

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

**MARCADORES CIRCULANTES DA ATIVIDADE
IMUNOINFLAMATÓRIA NA REESTENOSE
CORONÁRIA PÓS ANGIOPLASTIA**

Dissertação de Mestrado

Orientador : Jorge Pinto Ribeiro

Co-orientadora : Nadine Clausell

Autor : Alexandre Schaan de Quadros

Porto Alegre, agosto de 1997

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes e indivíduos que constituíram a amostra estudada, por, voluntária e generosamente, terem propiciado a realização deste estudo.

Ao Dr. Jorge Pinto Ribeiro, pelo exemplo de médico, cardiologista, hemodinamicista e pesquisador. Sua orientação ao longo deste trabalho e durante os últimos anos de minha vida acadêmica e médica, através da oportunidade de um convívio praticamente diário, foi extremamente gratificante e inestimável para minha formação.

À Dra. Nadine Clausell, também pelo exemplo de pesquisadora, por seu espírito científico e entusiasmo acadêmico. Sua orientação foi decisiva para a realização deste trabalho.

À Dra. Karen Prado, especialmente, e à Dra. Janete Brauner pela colaboração e orientação em diversas fases do trabalho.

Ao Dr. Jarbas Oliveira pela orientação científica e auxílio interessado nas análises pelo método de ELISA.

Às acadêmicas Cristiane Leitão, Karen Ordovàs e Letícia Weiss que contribuíram importantemente em todas as fases da execução do estudo.

Ao Dr. Alcides Zago, como chefe do Serviço de Cardiologia do HCPA, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Setor de Hemodinâmica deste hospital.

Além disso, pela colaboração na coleta de dados e pelo exemplo como cardiologista e hemodinamicista.

Ao Dr. José Casco, às enfermeiras Ilza, Márcia, Marta e Lenira e a todo o pessoal da enfermagem do Serviço de Hemodinâmica do HCPA pela ajuda na coleta de dados

À estaticista Luciana B. Nucci e ao Dr. Murilo Foppa pela orientação na análise estatística.

Aos Drs. Waldomiro Manfrói, João Carlos Prolla, Tânia Furlanetto e Luiz Rohde, pelo exemplo como professores ao longo de minha formação acadêmica.

Ao meu irmão Felipe pela ajuda na elaboração da dissertação.

Ao meu pai, pelo exemplo de honestidade e de caráter.

À minha mãe, pela influência decisiva na minha educação e formação pessoal.

Ao Dr. Cláudio Abuchaim pelo apoio, compreensão e amizade, não só ao longo da execução desta pesquisa mas também durante os últimos anos de minha vida.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i-ii
ÍNDICE.....	iii-v
RESUMO.....	vi-vii
ABSTRACT.....	viii-ix
ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1. Reestenose coronária.....	4
2.1.1. Definição.....	4
2.1.2. Mecanismos da angioplastia, trombose e respostas reparadoras iniciais da parede vascular.....	4
2.1.3. Células musculares lisas.....	5
2.1.4. Matriz extracelular.....	6
2.1.5. Neointima.....	7
2.1.6. Remodelamento vascular.....	8
2.1.7. Neointima e remodelamento.....	9
2.2. Citocinas.....	9
2.3. Citocinas específicas.....	10
2.3.1. TNF α	11
2.3.2. IL-2.....	13
2.3.3. IL-1 β	14
2.4. Importância das citocinas na fisiopatologia da reestenose coronária pós- angioplastia.....	15

3. HIPÓTESE.....	19
4. OBJETIVOS.....	19
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1. Delineamento.....	20
5.2. Amostra.....	20
5.3. Métodos.....	22
5.3.1. Características clínicas e angiográficas.....	22
5.3.2. Dosagens laboratoriais.....	23
5.3.3. Dosagens dos marcadores imunoinflamatórios.....	23
5.4. Considerações éticas.....	25
5.5. Análise estatística.....	26
6. RESULTADOS.....	28
6.1. Características clínicas.....	28
6.2. Características angiográficas.....	30
6.3. Análises laboratoriais.....	32
6.4. Níveis plasmáticos dos marcadores.....	32
6.5. Associações entre variáveis.....	38
7. DISCUSSÃO.....	39
7.1. Ativação linfocitária na reestenose coronária.....	39
7.2. TNF α na reestenose coronária.....	41
7.3. Atividade imunoinflamatória na aterosclerose primária.....	42
7.3. Atividade imunoinflamatória na angina instável.....	43
7.4. Significado biológico das alterações dos marcadores imunoinflamatórios.....	46
7.5. Limitações.....	49
8. CONCLUSÕES.....	52

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
10. ANEXOS.....	75

RESUMO

Base teórica - A fisiopatologia da reestenose coronária pós angioplastia está relacionada ao aumento da produção de matriz extracelular, proliferação celular e alterações morfológicas da parede do vaso, proporcionadas principalmente por células musculares lisas e macrófagos. Embora as citocinas sejam proteínas fundamentais na regulação destas funções e estejam presentes nas placas reestenóticas, sua exata importância ao longo deste processo permanece indefinida, principalmente pela falta de um método capaz de sua avaliação seqüencial. Neste estudo, testamos a hipótese de que pacientes com reestenose coronária pós-angioplastia apresentam aumento da atividade imunoinflamatória plasmática através da mensuração de marcadores circulantes pelo método de ELISA.

Objetivo - Comparar a expressão de interleucina 1-beta (IL-1 β), receptor solúvel da interleucina-2 (rs-IL 2), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e receptores solúveis I e II do fator de necrose tumoral alfa (rs I-TNF α e rs II-TNF α) no sangue periférico de pacientes com lesões reestenóticas, lesões ateroscleróticas primárias e indivíduos normais.

Métodos - Foram estudados 11 pacientes com reestenose coronária pós-angioplastia e 10 pacientes com aterosclerose primária encaminhados para cineangiocoronariografia. Dez indivíduos normais sem cardiopatia isquêmica ou fatores de risco foram utilizados como grupo controle. As amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da cineangiocoronariografia, processadas e as concentrações plasmáticas do rs-IL 2, TNF α , rs-I TNF α , rs-II TNF α e IL-1 β analisadas pelo método de ELISA. Os níveis de cada grupo foram comparados por análise de variância (ANOVA), sendo utilizado o método de Scheffé para análise das diferenças entre os subgrupos.

