1) Já houve, pelo menos uma vez na vida dele(a), algum momento em que se sentiu deprimido(a), ou na pior na maior parte do dia, quase todos os dias? (Como é que foi isso?) Quando foi isso? | SE SIM: Durou mais que duas semanas? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N | 1 2 3 ? |
| ANEDONIA: Naquele tempo ou em outro momento, ele(a) perdeu o interesse ou o prazer pelas coisas que costumava gostar? (Como é que foi isso?) Isso acontecia quase todos os dias? Quando foi isso? | SE SIM: Durou mais que duas semanas? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N | 1 2 3 ? |
| 3) Naquele período ele(a) perdeu ou ganhou peso? Ele(a) estava tentando perder peso? SE NÃO: Como estava o apetite dele(a)? (Tinha que forçar para comer? Comia menos/mais que o habitual? Isso acontecia quase todos os dias?) | <input type="checkbox"/> Perda de peso ou redução do apetite <input type="checkbox"/> Ganho de peso ou aumento do apetite | 1 2 3 ? |
| 4) Como estava o sono dele(a)? (Dificuldade para dormir, acordando frequentemente, dificuldades em ficar acordado, acordando muito cedo, ou, dormindo demais? Quantas horas por noite comparado com o habitual? Isso acontecia quase todas as noites?) | <input type="checkbox"/> Insônia <input type="checkbox"/> Hipersônia | 1 2 3 ? |
| 5) Ele(a) estava tão inquieto(a) ou agitado(a) que não era capaz de ficar parado(a)? (Isso acontecia todos os dias?) SE NÃO: E o contrário: falando e se movendo mais devagar do que o normal dele(a)? (Isso acontecia todos os dias?) | <input type="checkbox"/> agitação psicomotora <input type="checkbox"/> retardo psicomotor | 1 2 3 ? |
| 6) Como estava a energia dele(a)? (Cansado(a) o tempo inteiro? Quase todos os dias?) | | 1 2 3 ? |
| 7) Como ele se sentia em relação a si mesmo? (Inútil, sem valor?) Quase todos os dias? SE NÃO: Ele se sentia culpado por coisas que fazia ou deixava de fazer? Quase todos os dias? | <input type="checkbox"/> Sentimento de inutilidade <input type="checkbox"/> Culpa inadequada | 1 2 3 ? |
| 8) Ele(a) tinha dificuldade para se concentrar ou pensar? (Com que tipo de coisas isso interferia?) Quase todos os dias? SE NÃO: Era difícil para ele(a) tomar decisões sobre coisas do dia a dia? Quase todos os dias? | <input type="checkbox"/> Capacidade de pensar diminuída <input type="checkbox"/> Indecisão | 1 2 3 ? |
| 9) As coisas estavam tão ruins que ele(a) pensava muito em morte ou que estaria em melhor situação se estivesse morto(a)? E quanto a se ferir? | <input type="checkbox"/> Pensamentos de morte recorrentes <input type="checkbox"/> Ideação suicida <input type="checkbox"/> Tentativa de suicídio | 1 2 3 ? |
| 10) Durante aquele tempo ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa, ou se relacionar com as pessoas? | <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S | 1 2 3 ? |
| 11) Pouco antes de tudo isso começar ele estava bebendo em excesso ou usando drogas? | <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S | 1 2 3 ? |
| 12) Pouco antes disso começar ele estava fisicamente doente? | <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S | 1 2 3 ? |
| 13) Isso começou logo depois de alguém próximo a ele(a) morrer? Durou mais que 2 meses? | <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S | |
| CONSIDERAR: 1 – ausente ou falso 2 – subliminar (duvidoso) 3 – limiar ou verdadeiro ? – informação inadequada | | |
| OBS: Houve algum outro episódio de depressão na vida do paciente? <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S – Quando? | | |

SCID - Episódio Maníaco no Passado

| Critérios para classificar como mania no passado: Humor elevado e mais três dos outros sintomas, ou humor irritável e mais quatro dos outros sintomas | | Critério |
|---|---|----------|
| HUMOR ELEVADO: Já houve algum período de tempo em que ele(a) estava se sentindo tão bem, agitado(a) ou excitado(a) que vocês perceberam que ele(a) não estava no seu normal? Ou ficava tão excitado(a) que se envolvia em problemas? Quando foi isso? | Durou pelo menos 1 semana? Ou ele(a) teve que procurar um hospital? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N | 1 2 3 ? |
| HUMOR IRRITÁVEL: Houve algum período em que ele(a) estava tão irritado(a), que era pego(a) gritando com as pessoas ou começando brigas ou discussões? Quando foi isso? | Durou pelo mais que 1 semana? Ou ele(a) teve que procurar um hospital? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N | 1 2 3 ? |
| 3) Naquele período como ele(a) se sentia em relação a si mesmo? (Mais confiante do que o habitual? Com algum poder ou habilidade especial?) | | 1 2 3 ? |
| 4) Naquele tempo ele(a) tinha que dormir menos que o habitual? (Mesmo assim se sentia descansado?) | | 1 2 3 ? |
| 5) Naquele tempo ele(a) estava muito mais falante que o habitual? (Vocês tinham dificuldade para interromper ou entender o que ele(a) estava falando?) | | 1 2 3 ? |
| 6) Naquele tempo os pensamentos passavam rapidamente pela cabeça dele(a)? | | 1 2 3 ? |
| 7) Naquele tempo ele(a) era tão facilmente distraído(a) por coisas a sua volta que tinha dificuldades para se concentrar ou continuar o que estava fazendo? | | 1 2 3 ? |
| 8) Naquele período, como ele(a) passava o tempo? (Ele(a) se envolvia em tantas atividades a ponto de vocês ficarem preocupados?) SE NÃO: Ele(a) estava fisicamente inquieto(a)? (Qual a intensidade disso?) | | 1 2 3 ? |
| 9) Naquele tempo, ele(a) fez alguma coisa que pudesse trazer problemas para ele(a) mesmo(a) ou para vocês (Comprando coisas que não precisava?) (Tendo comportamento sexual inadequado?) | | 1 2 3 ? |
| 10) Durante aquele tempo ficou difícil para ele(a) trabalhar, cuidar das coisas em casa, ou se relacionar com as pessoas? | <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S | 1 2 3 ? |
| 11) Pouco antes de tudo isso começar ele(a) estava bebendo em excesso ou usando drogas? | <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S | 1 2 3 ? |
| 12) Pouco antes disso começar, ele(a) estava fisicamente doente? | <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> S | 1 2 3 ? |
| CONSIDERAR: 1 – ausente ou falso 2 – subliminar (duvidoso) 3 – limiar ou verdadeiro ? – informação inadequada | | |