Resultados - Não houve diferença quanto à idade, sexo, presença de fatores de risco para cardiopatia isquêmica e aspectos de tratamento entre os dois grupos de pacientes. Os pacientes com reestenose coronária apresentaram cardiopatia isquêmica mais grave, já que

tinham maior número de vasos comprometidos e também apresentaram o último episódio de angina há menos tempo do que os pacientes com aterosclerose primária. Os níveis plasmáticos do rs-IL 2 foram significativamente mais elevados nos pacientes com reestenose coronária (1640 ± 576 pg/ml) do que nos indivíduos normais (796 ± 470 pg/ml), mas inferiores aqueles dos pacientes com aterosclerose primária (2283 ± 542 pg/ml) ($p < 0.05$). Os níveis dos receptores do TNF α e do TNF α dos pacientes com reestenose coronária (rs-I TNF α = 1021 ± 108 pg/ml; rs-II TNF α = 2267 ± 447 pg/ml; TNF α =0 pg/ml [0-2.8 pg/ml]) não foram diferentes dos indivíduos normais (rs-I TNF α = 888 ± 162 pg/ml; rs-II TNF α = 2123 ± 345 ; TNF α =0 pg/ml [0-0.3 pg/ml]) mas foram significativamente menores do que aqueles dos pacientes com aterosclerose primária (rs-I TNF α = 1223 ± 194 pg/ml; rs-II TNF α = 2958 ± 716 pg/ml; TNF α = 0.65 pg/ml [0-3.0 pg/ml]) ($p < 0.05$ para todas as diferenças). Os níveis de IL-1 β foram indetectáveis em todos os indivíduos. Não houve correlação entre a gravidade da cardiopatia isquêmica, a proximidade da angina ou a idade e os níveis de cada marcador.

Conclusões - Os pacientes com reestenose coronária pós-angioplastia apresentam aumento do rs-IL 2, mas não do TNF α ou de seus receptores solúveis quando comparados com indivíduos normais. Os pacientes com aterosclerose primária apresentam aumento de todos estes marcadores quando comparados tanto com indivíduos normais quanto com os pacientes com reestenose coronária. Estes resultados indicam ativação linfocitária moderada nos pacientes com reestenose coronária pós-angioplastia e atividade imunoinflamatória mais intensa nos pacientes com aterosclerose primária.

ABSTRACT

Background - Overproduction of extracellular matrix, cellular proliferative events and morphologic remodelling of vessel wall, derived mainly from inappropriate activity of smooth muscle cells and macrophages, are key features in the pathophysiology of restenosis post coronary angioplasty. Several cytokines are known to be involved in the regulation of those cell functions but their exact role in the overall process remains to be defined, due to the lack of a method capable of sequential assessment over time. In this study, we sought to investigate the levels of circulating markers of immunoinflammatory activity in patients with restenosis, to test the hypothesis that they are elevated when compared with patients with primary atherosclerosis and healthy volunteers.

Objective - To compare the expression of interleukin 2 soluble receptor (sr-IL2), tumour necrosis factor (TNF α), soluble receptor I and II of tumour necrosis factor (sr-I TNF α and sr-II TNF α) and interleukin 1 beta (IL-1 β) in periferic blood of patients with restenosis, primary atherosclerosis and healthy volunteers.

Methods - Eleven patients with coronary restenosis post angioplasty and 10 patients with primary atherosclerosis referred for coronary arteriography were studied. Ten normal volunteers without coronary artery disease or risk factors for its presence served as controls. Blood samples were drawn and processed immediately before coronary arteriography and plasmatic concentrations of sr-IL2, TNF α , sr-I TNF α , sr-II TNF α and IL-1 β were analised by an ELISA method. Results were compared by ANOVA.

Results - There were no significant differences in age, sex, risk factors for coronary artery disease and treatment in both groups of patients. The group of patients with coronary restenosis had more vessels involved in angiography and shorter time between the last episode of angina and blood sampling. Plasmatic levels of sr-IL2 were significantly greater in restenosis patients (1640 ± 576 pg/ml) than normal individuals (796 ± 470 pg/ml), but

smaller than patients with atherosclerosis (2283 ± 542 pg/ml) ($p < 0.05$). There were no differences between TNF α and its soluble receptors levels in coronary restenosis patients (sr-I TNF α = 1021 ± 108 pg/ml; sr-II TNF α = 2267 ± 447 pg/ml; TNF α = 0 pg/ml [0-2.8 pg/ml]) and normal individuals (sr-I TNF α = 888 ± 162 pg/ml; sr-II TNF α = 2123 ± 345 ; 0 pg/ml [0-0.3 pg/ml]) but primary atherosclerosis patients displayed levels significantly greater than both groups (sr-I TNF α = 1223 ± 194 pg/ml; sr-II TNF α = 2958 ± 716 pg/ml; TNF α = 0.65 pg/ml [0-3.0 pg/ml]). IL-1 β levels were undetectable in all subjects. There was no correlation between the severity of coronary artery disease and time to last episode of angina with the levels of each cytokine.

Conclusions - Coronary restenosis patients present greater levels of sr-IL2 but not of TNF α or its soluble receptors when compared with normal individuals. Primary atherosclerosis patients present greater levels of all this markers when compared with either restenosis patients or normal individuals. These results point to moderate lymphocitary activity in coronary restenosis patients and more significant immunoinflammatory activity in patients with primary atherosclerosis.

ABREVIATURAS

TNFα -	Fator de necrose tumoral alfa
ELISA-	Ensaio imunabsorvente ligado à enzima
IL-1β -	Interleucina-1 beta
rs-IL 2-	Receptor solúvel da interleucina 2
rs-I TNFα	Receptor solúvel I do fator de necrose tumoral alfa
rs-II TNFα	Receptor solúvel II do fator de necrose tumoral alfa
TGF-β-	Fator transformador de crescimento beta
TIMP -	Inibidores teciduais das metaloproteinases
kd -	kilodaltons
VCAM-1-	Molécula de adesão da célula vascular tipo 1
ICAM-1-	Molécula de adesão intercelular tipo 1
IL-2 -	Interleucina 2
HLA-DR -	Antígeno leucocitário humano, "locus" DR
LDL -	Lipoproteína de baixa densidade
IAM -	Infarto agudo do miocárdio
HDL -	Lipoproteína de alta densidade
CPK -	Creatina fosfoquinase
MB -	Fração predominante no miocárdio da enzima creatina fosfoquinase
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetraacético
pg/ml -	Picogramas por mililitro

1.INTRODUÇÃO

A reestenose é a principal limitação da angioplastia coronária, ocorrendo em até 50 % dos casos e provocando morbidade e custo importantes (1). A maioria das estratégias utilizadas até o momento para sua prevenção ou tratamento não foram completamente eficazes. Mesmo que algumas intervenções, como o uso de endopróteses coronárias ("stents") (2-4), anticorpo c7e3 (5), angioeptina (6), trapidil (7), tranilast (8) e probucol (9) tenham sido capazes de diminuir sua incidência, esta permanece alta. A falta de uma solução para este problema reflete importantes limitações da pesquisa e o desconhecimento de vários aspectos da resposta vascular após o trauma do procedimento (10-12).

Um dos maiores avanços dos últimos anos na área da biologia vascular foi o reconhecimento da existência de um processo imunoinflamatório localizado na parede do vaso e da importância das citocinas e fatores de crescimento na sua regulação (13,14). Baseado neste conceito, Libby e colaboradores (15) propuseram um novo modelo para o entendimento da reestenose coronária, chamado de *modelo em cascata da reestenose*. Assim, a trombose local aguda, a coagulação sanguínea e/ou a lesão mecânica provocadas pela angioplastia inicialmente ativariam a expressão gênica de citocinas pelos macrófagos e células musculares lisas residentes na placa. Esta resposta inicial provocaria uma segunda onda de produção de citocinas e fatores de crescimento por estas células e também por leucócitos recrutados, e assim por diante, estabelecendo uma resposta autoestimulativa prolongada.

Diversos achados sustentam esta hipótese. Macrófagos, células musculares lisas, células endoteliais e linfócitos T são capazes de produzir citocinas e fatores de crescimento (15). Após a angioplastia, os principais estímulos responsáveis pela produção

destas substâncias seriam a trombina, produtos da coagulação, lesão vascular e as próprias citocinas já produzidas (16). Além disto, vários grupos demonstraram que índices inflamatórios avaliados antes da angioplastia são fatores preditivos de reestenose, sugerindo que pacientes com lesões com maior componente inflamatório seriam mais suscetíveis a desenvolver o problema (17-21). Clausell e colaboradores (22) também relataram aumento do fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) em placas reestenóticas quando comparadas a lesões primárias e Rozek e colaboradores (23) identificaram aumento da proteína quimioatratante para monócitos em lesões reestenóticas, demonstrando que as citocinas estão envolvidas na fisiopatologia da fase aguda e da evolução da reestenose.

No entanto, a melhor caracterização dos fenômenos imunoinflamatórios que ocorrem no processo da reestenose coronária é ainda um importante objetivo a ser perseguido para seu melhor entendimento. A análise de espécimes de aterectomia coronária proporcionou uma oportunidade única para o estudo "in vivo" das características histopatológicas e dos componentes imunoinflamatórios da placa reestenótica. No entanto, esta é uma técnica de revascularização percutânea em desuso atualmente, depois de ensaios clínicos randomizados terem demonstrado que não proporciona melhores resultados clínicos que a angioplastia coronária convencional (24,25). O uso de modelos animais para o estudo da reestenose também apresenta importantes limitações. Diferenças significativas na composição e extensão da proliferação neointimal e do remodelamento vascular, da natureza e extensão da lesão arterial provocada, do metabolismo lipídico e de drogas e da atividade dos sistemas de coagulação e fibrinolíticos entre os animais estudados e os seres humanos seriam as principais causas (11). Além disso, várias drogas que se mostraram eficazes em diminuir a reestenose em modelos experimentais não proporcionaram a mesma resposta em ensaios clínicos randomizados realizados em seres humanos (26,27). A avaliação da atividade

imunoinflamatória através da dosagem de citocinas produzidas por células estimuladas após cultura em meio apropriado tem suscitado interesse e já foi utilizada em vários estudos (17,28,29). No entanto, é uma técnica dispendiosa, de difícil execução e aplicabilidade em nosso meio, além de não refletir o "milieu" em que se encontram as células dentro das lesões reestenóticas, sujeitas ao efeito de diversas citocinas regulatórias e fatores de crescimento.

Recentemente, analisamos o perfil imunoinflamatório de pacientes com aterosclerose coronária comprovada por angiografia e diferentes síndromes clínicas através da dosagem de citocinas e de seus receptores solúveis no sangue periférico e do seio coronário pelo método de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) (30). Esta metodologia também foi utilizada por vários outros grupos no estudo de pacientes com aterosclerose coronária e parece ser capaz de identificar alterações de marcadores circulantes que representem a atividade imunoinflamatória intraplaca (31-36). Se aplicada ao estudo da reestenose, poderia constituir-se em um método barato, fácil, sem risco maior para os pacientes e capaz de ser repetido diversas vezes ao longo do tempo. Desta forma, conduzimos um estudo transversal para testar a hipótese de que pacientes com reestenose coronária pós angioplastia apresentam atividade imunoinflamatória plasmática significativamente aumentada quando comparados com indivíduos normais e pacientes com aterosclerose primária, conforme avaliada por marcadores circulantes medidos pelo método de ELISA. Os objetivos do estudo foram quantificar a expressão de interleucina 1-beta (IL-1 β), do receptor solúvel da interleucina-2 (rs-IL 2) e do TNF α e de seus receptores solúveis I e II (rs-I TNF α e rs-II TNF α) no sangue periférico de pacientes com lesões reestenóticas, lesões ateroscleróticas primárias e indivíduos normais.

2.REVISÃO DA LITERATURA

2.1.Reestenose coronária-

2.1.1. Definição -

A reestenose coronária tem tradicionalmente sido um diagnóstico angiográfico, e a definição mais usada é uma estenose maior do que 50 % na angiografia de controle (37-39). Embora seja geralmente secundária a respostas celulares adversas com formação excessiva de camada neointima e/ou remodelamento vascular desfavorável, alterações agudas ou subagudas inerentes ao procedimento também podem contribuir decisivamente para a recidiva da lesão. As mais importantes são retração elástica (39), persistência de lesão residual (40), vasoespasmos (41) e trombose (42).

2.1.2. Mecanismos da angioplastia, trombose e respostas reparadoras iniciais da parede vascular -

A insuflação do cateter balão provoca denudação endotelial, redistribuição e compressão da placa, lacerações, dissecação da camada média e estiramento da parede arterial (37). Como consequência destas alterações, plaquetas aderem-se à superfície subendotelial exposta, formando-se um trombo fino e transitório, geralmente não oclusivo e que permanece vários dias até que ocorra a reendotelização (43,44). É importante salientar que algumas placas podem já apresentar trombos incorporados ou sobrepostos antes da angioplastia. Em decorrência do estímulo mecânico, da trombina, de fatores de coagulação, das citocinas e de fatores de crescimento, observa-se ativação de diversas células vasculares e leucócitos (41), com produção de mais mediadores por todas estas células e expressão de moléculas de adesão na sua superfície (15,28). Leucócitos

circulantes (monócitos, linfócitos T, neutrófilos) interagem com a parede vascular através de receptores de membrana, podendo aderir-se à superfície subendotelial e migrar para o interior da parede do vaso (39,45). Os radicais livres também parecem estar envolvidos, sendo gerados principalmente por leucócitos polimorfonucleares e podendo contribuir para a proliferação muscular lisa e resposta inflamatória através da liberação de citocinas (46).