internação psiquiátrica? _____

Transtorno Obsessivo-Compulsivo (TOC)

Seu parente alguma vez apresentou:

- Medos, preocupações, ideias ou imagens repetitivos que causavam desconforto a ele(a)? (? 1 2 3)
- Comportamentos repetitivos (manias) que a pessoa tinha que fazer várias vezes e não conseguia evitar, tais como (perguntar **TODOS** os itens de 1 a 9):

- 1) Verificar fechaduras, fogão, se não se feriu ou feriu outros, ou perguntar se foi responsável por algo terrível que tenha acontecido (Agressão e verificação) (? 1 2 3) _____
- 2) Lavar excessivamente mãos e objetos, tomar banhos demorados, parecer preocupado com sujeira ou micróbios, com ficar contaminado e adoecer por isso, ter nojo de secreções do próprio corpo (Contaminação, limpeza e lavagem) (? 1 2 3) _____
- 3) Guardar objetos inúteis, manter o quarto ou casa entulhados (Colecionamento) (? 1 2 3) _____
- 4) Preocupação excessiva com: desrespeito a Deus; certo e errado; moralidade (Religião) (? 1 2 3) _____
- 5) Mania de arrumação, simetria, exatidão, perfeccionismo, ter que deixar as coisas organizadas do seu jeito (? 1 2 3) _____
- 6) Preocupação excessiva com doenças sem ser por contaminação, com partes do corpo, com a aparência física: (? 1 2 3) _____
- 7) Compulsões de repetição, reler ou reescrever várias vezes, repetir atividades rotineiras como entrar e sair de casa, levantar-se da cadeira, vestir roupas) (? 1 2 3) _____
- 8) Compulsões de contagem (contar telhas, tijolos, riscas do chão) (? 1 2 3) _____
- 9) Comportamentos extremamente supersticiosos (medo de passar perto de cemitérios, medo de gato preto, de números ou cores que representem azar). (? 1 2 3) _____

Qualquer um dos itens de 1 a 9 foi positivo? ? 1 3



| |
|---|
| ? ou 1 = pule para Transtornos de tiques; 3 = Continue abaixo |
|---|

Você acha que seu parente gastava muito tempo por dia com esses sintomas? (? 1 2 3) _____

Quanto tempo? _____ (juntando tudo chegava a 1 hora por dia?) (? 1 2 3) _____

Os sintomas interferiam na vida dele? (? 1 2 3) _____

Causavam ansiedade, sofrimento? (? 1 2 3) Com que idade os sintomas começaram? _____

Transtornos de tiques

Tiques, também chamados de sestos ou cacoetes, são movimentos involuntários (que a pessoa faz sem querer), que geralmente começam na infância. Podem ser motores ou vocais. Os principais exemplos são (mostrar exemplos): piscar os olhos, fazer caretas, colocar a língua para fora, sacudir os ombros, sacudir a cabeça, fungar, pigarrear, assoviar, estalar etc.

1) A pessoa tinha tiques motores (? 1 2 3) Idade de início: _____ Tipos de tiques: _____

2) Tinha tiques vocais (? 1 2 3) Idade de início: _____ tipos de tiques: _____

Se Não para as respostas 1 e 2, passe para o próximo questionário. Se Sim para alguma das respostas:

Os tiques duraram mais de um ano? (? 1 2 3) _____

Os tiques duraram entre 3 meses e um ano? (? 1 2 3) _____

A pessoa tem tiques motores e vocais? (? 1 2 3) _____

Outras informações relevantes: _____

**CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA BRASIL
(CCEB)**

Na casa dele(a) tinha?

Posse de itens

| | Quantidade de Itens | | | | |
|--|---------------------|---|---|---|--------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 ou + |
| Televisão em cores | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Rádio | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Banheiro | 0 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Automóvel | 0 | 4 | 7 | 9 | 9 |
| Empregada mensalista | 0 | 3 | 4 | 4 | 4 |
| Máquina de lavar | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Videocassete e/ou DVD | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Geladeira | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex) | 0 | 2 | 2 | 2 | 2 |

TOTAL: _____

B- Qual a instrução do chefe de família dele(a)?

Grau de Instrução do chefe de família

| Nomenclatura Antiga | Nomenclatura Atual | |
|--|---|---|
| Analfabeto/ Primário Incompleto | Analfabeto/ Até 3ª série Fundamental/ Até 3ª série 1º. Grau | 0 |
| Primário completo/ Ginasial Incompleto | Até 4ª série Fundamental / Até 4ª série 1º. Grau | 1 |
| Ginasial completo/ Colegial Incompleto | Fundamental completo/ 1º. Grau completo | 2 |
| Colegial completo/ Superior Incompleto | Médio completo/ 2º. Grau completo | 4 |
| Superior completo | Superior completo | 8 |

TOTAL: _____

CORTES DO CRITÉRIO BRASIL

| Classe | Pontos |
|--------|---------|
| A1 | 42 - 46 |
| A2 | 35 - 41 |
| B1 | 29 - 34 |
| B2 | 23 - 28 |
| C1 | 18 - 22 |
| C2 | 14 - 17 |
| D | 8 - 13 |
| E | 0 - 7 |

Classe: _____

ANEXO VI – Aprovação do CEP da FMUSP do projeto APA

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de um Algoritmo para Segmentação e Classificação de Placa de Aterosclerose em Imagens Histológicas

Pesquisador: RENATO ARAUJO DE ANDRADE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 86044518.0.3002.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DE SAO PAULO
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.807.457

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto bem apresentado, com introdução que justifica sua realização. A seção de materiais e métodos é clara e detalhada e todo o projeto está suportado por farta bibliografia.