2.1.3. Células musculares lisas -

Após as respostas vasculares iniciais provocadas pela dilatação do balão, as células musculares lisas desempenham um papel fundamental na evolução fisiopatológica. Uma parcela significativa do conhecimento sobre a evolução temporal dos fenômenos celulares após a angioplastia deriva de estudos em modelos experimentais com ratos, embora recentemente modelos que mais se aproximam da patobiologia vascular humana (41,44,47) e estudos patológicos longitudinais com espécimes de aterectomia (48) tenham sido disponíveis. A principal função destas células em estado basal é a contração celular, com pouca ou nenhuma atividade secretória, migratória ou proliferativa (fenótipo contrátil). Após a angioplastia, os diversos estímulos já citados (trombina, citocinas, fatores de crescimento, estímulo mecânico) provocam sua ativação, com aumento de volume e da capacidade de secreção, proliferação e migração (fenótipo sintético)(49). Como estes estímulos não são exclusivos do processo da reestenose coronária, algumas lesões ateroscleróticas primárias apresentam células musculares lisas já ativadas pela doença básica (50).

Classicamente, o comportamento das células musculares lisas logo após a angioplastia foi dividido em 3 fases (41,51). A primeira é caracterizada pela proliferação de células da camada média, durando até dez dias e mediada pelo fator de crescimento de fibroblastos (41,49). A segunda fase constitui-se na migração das células musculares lisas

da camada média para a íntima através da lâmina elástica interna. Os principais mediadores da capacidade migratória das células musculares lisas são o fator de crescimento derivado de plaquetas (homodímero BB) (41,42,52), a produção de metaloproteinases que induzem e regulam a digestão da matriz extracelular para a movimentação da célula através dela (41) e a expressão de receptores de adesão na superfície celular (integrinas) para interação com seus correspondentes (ligandinas) nas proteínas da matriz extracelular (53). Alguns componentes da matriz (fibronectina, vitronectina) estimulam a migração celular enquanto outros a inibem (laminina, colágeno, heparina) (52). A terceira fase seria a proliferação das células musculares lisas que agora encontram-se na camada íntima e a secreção de matriz extracelular (41).

2.1.4. Matriz extracelular -

A intensidade da produção e a constituição da matriz extracelular que é produzida pelas células musculares lisas são determinantes fundamentais no volume final de neointima a ser formada (54). As proteoglicanas são o principal componente nos primeiros seis meses, sendo que a produção de colágeno intensifica-se a partir deste momento para tornar-se o principal componente da matriz após (48). A elastina, o versican e o hialuronato também são importantes, sendo que estes últimos podem absorver água e provocar edema da neointima. Este aumento do volume é observado nos primeiros dois meses, sendo que após este período inicia-se o processo de cicatrização, que completa-se em aproximadamente seis meses (48).

Além de produzir as substâncias que formam a matriz, as células musculares lisas têm também a capacidade de produzir metaloproteinases (colagenase intersticial, estromalisina e gelatinases), que são enzimas capazes de digerir a matriz formada. Por outro lado, na própria matriz estão também presentes substâncias que inibem a atividade destas metaloproteinases - os chamados inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMP)

(55). Assim, a quantidade final de matriz depende de um delicado balanço entre estes dois fatores. As próprias células musculares lisas ativadas que encontram-se na neoíntima têm a tendência a produzirem mais matriz e menos metaloproteinases (55). O TGF- β (fator transformador de crescimento beta) também é importante na regulação da produção da matriz (56,57). Além disso, a produção está também regulada através de interações entre as células musculares lisas e as proteínas da matriz, pelas integrinas de membrana e ligandinas já citadas. Um outro aspecto importante, é que a matriz formada parece interferir em mudanças na transcrição gênica necessárias para alterações na regulação de proliferação, apoptose e diferenciação das células musculares lisas (10).

2.1.5. Neoíntima -

A neoíntima é então composta principalmente por células musculares lisas e a matriz extracelular por elas produzida, embora observe-se também a presença de macrófagos e linfócitos T, quando avaliada em espécimes de aterectomia (48). A importância da contribuição da proliferação das células musculares lisas e da produção de matriz extracelular por estas para a formação da neoíntima têm sido tema de intensa controvérsia (58-60), mas a tendência atual parece ser de considerar que a produção de matriz desempenhe um papel mais importante do que o número de células musculares lisas presentes (12,42). Recentemente, a importância da apoptose para a regulação da proliferação celular também foi ressaltada (61).

O volume final da neoíntima parece estar relacionado à profundidade e extensão do dano vascular, extensão do denudamento endotelial provocado e características prévias da placa (50,62,63). Sua formação inicia-se logo após a angioplastia, mas o pico de sua produção ocorre entre o primeiro e o terceiro mês. Entre o terceiro e o sexto mês torna-se quiescente e estabiliza ou regride 6 meses após a intervenção (40,64). O término da produção de neoíntima está associado com o retorno das células musculares lisas ao

fenótipo contrátil, mas as razões para isto não estão claras. As hipóteses apresentadas seriam uma inibição das células musculares lisas pelo endotélio regenerado ou pela matriz por elas produzida (42,65). Outros autores sugerem que o remodelamento favorável poderia proporcionar uma diminuição da tensão da parede e estabilização das forças hemodinâmicas, e, na ausência de estímulo mecânico, as células musculares lisas deixariam de produzir a matriz extracelular (66). Além do retorno das células musculares lisas ao fenótipo contrátil, seis meses após a angioplastia pode-se observar que a matriz torna-se mais densa e com mais colágeno, sendo que após dois anos não é mais possível a identificação histológica do local onde foi feita a dilatação (42).

2.1.6. Remodelamento vascular -

Além da formação da camada neointima, a parede vascular danificada pelo balão sofre uma outra alteração denominada de remodelamento vascular (12). Este conceito foi introduzido por Glagov e colaboradores (67), que demonstraram que artérias com aterosclerose leve a moderada desenvolviam um aumento do diâmetro do vaso para compensar o estreitamento luminal provocado pela placa. Estudos em seres humanos (68-71) e em modelos experimentais (44,47,72) têm demonstrado sua importância no processo da reestenose coronária. Estes e outros autores têm sugerido que a reestenose coronária decorra da falha deste remodelamento compensatório normal, com a artéria mantendo seu diâmetro ou mesmo diminuindo-o após a angioplastia. A observação de que a intensidade da reação neointimal correlaciona-se com o grau de injúria vascular provocado (42,62), mas não com a reestenose coronária (47,72,73) sustenta esta hipótese. Tanto a camada média quanto a adventícia estão envolvidas no fenômeno do remodelamento, mas esta última parece ser particularmente importante na formação de fibrose de retração crônica ou no alargamento da área total do vaso (68,71). A ação das forças hemodinâmicas e mecânicas derivadas de alterações do fluxo local e do estresse sobre a parede vascular

parecem ser importantes neste processo (12,66). Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos poderiam estar relacionados a defeitos na produção e degradação de matriz extracelular por células musculares lisas e macrófagos (12).

2.1.7. Neointima e remodelamento -

A importância relativa de cada uma destas duas alterações ainda é objeto de disputa (41,47,71,74,75), mas provavelmente varie conforme as características clínicas, da lesão e do procedimento de cada paciente (44). Em relação ao curso temporal, as alterações decorrentes do remodelamento vascular parecem ter uma evolução diferente da reação neointimal, mas este aspecto é menos estudado (69,70). Cinco meses após a angioplastia, 20 a 25 % dos pacientes podem apresentar aumento tardio da área seccional transversa, com dilatação do vaso neste período (68).

2.2 Citocinas -

Citocinas são polipéptídeos ou glicoproteínas de baixo peso molecular secretadas por linfócitos, monócitos/macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas e outras, envolvidas na regulação da imunidade, inflamação e reparo tecidual (76). Têm geralmente efeito autócrino e/ou parácrino, embora também possa ocorrer efeito endócrino. Kelso é de opinião que a maioria das citocinas, particularmente as linfocinas, agem primariamente como mediadores locais na junção entre a célula produtora e a célula que apresenta o estímulo antigênico (77). Diversos mecanismos como a ocorrência de sinergias, cascatas e regulação de receptores agem para amplificar as respostas biológicas às citocinas. Por outro lado, a ocorrência de controles de retroalimentação negativa e antagonismos são importantes para regulação de seus efeitos (76). Em situação basal, a

produção de citocinas é pequena, já que não são armazenadas dentro das células sob forma de precursores, necessitam de novos genes para transcrição e translação e seus RNAs mensageiros são lábeis (76). Outros efeitos comuns às citocinas são a produção em resposta à estimulação antigênica, a capacidade de produzir o mesmo efeito em diferentes células efectoras (pleiotropismo) e o fato de que diversas citocinas possuem o mesmo efeito em uma célula efectora (redundância) (77).

Para exercer suas propriedades biológicas, as citocinas devem estimular receptores específicos. Com exceção da IL-1 β , do TNF α e do interferon, cada citocina liga-se somente a um receptor e não compete para ligação com outros; as afinidades de ligação são geralmente altas e existem poucos receptores por célula (100 a 1000), que não necessitam ser ocupados em sua totalidade para que ocorra o efeito biológico (77). A ação das citocinas geralmente se faz através de segundos mensageiros intracelulares (76). Neste aspecto, também é importante considerar o papel dos receptores na regulação da atividade biológica, já que podem ser observadas diferenças no processamento do sinal entre receptores para uma mesma citocina localizados em células diferentes (77).

2.3.Citocinas específicas -

Até o momento, foram identificadas mais de doze interleucinas, que juntamente com os fatores de necrose tumoral alfa e beta, fatores de estimulação de crescimento de colônia de macrófagos, interferon alfa e gama e outros formam uma lista de mais de duas dezenas de citocinas. Nesta revisão, analisaremos aspectos estruturais, mecanismo de ação, efeitos e formação do TNF α , interleucina 2 (IL-2) e IL-1 β . A decisão em estudar especificamente estas citocinas deveu-se às diversas evidências já obtidas em relação à sua importância nos fenômenos envolvidos na reestenose coronária (17,22,78).

2.3.1. *TNF α* -

O *TNF α* é um trímero cônico de 17 kilodaltons (kd) com três subunidades idênticas e estreitamente associadas (79). O *TNF*-beta apresenta homologia de 30 % em nível de aminoácidos e pode ligar-se ao mesmo receptor celular do *TNF α* . Esta citocina é produzida principalmente por macrófagos ativados, mas também por células musculares lisas, fibroblastos, células T e outras (14). Os efeitos gerais do *TNF α* são indução de febre e formação de proteínas de fase aguda, atividade antitumorigênica, estimulação de hematopoiese e aumento da reabsorção óssea (79). Está associado à caquexia e desempenha um papel importante na fisiopatologia de diversas doenças, como choque séptico, doenças inflamatórias e neoplasias (80-85).

Suas ações celulares caracterizam-se por pleiotropismo importante e estreita interação com *IL-1 β* . Ativa múltiplas vias de transdução de sinais, induzindo ou suprimindo a expressão de um grande número de genes, incluindo fatores de crescimento, citocinas, fatores transcripcionais e mediadores inflamatórios (79). Especificamente, promove crescimento, ativação citotóxica e estimulação da síntese de citocinas e imunoglobulinas de células T, células B, monócitos e fibroblastos (77). Estimula citotoxicidade e fagocitose de neutrófilos, com produção de superóxido e outros radicais livres por estas células (79) e também estimula a produção da forma induzível do óxido nítrico no coração (86).

Apresenta vários efeitos nas células musculares lisas e endoteliais, células T e macrófagos, com potenciais repercussões para a patogênese do ateroma e da lesão reestenótica (87). O achado de que artérias normais não apresentam *TNF α* reforça sua importância no processo da aterosclerose (88). Assim, esta citocina é capaz de ativar a expressão gênica das interleucinas 1, 2, 6 e 8, do *TNF α* e do interferon-gama, além de induzir a expressão da molécula de adesão da célula vascular tipo I (VCAM-1), da molécula de adesão intercelular tipo I (ICAM-1) e da E-seletina na superfície celular

(53,89) e induzir apoptose de diversas células presentes no ateroma (61,90). Nas células musculares lisas, estimula a secreção de colagenase intersticial e estromalisina (91) e modula a produção de fibronectina juntamente com a IL-1 β (92). Nas células endoteliais, aumenta a adesividade plaquetária, a coagulação sanguínea (76,79) e induz apoptose (90). Em fibroblastos, modula a produção de metaloproteinases e dos TIMP (93). Em um modelo de transplante cardíaco heterotópico em coelhos, o bloqueio da atividade biológica do TNF α foi capaz de bloquear a resposta neointimal da parede do vaso, demonstrando a importância desta citocina neste contexto (94).

Os receptores específicos do TNF α representam um aspecto importante da sua atividade biológica. Constituem-se em proteínas transmembrana divididas em um domínio extra e outro intracelular, sendo que o último varia mais e pode conter uma seqüência formada por 60 aminoácidos conhecida como "domínio da morte", responsável pela transdução intracelular do sinal da apoptose (95). São identificados dois receptores, tipo I (55 kd) e tipo II (75 kd). Embora exista considerável sobreposição entre as mensagens intracelulares transmitidas, acredita-se que o tipo I está mais envolvido na transdução do sinal da apoptose e o tipo II na estimulação de linfócitos T (95). Os dois receptores funcionam da seguinte maneira: a ligação com o TNF α torna o domínio intracelular capaz de catalisar a formação de proteínas citoplasmáticas, provocando mudanças conformacionais nestas moléculas que levam a reações adicionais na cascata de sinais (95). Ambos receptores ligam-se ao TNF α com alta afinidade e não há evidência de necessidade de interação entre eles para transdução do sinal.