Objetivo da Pesquisa:

Esta pesquisa tem como objetivo desenvolver um algoritmo para processamento de placas para análise histológica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo, trazendo o benefício da automação desse processo e redução da taxa de erro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa importante que apoiará diversas atividades de produção e pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentada a declaração de anuência da instituição coparticipante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto sem implicações éticas.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.807.457

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|--------------------------|----------|
| Declaração do Patrocinador | Declaracao_de_Instituicao_Co_Participante.pdf | 21/03/2018 00:15:30 | RENATO ARAUJO DE ANDRADE | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Detalhado.pdf | 21/03/2018 00:13:41 | RENATO ARAUJO DE ANDRADE | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Agosto de 2018

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.248-003
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

ANEXO VII - Aprovação do CEP da IFSP do projeto APA

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de um Algoritmo para Segmentação e Classificação de Placa de Aterosclerose em Imagens Histológicas

Pesquisador: RENATO ARAUJO DE ANDRADE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 86044518.0.3002.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCACAO, CIENCIA E TECNOLOGIA DE SAO PAULO
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.807.457

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto bem apresentado, com introdução que justifica sua realização. A seção de materiais e métodos é clara e detalhada e todo o projeto está suportado por farta bibliografia.

Objetivo da Pesquisa:

Esta pesquisa tem como objetivo desenvolver um algoritmo para processamento de placas para análise histológica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo, trazendo o benefício da automação desse processo e redução da taxa de erro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa importante que apoiará diversas atividades de produção e pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentada a declaração de anuência da instituição coparticipante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto sem implicações éticas.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 2.807.457

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|--------------------------|----------|
| Declaração do Patrocinador | Declaracao_de_Instituicao_Co_Participante.pdf | 21/03/2018 00:15:30 | RENATO ARAUJO DE ANDRADE | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Detalhado.pdf | 21/03/2018 00:13:41 | RENATO ARAUJO DE ANDRADE | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Agosto de 2018

Assinado por:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

ANEXO VIII - Certificado



ANEXO IX - Certificado



REFERÊNCIAS

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019 Mar 5;139(10).
2. (WHO) WHO. Cardiovascular diseases [Internet]. (WHO), World Health Organization. 2022 [cited 2022 Jun 18]. Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1
3. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 18]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
4. (WHO) WHO. GLOBAL HEALTH ESTIMATES 2014 SUMMARY TABLES: DALY BY CAUSE, AGE AND SEX, 2000-2012. 2014.
5. Institute for Health Metrics and Evaluation. Brazil | Institute for Health Metrics and Evaluation [Internet]. 2019. Available from: <http://www.healthdata.org/brazil>
6. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868–74.
7. Tsiantoulas D, Sage AP, Mallat Z, Binder CJ. Targeting B cells in atherosclerosis: closing the gap from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Feb;35(2):296–302.
8. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*. 2016 Feb 19;118(4):535–46.
9. Libby P, Hansson GK. Inflammation and Immunity in Diseases of the Arterial Tree: Players and Layers. *Circ Res*. 2015 Jan;116(2):307–11.
10. Teague H, Mehta NN. The Link Between Inflammatory Disorders and Coronary Heart Disease: a Look at Recent Studies and Novel Drugs in Development. *Curr Atheroscler Rep*. 2016 Jan;18(1):3.
11. Viviane Zorzanelli Rocha; Peter Libby. Biologia Vascular da Aterosclerose e Complicações Agudas do Ateroma. In: Stefanini CVSJATE, editor. Tratado de Cardiologia SOCESP. 2ª Edição. Barueri - SP: Manole; 2009. p. 171–89.
12. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021 Apr 22;592(7855):524–

- 33.
13. Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):653–67.
 14. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2016;133(4):e38-60.
 15. Moore KJ, Tabas I, A-Gonzalez N, Bensinger SJ, Hong C, Beceiro S, et al. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011 Apr;145(3):341–55.
 16. Lacy-Hulbert A, Moore KJ. Designer macrophages: Oxidative metabolism fuels inflammation repair. *Cell Metab.* 2006;4(1):7–8.
 17. Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, et al. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes.* 2010 Jul;59(7):1648–56.
 18. Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, Motoki T, Akaike M, Nishio C, et al. Coronary atherosclerosis is associated with macrophage polarization in epicardial adipose tissue. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(3):248–55.
 19. Frostegård J, Ulfgrén AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999 Jul;145(1):33–43.
 20. Barrett TJ. Macrophages in Atherosclerosis Regression. Vol. 40, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* NLM (Medline); 2020. p. 20–33.
 21. Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis.* 2016 Dec;109(12):708–15.
 22. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev Y V. Immune-inflammatory responses in atherosclerosis: Role of an adaptive immunity mainly driven by T and B cells. *Immunobiology.* 2016 Sep;221(9):1014–33.
 23. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, et al. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J*