Uma outra característica importante dos receptores é que, após serem estimulados, ocorre um descolamento do domínio extracelular, que transforma-se em uma forma solúvel no plasma, que pode ou não estar ligada à citocina. A exata função e a importância biológica destas formas solúveis não estão esclarecidas. Sabe-se, porém, que seus níveis circulantes correlacionam-se com a atividade do TNF α , que podem bloquear seu efeito

quando administradas em grandes quantidades (94,96) e podem ligar-se ao TNF α circulante formando um reservatório da substância para posterior liberação (97). Acredita-se que os níveis circulantes dos receptores solúveis representam um marcador confiável da atividade biológica da citocina, já que encontram-se aumentados em várias condições onde o TNF reconhecidamente desempenha um papel importante (98-100).

2.3.2. *IL -2 -*

A IL-2 é uma glicoproteína de 15 kd, originada no cromossomo 4 (77,101). É produzida exclusivamente por células T, sendo que o tempo de duração de sua síntese pelos linfócitos ativados é curto e estreitamente regulado pela concentração do antígeno (77). Para a ativação do linfócito, é necessário que este antígeno específico seja apresentado por macrófagos em associação com uma molécula de histocompatibilidade de classe II (102). A IL-2 liberada pelo linfócito ativado irá ativar seus receptores específicos na superfície de outros linfócitos, comportando-se como um fator de crescimento para estas células e induzindo também a formação de outras linfocinas e ativação de linfócitos citotóxicos. Além disso, age nas células T e B, "natural killers" e monócitos, promovendo crescimento, ativação citotóxica, síntese de linfocinas e imunoglobulinas (76,77,102). Seus efeitos gerais são indução de febre e atividade antitumorigênica, estando elevada no choque séptico, neoplasias, rejeição após transplante e doenças imunológicas (103).

Os receptores para IL-2 são indispensáveis para que ocorra o efeito biológico, já que, na sua ausência, a citocina não é capaz de estimular as células alvo. No entanto, os linfócitos T expressam receptores de membrana somente após sua ativação por macrófagos (102) sendo esta expressão regulada por mitógenos, pela citocina propriamente dita (77) ou por outras citocinas, como o TNF α (87). Estes receptores são compostos por 3 subunidades: uma proteína de 55-kd que tem pouca afinidade pela IL-2 e não é capaz de produzir resposta biológica, uma proteína de 70 kd que liga-se a uma parte

diferente da IL-2 com afinidade diferente e pode transmitir sinal intracelular e um receptor de alta afinidade constituído por estas duas moléculas (104). Após a estimulação, uma fração do receptor descola-se da membrana celular e permanece solúvel no plasma, constituindo o rs-IL 2. A quantificação do rs-IL 2 no sangue fornece uma medida laboratorial da ativação do sistema imune "in vivo", pois correlaciona-se confiavelmente com doenças inflamatórias autoimunes, rejeição pós transplante e doenças infecciosas específicas, sendo que níveis muito elevados são uma característica particularmente importante de algumas neoplasias hematológicas (103). Segundo Rubin e Nelson (103), este marcador oferece a oportunidade de avaliação não-invasiva, confiável e rápida da atividade da doença, resposta à terapia e prognóstico em um amplo espectro de condições associadas com ativação linfocitária.

2.3.3. IL-1 β -

A IL-1 β é uma molécula tetrahédrica com uma massa molecular de 17 kd, não possui cadeia de carboidrato associada e origina-se no cromossomo 2 (77). Apresenta 30 % de homogeneidade com a IL-1 alfa e reatividade biológica cruzada. É produzida inicialmente como um precursor maior sem atividade biológica (101), principalmente por macrófagos, mas também por células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos (14,105).

Os efeitos gerais da IL-1 β são indução de febre, formação de proteínas de fase aguda, reabsorção óssea, atividade antitumorígenica, estimulação da hematopoiese e caquexia (102). Suas ações celulares são bastante semelhantes as do TNF α , sendo que as duas citocinas são capazes de estimular sua própria produção e a da outra. Em relação a estas, estimula a síntese de prostaglandinas por diversas células da parede vascular (106), a secreção de collagenase intersticial e estromalisina pelas células musculares lisas (91) e a secreção de fator de crescimento de fibroblastos e fator de crescimento derivado de plaquetas com conseqüente proliferação daquelas (13,15). Promove crescimento de

fibroblastos e células endoteliais (106), induz a expressão de moléculas de adesão (E-seletina, VCAM-1, ICAM-1) (53, 107) e promove ativação do endotélio (14, 76). Regula vários aspectos da função dos linfócitos T, assim como sua ativação funcional (101) e está envolvida na ativação de células musculares lisas através da ICAM-1 (108). Sua presença na aterosclerose em humanos já foi demonstrada em diversos estudos (105, 109, 110).

Apresenta dois receptores de membrana, que não são tão bem estudados quanto aqueles da rs-IL 2 e do TNF α , de maneira que formas solúveis não são passíveis de mensuração na circulação. Possui também um antagonista endógeno (IL-RA), cuja função e importância biológica também ainda não estão suficientemente esclarecidas (110).

2.4. Importância das citocinas na fisiopatologia da reestenose coronária pós angioplastia -

Existem diversas evidências indiretas e diretas de que as citocinas e a atividade imunoinflamatória por elas mediada desempenham um papel importante na fisiopatologia da reestenose coronária pós-angioplastia. As evidências indiretas são mais numerosas e derivadas de estudos em aterosclerose e do fato de que diversas células envolvidas na reestenose são capazes de produzir citocinas e de que estas citocinas seriam capazes de mediar funções celulares envolvidas na reestenose, embora isto não tenha sido comprovado especificamente neste contexto. Evidências diretas seriam as demonstrações de que estas substâncias estão presentes nas lesões reestenóticas, de que mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela reestenose são devidos à ação das citocinas e de que o bloqueio de sua atividade é capaz de inibir o processo da reestenose.

Em relação às evidências indiretas, é importante considerar que já está consistentemente demonstrado que os fenômenos imunoinflamatórios são responsáveis pela instabilização e talvez pela regulação da formação de lesões ateroscleróticas (110-112). A questão a ser analisada é se seria possível extrapolar os achados de estudos em aterosclerose primária para o âmbito do processo da reestenose coronária. Isto nos remete a um problema de definição, pois Libby e colaboradores (15) têm sugerido que a reestenose coronária seria uma forma de aterosclerose acelerada, enquanto que Falk e Nobuyoshi (42) acreditam que os dois processos apresentem diferenças importantes e sejam duas condições distintas. O seguinte comentário de Davies e Woolf (113) resume nosso ponto de vista sobre esta questão: "*Proliferação de células musculares lisas da íntima não é aterosclerose. Proliferação muscular lisa é uma resposta geral à lesão pela parede arterial e ocorre na aterosclerose. No entanto, não é única ou específica para aterosclerose. Muitos modelos animais de doença arterial têm sido criados nos quais a lesão vascular é induzida por balão intraluminal ou compressão externa. Uma proliferação muscular lisa intimal ocorre e simula um dos componentes da placa aterosclerótica humana. Estenose pós angioplastia em humanos é um exemplo de tal resposta à lesão por um vaso aterosclerótico, mas a lesão criada é diferente de uma placa humana.*" Enquanto que estes autores analisam com precisão a questão da hiperplasia intimal, o aspecto do remodelamento vascular, uma característica mais recentemente evidenciada da reestenose e presente também na aterosclerose, não é contemplado. De qualquer forma, por maior semelhança que exista entre as duas condições, as diferenças são indubitavelmente significativas e implicam em cautela na extrapolação de dados entre uma e outra doença. Outra das evidências indiretas da importância das citocinas na fisiopatologia da reestenose é o fato de que todas as células envolvidas na patobiologia da parede vascular são capazes de produzir citocinas. Assim, os macrófagos são as maiores fontes de TNF α e IL-1 β (77), as células musculares lisas e

endoteliais também podem produzir estas duas citocinas e terem suas funções reguladas por elas (106) e os linfócitos T são a maior fonte e células alvo da interleucina 2 (103). Em relação a mecanismos envolvidos na fisiopatologia da reestenose que podem ser mediados ou regulados pela ação das citocinas, embora isto não tenha sido comprovado especificamente neste contexto, podemos citar os seguintes. O TNF α é capaz de aumentar a degradação da matriz extracelular tanto por aumentar a produção de metaloproteinases quanto por diminuir a atividade dos TIMP (93), podendo estar implicado na fisiopatologia do remodelamento vascular. A regulação da digestão e produção da matriz também é importante para a migração de células musculares lisas, juntamente com a expressão de integrinas de superfície, que são mediadas por IL-1 β (108). Lesões reestenóticas apresentam frequentemente evidências de apoptose, que poderia servir como um mecanismo regulatório para proliferação celular (61). Na aterosclerose primária este fenômeno é modulado pela IL-1 β (114) e talvez pelo TNF α , já que esta citocina apresenta estreita interação com a IL-1 β e é um dos principais mediadores de apoptose (90,95). Em um modelo experimental de formação de neointima semelhante à reestenose, Molossi e colaboradores e Clausell e colaboradores demonstraram que o TNF α e a IL-1 β aumentam o infiltrado inflamatório, a secreção de proteínas da matriz extracelular, a expressão de moléculas de adesão vasculares e a formação de neointima (92,115,116).

Além do exposto, diversos outros achados são evidências científicas diretas de que a atividade imunoinflamatória é um mecanismo fisiopatológico importante na reestenose coronária pós angioplastia. Em primeiro lugar, Clausell e colaboradores (22) e Rozek e colaboradores (23) verificaram que o TNF α e a proteína quimioattractante de monócitos estão presentes em concentrações elevadas nas lesões reestenóticas de seres humanos, através de estudos com espécimes de aterectomia. Em segundo lugar, vários estudos demonstraram que atividade imunoinflamatória importante ocorre imediatamente após a angioplastia. Assim, foi demonstrada ativação de neutrófilos e de plaquetas através da

expressão de receptores de superfície nestas células e identificada a superfície vascular lesada como fonte desta ativação, bem como observado aumento dos níveis plasmáticos de moléculas de adesão e enzimas proteolíticas imediatamente após a angioplastia coronária em seres humanos (117-120). Em terceiro lugar, sabe-se que índices imunoinflamatórios são preditivos de reestenose, implicando estes fenômenos como importantes pelo menos nas fases iniciais do processo. Assim, o conteúdo de macrófagos e/ou de células espumosas presentes na lesão a ser dilatada (20,21), as concentrações séricas de proteína C reativa e interleucina 6 (18,19) e a secreção estimulada de IL-1 β em monócitos "in vitro" foram associadas com maior incidência de reestenose coronária (17). Por último, a inibição de um dos mecanismos fisiopatológicos importantes para a reestenose coronária através do bloqueio da ação das citocinas ou a reprodução destes através de sua administração também constitui-se em uma evidência direta de seu papel nesta condição. Assim, Clausell e colaboradores demonstraram que a administração de doses farmacológicas de receptores solúveis de TNF α em um modelo experimental de transplante cardíaco heterotópico em coelhos diminuiu a formação de neointima (94) e Shimokawa e associados (121) demonstraram que a administração de IL-1 β a artérias coronárias porcinas foi capaz de produzir hiperplasia intimal e respostas vasoespásticas.

Em resumo, diversas evidências científicas consistentes indicam que as citocinas e os fenômenos imunoinflamatórios por elas mediados desempenham um papel significativo na fisiopatologia da reestenose coronária pós angioplastia.

3. HIPÓTESE

Os pacientes portadores de reestenose coronária pós angioplastia apresentam ativação imunoinflamatória no sangue periférico mais importante do que pacientes com aterosclerose primária e indivíduos normais, possivelmente devido à maior expressão de citocinas da lesão.

4. OBJETIVOS

Quantificar por método imunoabsorvente a expressão de IL-1 β , rs-IL 2, TNF α , rs I-TNF α e rs II-TNF α no sangue periférico de pacientes com lesões reestenóticas, lesões ateroscleróticas primárias e indivíduos normais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Delineamento -

O estudo foi realizado com delineamento transversal controlado e prospectivo. Foram estudados pacientes portadores de reestenose coronária pós angioplastia, pacientes com aterosclerose primária sem realização de angioplastia coronária prévia e um grupo controle composto de indivíduos normais.

5.2. Amostra -

A amostra foi selecionada a partir de pacientes encaminhados por seu médico assistente para realização de cineangiocoronariografia ou procedimento hemodinâmico intervencionista (angioplastia coronária, colocação de " stent " intracoronário ou outras técnicas) no Laboratório de Hemodinâmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os pacientes foram incluídos de maneira consecutiva, desde que preenchidos os critérios de inclusão e exclusão e de acordo com a disponibilidade do autor. O período da inclusão dos pacientes no estudo foi de Julho de 1996 a Janeiro de 1997.

Os critérios de inclusão para o grupo de pacientes com reestenose coronária foram os seguintes: reestenose coronária pós angioplastia realizada nos últimos 12 meses, estenose coronária com pelo menos 50 % de obstrução da luz do vaso no local da angioplastia realizada previamente (38), assinatura do termo de consentimento pós informação (Anexos 1 e 2) e angina instável IB, IIB ou IIIB segundo a classificação de Braunwald (122). Em relação a este último critério, no início do estudo foram incluídos

somente pacientes com angina instável e dor em repouso. Como verificou-se pouca disponibilidade de pacientes com reestenose coronária e esta apresentação clínica em nosso serviço, foram também admitidos três pacientes com angina estável e um paciente com angina instável sem dor em repouso neste grupo.