- Exp Med. 1998 Jun;187(12):2009–21.
24. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*. 2011 Mar 10;317(5):620–31.
 25. Ammirati E, Moroni F, Magnoni M, Camici PG. The role of T and B cells in human atherosclerosis and atherothrombosis. *Clin Exp Immunol*. 2015 Feb;179(2):173–87.
 26. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005 Apr;6(4):338–44.
 27. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res*. 2009;104(4):541–9.
 28. Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci*. 2012;122(1):1–12.
 29. Campbell KA, Lipinski MJ, Doran AC, Skaflen MD, Fuster V, McNamara CA. Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis. *Circ Res*. 2012 Mar;110(6):889–900.
 30. Omar A, Chatterjee TK, Tang Y, Hui DY, Weintraub NL. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Aug;34(8):1631–6.
 31. Gunawardana SC. Benefits of healthy adipose tissue in the treatment of diabetes. *World J Diabetes*. 2014 Aug;5(4):420–30.
 32. Brestoff JR, Artis D, Allison MB, Myers MG, Amano SU, Cohen JW, et al. Immune Regulation of Metabolic Homeostasis in Health and Disease. *Cell*. 2015 Mar 26;161(1):146–60.
 33. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation*. 2003;108(20):2460–6.
 34. Konishi M, Sugiyama S, Sato Y, Oshima S, Sugamura K, Nozaki T, et al. Pericardial fat inflammation correlates with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2010;213(2):649–55.
 35. Tavora F, Kutys R, Li L, Ripple M, Fowler D, Burke A. Adventitial lymphocytic

- inflammation in human coronary arteries with intimal atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19(3):e61–8.
36. Hirata Y, Kurobe H, Akaike M, Chikugo F, Hori T, Bando Y, et al. Enhanced inflammation in epicardial fat in patients with coronary artery disease. *Int Hear J*. 2011;52(3):139–42.
 37. Verhagen SN, Vink A, van der Graaf Y, Visseren FLJ. Coronary perivascular adipose tissue characteristics are related to atherosclerotic plaque size and composition. A post-mortem study. *Atherosclerosis*. 2012;225(1):99–104.
 38. Kralova Lesna I, Tonar Z, Malek I, Maluskova J, Nedorost L, Pirk J, et al. Is the amount of coronary perivascular fat related to atherosclerosis? *Physiol Res*. 2015;64 Suppl 3:S435-43.
 39. Verhagen SN, Buijsrogge MP, Vink A, van Herwerden LA, van der Graaf Y, Visseren FLJ. Secretion of adipocytokines by perivascular adipose tissue near stenotic and non-stenotic coronary artery segments in patients undergoing CABG. *Atherosclerosis*. 2014 Mar 1;233(1):242–7.
 40. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, et al. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*. 2002;105(6):685–90.
 41. Suleiman M-S, Zacharowski K, Angelini GD. Inflammatory response and cardioprotection during open-heart surgery: the importance of anaesthetics. *Br J Pharmacol*. 2008 Jan;153(1):21–33.
 42. Gurses KM, Ozmen F, Kocyigit D, Yersal N, Bilgic E, Kaya E, et al. Netrin-1 is associated with macrophage infiltration and polarization in human epicardial adipose tissue in coronary artery disease. *J Cardiol*. 2017 Jun 1;69(6):851–8.
 43. Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, da Silva LFF, Campos FM, Bittencourt MS, et al. B Lymphocytes and Macrophages in the Perivascular Adipose Tissue Are Associated With Coronary Atherosclerosis: An Autopsy Study. *J Am Heart Assoc*. 2019 Dec 17;8(24):e013793.
 44. Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, Silva LFF, Campos FM, Silva KCS da, et al. Perivascular Adipose Tissue Inflammation and Coronary Artery Disease: An Autopsy Study Protocol. *JMIR Res Protoc*. 2016;5(4):e211.

45. (WHO) WHO. World Health Statistics 2016: monitoring health for the Sustainable Development Goals (SDGs). 2016.
46. World Health Organization (WHO). Noncommunicable diseases [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 19]. p. 131. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
47. World Health Organization (WHO). World health statistics 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals [Internet]. 2022 [cited 2022 Jun 19]. p. 131. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240051157>
48. WHO. World Health Statistics overview 2019 monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. [Internet]. Geneva; 2019 [cited 2019 Jul 5]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/311696/WHO-DAD-2019.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
49. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Dec 22;76(25):2982–3021.
50. (WHO) WHO. Projections of mortality and causes of death, 2016 to 2060 [Internet]. 2018. Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/
51. World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016 [Internet]. WHO. World Health Organization; 2018 [cited 2019 Jul 6]. Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html
52. GBD 2017 Causes of Death Collaborators GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* (London, England). 2018 Nov 10;392(10159):1736–88.
53. Institute for Health Metrics and Evaluation. Findings from the Global Burden of Disease Study 2017 [Internet]. SEATTLE; 2018 [cited 2019 Jul 7]. Available from: http://www.healthdata.org/sites/default/files/files/policy_report/2019/GBD_2017_Book1_et.pdf
54. Global Burden Disease Group. GBD Compare - Institute for Health Metrics and

- Evaluation [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 21]. Available from: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
55. Global Burden Disease Group. GBD Compare | IHME Viz Hub [Internet]. 2018. 2018 [cited 2019 Jul 7]. Available from: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
56. Brasil. MS/SVS/CGIAE - Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM [Internet]. Ministério da Saúde - DATASUS. 2022 [cited 2022 Jun 20]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
57. Group I for HM and E by GBD. Métricas do Global Burden Disease: Brasil [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 20]. Available from: <https://www.healthdata.org/brazil>
58. Jardim BC, Migowski A, Corrêa F de M, Azevedo e Silva G. Covid-19 no Brasil em 2020: impacto nas mortes por câncer e doenças cardiovasculares. *Rev Saude Publica*. 2022 Apr 22;56:22.
59. Brasil. Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) [Internet]. Ministério da Saúde - DATASUS. 2022 [cited 2022 Jun 21]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>
60. Libby P. Biologia Vascular da Aterosclerose. In: Elsevier E, editor. Braunwald - Tratado de Doenças Cardiovasculares. 9ª Edição. São Paulo; 2013. p. 915–31.
61. Sary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Richardson M, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1992 Jan;85(1):391–405.
62. Sary HC. Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*. 1987 Apr;64(2–3):91–108.
63. Douglas G, Channon KM. The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine (Baltimore)*. 2010 Aug 1;38(8):397–402.
64. Moreno PR, Purushothaman K-R, Sirol M, Levy AP, Fuster V. Neovascularization in Human Atherosclerosis. *Circulation*. 2006 May 9;113(18):2245–52.
65. Williams JK, Heistad DD. Structure and function of vasa vasorum. *Trends Cardiovasc Med* . 1996;6(2):53–7.

66. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn A V., Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J*. 2013 Mar 7;34(10):719–28.
67. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994 May;14(5):2462–78.
68. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 Sep;15(9):1512–31.
69. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 May;20(5):1262–75.
70. Stary H. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2000;20(5):1177–8.
71. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Hear Lung Circ*. 2013 Jun;22(6):399–411.
72. VIRMANI R, BURKE AP, KOLODGIE FD, FARB A. Pathology of the Thin-Cap Fibroatheroma: A Type of Vulnerable Plaque. *J Interv Cardiol*. 2003 Jun 1;16(3):267–72.
73. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002 Mar 1;44(5):349–56.
74. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Gold HK, Yuan J, Narula J, et al. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol*. 2001 Sep;16(5):285–92.
75. Otsuka F, Sakakura K, Yahagi K, Joner M, Virmani R. Has Our Understanding of Calcification in Human Coronary Atherosclerosis Progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Apr;34(4):724–36.
76. Yahagi K, Kolodgie FD, Otsuka F, Finn A V., Davis HR, Joner M, et al. Pathophysiology of native coronary, vein graft, and in-stent atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Feb

- 27;13(2):79–98.
77. Libby P, Lichtman AH, Hansson GK, Afek A, George J, Gilburd B, et al. Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans. *Immunity*. 2013 Jun;38(6):1092–104.
78. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2017 Jun 10;13(6):368–80.
79. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4).
80. MacLeod DC, Strauss BH, de Jong M, Escaned J, Umans VA, van Suylen R-J, et al. Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions. *J Am Coll Cardiol*. 1994 Jan 1;23(1):59–65.
81. Marquezini M V, Dallan LA de O, Toledo OMS. Distribuição comparativa dos glicosaminoglicanos em artérias e veias de diferentes mamíferos. Vol. 14, *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 1999.
82. Choi B-J, Matsuo Y, Aoki T, Kwon T-G, Prasad A, Gulati R, et al. Coronary endothelial dysfunction is associated with inflammation and vasa vasorum proliferation in patients with early atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Nov;34(11):2473–7.
83. Scotland R, Vallance P, Ahluwalia A, Geiringer E, Wolinsky H, Glasgow S, et al. On the regulation of tone in vasa vasorum. *Cardiovasc Res*. 1999 Jan;41(1):237–45.
84. Falk E. Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Apr 18;47(8):C7–12.
85. Kubo T, Imanishi T, Takarada S, Kuroi A, Ueno S, Yamano T, et al. Assessment of Culprit Lesion Morphology in Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Sep 4;50(10):933–9.
86. Abbas A k, Lichtman AH, Pillai S. Capítulo 1 - Propriedades e Visão Geral das Respostas Imunes. In: Elsevier, editor. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª Edição. São Paulo; 2015. p. 1–13.
87. Kortelainen M-L, Porvari K. Adventitial macrophage and lymphocyte accumulation accompanying early stages of human coronary atherogenesis. *Cardiovasc Pathol*. 2014 Jul;23(4):193–7.

88. Higuchi ML, Gutierrez PS, Bezerra HG, Palomino SA, Aiello VD, Silvestre JML, et al. Comparison between Adventitial and Intimal Inflammation of Ruptured and Nonruptured Atherosclerotic Plaques in Human Coronary Arteries. *Arq Bras Cardiol.* 2002 Jul;79(1):20–4.
89. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S24-32.
90. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci.* 2013 May;1285(1):97–114.
91. Mantovani A, Garlanda C, Locati M. Macrophage Diversity and Polarization in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Oct;29(10):1419–23.
92. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2014 Nov;262(1):153–66.
93. Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, Elderfield K, Stark J, Landis RC, et al. Coronary Intraplaque Hemorrhage Evokes a Novel Atheroprotective Macrophage Phenotype. *Am J Pathol.* 2009 Mar 1;174(3):1097–108.
94. Stöger JL, Gijbels MJJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EAL, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012 Dec 1;225(2):461–8.
95. Ketelhuth DFJ, Hansson GK. Adaptive Response of T and B Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):668–78.
96. Mesquita Júnior D, Antônio Pereira Araújo J, Tiekō Takao Catelan T, Wagner Silva de Souza A, de Melo Cruvinel W, Eduardo Coelho Andrade L, et al. ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reum.* 2010;50(5):552–80.
97. Abbas A k, Lichtman AH, Pillai S. Capítulo 2 - Células e Tecidos do Sistema Imune. In: Elsevier, editor. *Imunologia Celular e Molecular.* 8º. São Paulo; 2015. p. 13–34.
98. Chetty R, Gatter K. CD3: Structure, Function, and Role of Immunostaining in Clinical Practice. *J Pathol.* 1994;173(4):303–7.
99. Abbas A k, Lichtman AH, Pillai S. Capítulo 10 - Diferenciação e Funções das Células T CD4+ Efectoras. In: Elsevier, editor. *Imunologia Celular e Molecular.* 8º. São Paulo; 2015.

- p. 213–30.
100. Tsiantoulas D, Sage AP, Mallat Z, Binder CJ. Targeting B Cells in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Feb;35(2):296–302.
 101. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. Vol. 124, *Circulation Research.* 2019.
 102. Meyer TN, Da Silva AL. Resposta celular ao estresse. *Rev Ass Med Bras.* 1999;45(2):181–8.
 103. Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, Binder CJ. B cells and humoral immunity in atherosclerosis. *Circ Res.* 2014 May 23;114(11):1743–56.
 104. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2020 177. 2020 Mar 16;17(7):387–401.
 105. George J, Schwartzberg S, Medvedovsky D, Jonas M, Charach G, Afek A, et al. Regulatory T cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques. *Atherosclerosis.* 2012 Jun 1;222(2):519–23.
 106. Chen X, Oppenheim JJ. Resolving the identity myth: Key markers of functional CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *Int Immunopharmacol.* 2011 Oct;11(10):1489–96.
 107. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jul 18;10(7):490–500.
 108. Bisikirska B, Colgan J, Luban J, Bluestone JA, Herold KC. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J Clin Invest.* 2005 Oct 3;115(10):2904–13.
 109. Vuong JT, Stein-Merlob AF, Nayeri A, Sallam T, Neilan TG, Yang EH. Immune Checkpoint Therapies and Atherosclerosis: Mechanisms and Clinical Implications: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2022 Feb 15;79(6):577–93.
 110. Hassan M, Latif N, Yacoub M. Adipose tissue: friend or foe? *Nat Rev Cardiol.* 2012 Dec 13;9(12):689–702.
 111. World Health Organization (WHO). WHO | Overweight and obesity [Internet]. WHO. World Health Organization; 2018 [cited 2019 Aug 24]. Available from: https://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/

112. Ellulu MS, Khaza'ai H, Rahmat A, Patimah I, Abed Y. Obesity can predict and promote systemic inflammation in healthy adults. *Int J Cardiol.* 2016 Jul;215:318–24.
113. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1983 May;67(5):968–77.
114. Exley MA, Hand L, O'Shea D, Lynch L. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol.* 2014 Oct;223(2):R41–8.
115. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology.* 2012;58(1):15–23.
116. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007;117(1):175–84.
117. Rocha VZ, Folco EJ, Sukhova G, Shimizu K, Gotsman I, Vernon AH, et al. Interferon-gamma, a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: a role for adaptive immunity in obesity. *Circ Res.* 2008 Aug;103(5):467–76.
118. McDonnell ME, Ganley-Leal LM, Mehta A, Bigornia SJ, Mott M, Rehman Q, et al. B lymphocytes in human subcutaneous adipose crown-like structures. *Obes (Silver Spring).* 2012;20(7):1372–8.
119. Porsche CE, Delproposto JB, Geletka L, O'Rourke R, Lumeng CN. Obesity results in adipose tissue T cell exhaustion. *JCI Insight.* 2021 Apr 22;6(8).
120. Sacks HS, Fain JN. Human epicardial adipose tissue: A review. *Am Heart J.* 2007;153(6):907–17.
121. Iacobellis G. Epicardial fat: a new cardiovascular therapeutic target. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;27:13–8.
122. Parisi V, Rengo G, Perrone-Filardi P, Pagano G, Femminella GD, Paolillo S, et al. Increased Epicardial Adipose Tissue Volume Correlates With Cardiac Sympathetic Denervation in Patients With Heart Failure Novelty and Significance. *Circ Res.* 2016 Apr;118(8):1244–53.
123. Iacobellis G, Ribaldo MC, Assael F, Vecchi E, Tiberti C, Zappaterreno A, et al. Echocardiographic Epicardial Adipose Tissue Is Related to Anthropometric and Clinical Parameters of Metabolic Syndrome: A New Indicator of Cardiovascular Risk.

124. Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT, et al. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Aug;34(8):1621–30.
125. Numaguchi R, Furuhashi M, Matsumoto M, Sato H, Yanase Y, Kuroda Y, et al. Differential Phenotypes in Perivascular Adipose Tissue Surrounding the Internal Thoracic Artery and Diseased Coronary Artery. *J Am Heart Assoc.* 2019 Jan 22;8(2):e011147.
126. Chatterjee TK, Stoll LL, , Gereke M. Denning, Allan Harrelson AL, Blomkalns, Gila Idelman, Florence G. Rothenberg, Bonnie Neltner SAR, Eric W. Dickson, Steven Rudich and NLW. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high fat feeding. *Circ Res.* 2009;1–20.
127. Mauro CR, Ilonzo G, Nguyen BT, Yu P, Tao M, Gao I, et al. Attenuated adiposopathy in perivascular adipose tissue compared with subcutaneous human adipose tissue. *Am J Surg.* 2013 Aug;206(2):241–4.
128. Gaborit B, Venteclef N, Ancel P, Pelloux V, Gariboldi V, Leprince P, et al. Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc Res.* 2015 Oct 1;108(1):62–73.
129. Chatterjee TK, Aronow BJ, Tong WS, Manka D, Tang Y, Bogdanov VY, et al. Human coronary artery perivascular adipocytes overexpress genes responsible for regulating vascular morphology, inflammation, and hemostasis. *Physiol Genomics.* 2013 Aug 8;45(16):697.
130. Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, Harrison DG. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovasc Res.* 2017 Jul 1;113(9):1009–23.
131. Grinberg LT, de Lucena Ferretti RE, Farfel JM, Leite R, Pasqualucci CA, Rosemberg S, et al. Brain bank of the Brazilian aging brain study group—a milestone reached and more than 1,600 collected brains. *Cell Tissue Bank.* 2007 Jun;8(2):151–62.
132. Serviço de Verificação de Óbitos da Capital da USP (SVOC-USP) [Internet]. [cited 2022 Jul 13]. Available from: <https://sites.usp.br/svoc/>
133. FAPESP. Auxílio à pesquisa 17/11313-0 - Autopsia, Inflamação - BV FAPESP [Internet]. [cited 2019 Aug 25]. Available from: <https://bv.fapesp.br/pt/auxilios/98569/caracterizacao-do-perfil-da-resposta-inflamatoria->

- no-tecido-adiposo-perivasculare-associada-a-doenca/
134. FAPESP. Bolsa 17/24066-1 - Macrófagos, Linfócitos - BV FAPESP [Internet]. [cited 2019 Aug 25]. Available from: <https://bv.fapesp.br/pt/bolsas/178449/caracterizacao-do-perfil-da-resposta-inflamatoria-no-tecido-adiposo-perivasculare-associada-a-doenca/>
 135. Lucas S. The autopsy pathology of sepsis-related death. *Curr Diagnostic Pathol*. 2007 Oct 1;13(5):375–88.
 136. Tsokos M. Postmortem diagnosis of sepsis. *Forensic Sci Int*. 2007 Jan 17;165(2–3):155–64.
 137. Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, de Andrade RA, da Silva LFF, Yahagi-Estevam M, Lage SHG, et al. Macrophage Polarization in the Perivascular Fat Was Associated With Coronary Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2022 Mar 15;11(6):23274.
 138. Andrade RA, Farias-Itao DS, Nishizawa A, Campos FM, Pasqualucci CA, Suemoto CK, et al. Processamento de Imagens para Análise da Composição de Placa de Aterosclerose: Estudo Preliminar em Material de Autópsia [Internet]. 2017. Available from: <https://eventos.ufabc.edu.br/siimsp/files/id59.pdf>
 139. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jul;9(7):671–5.
 140. Suemoto CK, Nitrini R, Grinberg LT, Ferretti RE, Farfel JM, Leite RE, et al. Atherosclerosis and dementia: a cross-sectional study with pathological analysis of the carotid arteries. *Stroke*. 2011;42(12):3614–5.
 141. Hirata Y, Tabata M, Kurobe H, Motoki T, Akaike M, Nishio C, et al. Coronary Atherosclerosis Is Associated With Macrophage Polarization in Epicardial Adipose Tissue. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jul;58(3):248–55.
 142. UCLA: Institute for Digital Research & Education. Regression with Stata Chapter 4 – Beyond OLS [Internet]. [cited 2019 Oct 24]. Available from: <https://stats.idre.ucla.edu/stata/webbooks/reg/chapter4/regressionwith-statachapter-4-beyond-ols-2/>
 143. UCLA: Statistical Consulting Group. How can I use countfit in choosing a count model? [Internet]. [cited 2021 Feb 1]. Available from: <https://stats.idre.ucla.edu/stata/faq/how-can-i-use-countfit-in-choosing-a-count-model/>

144. Rehg JE, Bush D, Ward JM. The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. *Toxicol Pathol.* 2012;40(2):345–74.
145. Shimabukuro M, Hirata Y, Tabata M, Dagvasumberel M, Sato H, Kurobe H, et al. Epicardial Adipose Tissue Volume and Adipocytokine Imbalance Are Strongly Linked to Human Coronary Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 May 1;33(5):1077–84.
146. Pierzynová A, Šrámek J, Cinkajzlová A, Kratochvílová H, Lindner J, Haluzík M, et al. The number and phenotype of myocardial and adipose tissue CD68+ cells is associated with cardiovascular and metabolic disease in heart surgery patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2019 Sep 1;29(9):946–55.
147. Fitzgibbons TP, Lee N, Tran K-V, Nicoloso S, Kelly M, Tam SKC, et al. Coronary disease is not associated with robust alterations in inflammatory gene expression in human epicardial fat. *JCI Insight.* 2019 Oct 17;4(20).
148. Antonopoulos AS, Sanna F, Sabharwal N, Thomas S, Oikonomou EK, Herdman L, et al. Detecting human coronary inflammation by imaging perivascular fat. *Sci Transl Med.* 2017 Jul 12;9(398).
149. Shioi A, Ikari Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *J Atheroscler Thromb.* 2018 Apr 1;25(4):294–303.
150. Oikonomou EK, Marwan M, Desai MY, Mancio J, Alashi A, Hutt Centeno E, et al. Non-invasive detection of coronary inflammation using computed tomography and prediction of residual cardiovascular risk (the CRISP CT study): a post-hoc analysis of prospective outcome data. *Lancet.* 2018 Sep 15;392(10151):929–39.
151. Goeller M, Achenbach S, Cadet S, Kwan AC, Commandeur F, Slomka PJ, et al. Pericoronary Adipose Tissue Computed Tomography Attenuation and High-Risk Plaque Characteristics in Acute Coronary Syndrome Compared With Stable Coronary Artery Disease. *JAMA Cardiol.* 2018 Sep 1;3(9):858–63.
152. Dietel B, Cicha I, Voskens CJ, Verhoeven E, Achenbach S, Garlich CD. Decreased numbers of regulatory T cells are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability and inversely correlate with infiltrated mature dendritic cells. *Atherosclerosis.* 2013 Sep 1;230(1):92–9.

153. Cheng X, Yu X, Ding Y jun, Fu Q qing, Xie J jiao, Tang T ting, et al. The Th17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol.* 2008;127(1):89–97.
154. Fernandez DM, Rahman AH, Fernandez NF, Chudnovskiy A, Amir E ad D, Amadori L, et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. *Nat Med* 2019 2510. 2019 Oct 7;25(10):1576–88.
155. Sharma M, Schlegel MP, Afonso MS, Brown EJ, Rahman K, Weinstock A, et al. Regulatory T cells license macrophage pro-resolving functions during atherosclerosis regression. *Circ Res.* 2020 Jul 17;127(3):335–53.
156. de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, van der Wal AC. Low Numbers of FOXP3 Positive Regulatory T Cells Are Present in all Developmental Stages of Human Atherosclerotic Lesions. *PLoS One.* 2007 Aug 22;2(8).
157. Butcher MJ, Filipowicz AR, Waseem TC, McGary CM, Crow KJ, Magilnick N, et al. Atherosclerosis-Driven Treg Plasticity Results in Formation of a Dysfunctional Subset of Plastic IFN γ + Th1/Tregs. *Circ Res.* 2016 Nov 11;119(11):1190–203.
158. Kimura T, Kobiyama K, Winkels H, Tse K, Miller J, Vassallo M, et al. Regulatory CD4+ T cells recognize major histocompatibility complex class II molecule-restricted peptide epitopes of apolipoprotein B. *Circulation.* 2018 Sep 11;138(11):1130–43.
159. Wolf D, Gerhardt T, Winkels H, Michel NA, Pramod AB, Ghosheh Y, et al. Pathogenic Autoimmunity in Atherosclerosis Evolves from Initially Protective Apolipoprotein B100-Reactive CD4+T-Regulatory Cells. *Circulation.* 2020 Sep 29;1279–93.
160. Amersfoort J, Schaftenaar FH, Douna H, Van Santbrink PJ, Van Puijvelde GHM, Slütter B, et al. Diet-induced dyslipidemia induces metabolic and migratory adaptations in regulatory T cells. *Cardiovasc Res.* 2021 Apr 23;117(5):1309–24.
161. Onodera T, Fukuhara A, Jang MH, Shin J, Aoi K, Kikuta J, et al. Adipose tissue macrophages induce PPAR γ -high FOXP3+ regulatory T cells. *Sci Reports* 2015 51. 2015 Nov 19;5(1):1–12.
162. Oikonomou EK, Marwan M, Desai MY, Mancio J, Alashi A, Hutt Centeno E, et al. Non-invasive detection of coronary inflammation using computed tomography and prediction of residual cardiovascular risk (the CRISP CT study): a post-hoc analysis of prospective outcome data. *Lancet.* 2018 Sep 15;392(10151):929–39.

163. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, et al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2017 Dec 5;816:3–13.
164. Stuart T, Satija R. Integrative single-cell analysis. *Nat Rev Genet* 2019 205. 2019 Jan 29;20(5):257–72.
165. Boyce RW, Dorph-Petersen KA, Lyck L, Gundersen HJG. Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicol Pathol.* 2010 Dec 28;38(7):1011–25.
166. Ferretti Re, Damin A, Bruck S, Morillo L, Perroco T, Campora F, et al. Post-Mortem diagnosis of dementia by informant interview. *Dement Neuropsychol.* 2010;4(2):138–44.
167. Suemoto CK, Ferretti-Rebustini RE de L, Rodriguez RD, Leite REP, Soterio L, Brucki SMD, et al. Neuropathological diagnoses and clinical correlates in older adults in Brazil: A cross-sectional study. Brayne C, editor. *PLOS Med.* 2017 Mar 28;14(3):e1002267.
168. Farfel JM, Nitrini R, Suemoto CK, Grinberg LT, Ferretti REL, Leite REP, et al. Very low levels of education and cognitive reserve: A clinicopathologic study. *Neurology.* 2013 Aug 13;81(7):650–7.
169. Farias DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, Silva LF, Campos FM, Silva KC, et al. Abstract 14851: Inflammation in the Perivascular Adipose Tissue is Associated With Coronary Artery Disease: An Autopsy Study. *Circulation.* 2015;132(Suppl 3).
170. Nishizawa A, Suemoto CK, Farias DS, Campos FM, Silva KCS da, Cuelho A, et al. Association between adiposity and systemic atherosclerosis: a protocol of a cross-sectional autopsy study. *Open Hear.* 2016 Aug;3(2):e000433.
171. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)-A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009 Apr 1;42(2):377–81.
172. Farias-Itao, Daniela S Pasqualucci CA, Andrade RA, Silva, Luiz Fernando F Campo AB, Suemoto CKS. Abstract 12903: Polarized Macrophages in the Perivascular Adipose Tissue Were Correlated With Atherosclerotic Plaque Components in Coronary Arteries: An Autopsy Study | *Circulation.* 2019. p. 140:A12903.
173. Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, Andrade RA, Silva LFF, Estevam MY, Campo AB, et al. Abstract 9162: Increased Ratio of B2/B1-like Lymphocytes in the Perivascular Adipose

- Tissue Could Contribute to Plaque Destabilization in Human Coronary Arteries: Preliminary Results | *Circulation*. *Circulation*. 2021;144.
174. Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, Andrade RA, Silva LFF, Estevam MY, Campo AB, et al. TH1 lymphocytes in the perivascular adipose tissue correlate with plaque composition and increase the risk of intraplaque haemorrhages in coronary arteries: an autopsy study. *Eur Heart J*. 2021 Oct 12;42(Supplement_1).
 175. Berry K, Farias-Itao DS, Grinberg LT, Plowey ED, Schneider JA, Rodriguez RD, et al. B and T Lymphocyte Densities Remain Stable With Age in Human Cortex. *ASN Neuro*. 2021 May 30;13:1–11.
 176. Ciciliati AMM, Adriaola IO, Souza Farias-Itao D, Pasqualucci CA, Leite REP, Nitrini R, et al. Severe Dementia Predicts Weight Loss by the Time of Death. *Front Neurol*. 2021 May 14;12:610302.
 177. Nishizawa A, Suemoto CK, Farias-Itao DS, Campos FM, Silva KCS, Bittencourt MS, et al. Morphometric measurements of systemic atherosclerosis and visceral fat: Evidence from an autopsy study. *PLoS One*. 2017 Oct 1;12(10):e0186630.
 178. Nishizawa A, Cuelho A, De Farias-Itao DS, Campos FM, Leite REP, Ferretti-Rebustini REL, et al. Direct measurements of abdominal visceral fat and cognitive impairment in late life: Findings from an autopsy study. *Front Aging Neurosci*. 2019;11(MAY):109.
 179. Dos Santos Matioli MNP, Suemoto CK, Rodriguez RD, Farias DS, Da Silva MM, Leite REP, et al. Diabetes is Not Associated with Alzheimer's Disease Neuropathology. *J Alzheimer's Dis*. 2017 Jan 1;60(3):1035–43.
 180. Matioli MNP dos S, Suemoto CK, Rodriguez RD, Farias DS, da Silva MM, Leite REP, et al. Association between diabetes and causes of dementia: Evidence from a clinicopathological study. *Dement Neuropsychol*. 2017 Oct 1;11(4):406.