Os critérios de inclusão para o grupo de pacientes com aterosclerose primária foram os seguintes: aterosclerose coronária significativa (presença de pelo menos uma lesão com estenose de no mínimo 70 % em uma artéria coronária), angina instável com dor em repouso (classificação IB, IIB ou IIIB de Braunwald (122)) e assinatura do termo de consentimento pós informação (Anexos 1 e 2).

Indivíduos normais foram utilizados como grupo controle. Os critérios de inclusão foram os seguintes: indivíduo hígido, ausência de evidência clínica de cardiopatia isquêmica, ausência de fatores de risco para cardiopatia isquêmica (fumo, diabete mérito, hipertensão arterial sistêmica, história familiar, dislipidemia), idade menor de 35 anos, assinatura do termo de consentimento pós-informação (Anexo 3).

Os critérios de exclusão para os grupos de pacientes com reestenose coronária e aterosclerose primária e o grupo de indivíduos normais foram os seguintes: doença inflamatória aguda ou crônica, febre, insuficiência cardíaca, disfunção sistólica ventricular esquerda grave (fração de ejeção menor que 30 %), diabete mérito descompensada (hemoglicoteste maior do que 200 antes do procedimento ou evidência por controle laboratorial se disponível) ou insulino-dependente, uso atual de drogas antiinflamatórias sistêmicas ou imunossupressoras, IAM ou cirurgia cardíaca nos últimos três meses, infecção ativa ou crônica sistêmica ou neoplasia maligna. Não foi considerado critério de exclusão o uso de ácido acetilsalicílico em doses menores do que 1000 mg/dia, já que estas doses não apresentam efeito antiinflamatório sistêmico importante e a quase totalidade dos pacientes com angina instável ou reestenose coronária pós-angioplastia encontra-se em uso desta medicação.

5.3. Métodos -

5.3.1. Características clínicas e angiográficas -

Após o paciente ter sido selecionado para o estudo e o termo de consentimento devidamente informado e assinado, os registros médicos foram revisados e uma anamnese sucinta realizada, de forma a preencher os requisitos do protocolo (Anexo 4). Os filmes das cineangiocoronariografias e angioplastias coronárias foram revisados pelo autor, sendo que todos os procedimentos tiveram indicação clínica pelo médico assistente de cada paciente. A lesão culpada foi considerada aquela responsável pelos sintomas, conforme os resultados dos exames não invasivos (eletrocardiograma de repouso e/ou esforço, cintilografia miocárdica perfusional) e as características angiográficas da lesão (123). A gravidade das estenoses coronárias foram avaliadas visualmente em pelo menos três projeções. As características anatômicas e funcionais do ventrículo esquerdo foram avaliadas e descritas. A morfologia das lesões coronárias no grupo de pacientes com aterosclerose foi avaliada conforme os critérios sugeridos por Ambrose e colaboradores (123).

As angioplastias coronárias realizadas nos pacientes com reestenose coronária seguiram a técnica introduzida por Gruentzig (37). Em todos os casos a via de acesso utilizada foi a artéria femoral, sendo empregada a técnica de Judkins para cineangiocoronariografia (124). O equipamento radiológico utilizado para imagem fluoroscópica foi Siemens Angioskop D40, com monitores de vídeo para acompanhamento do procedimento, que foi registrado em filmes de 35 mm. Brevemente, um cateter-guia foi posicionado no óstio da artéria coronária a ser dilatada e um fio-guia foi utilizado para ultrapassar a estenose. Por sobre este fio-guia foi introduzido o cateter-balão de angioplastia, posicionado na lesão e realizadas insuflações com pressão e tempo a critério dos operadores.

5.3.2. Dosagens laboratoriais -

Para as dosagens laboratoriais, 20 ml de sangue periférico foram coletados imediatamente antes do cateterismo cardíaco através de bainha arterial posicionada na artéria femoral dos pacientes com reestenose coronária ou aterosclerose primária. As amostras de sangue foram fracionadas em frascos sem anticoagulante, centrifugadas e o soro obtido armazenado à -20 graus centígrados menos de 30 minutos após a coleta. Nos indivíduos normais, 20 ml de sangue foram coletados por punção de veia periférica e processados da mesma maneira. Todas as dosagens laboratoriais foram realizadas com conjuntos comerciais Merck Mega. Os níveis de colesterol total e colesterol HDL foram avaliados pelo método CHOD-PAP, os triglicerídeos pelo método GPO-PAP, a glicemia de jejum por determinação fotométrica e a creatinina pelo método de Jaffe. Nos pacientes com reestenose coronária e aterosclerose primária, as dosagens séricas de creatinofosfoquinase (CPK) foram realizadas pelo método UV otimizado (IFCC) e as dosagens de sua fração MB pelo método UV para determinação com anticorpos monoclonais.

5.3.3. Dosagens dos marcadores imunoinflamatórios -

As metodologias empregadas para a coleta e o processamento do sangue foram semelhantes às descritas acima, exceto que os marcadores foram analisados a partir de plasma obtido pela adição de anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) antes da centrifugação do sangue. A dosagem plasmática dos marcadores foi realizada por ELISA quantitativo em conjuntos comercializados para uso em pesquisa (Quantikine - R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA). A execução dos ensaios ELISA foi realizada pelo autor no Laboratório de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob a supervisão do Dr. Jarbas Oliveira, bioquímico deste setor. A metodologia utilizada para realização dos ensaios de cada marcador (TNF- α , rs I-TNF α , rs II-TNF α , rs-IL 2,

IL-1 β) foi a recomendada pelos manuais com as técnicas específicas do fabricante (R&D Systems, números de catálogo DRT200, DTA50, DR2A00, DLB50, DRT100).

As linhas gerais de execução de ensaios pelo método ELISA são descritas a seguir. Este método consiste em uma reação imunoenzimática na qual um anticorpo monoclonal reage com seu equivalente contido na amostra a ser analisada (125). Forma-se um complexo antígeno/anticorpo, e é então adicionado um conjugado de anticorpo policlonal com uma enzima (geralmente peroxidase) que amplifica o sinal da reação, formando um sanduíche. Após, adiciona-se um substrato que, ao ser catalisado pela enzima ligada ao complexo anticorpo monoclonal/antígeno/anticorpo policlonal, produz uma substância capaz de conferir cor ao complexo. A densidade óptica da substância de interesse é então obtida pela leitura das placas em um espectrofotômetro. A concentração da substância em cada amostra é obtida pela interpolação dos resultados de densidade óptica da amostra em uma equação polinomial de terceiro grau gerada a partir de uma curva padrão realizada com diferentes concentrações conhecidas da substância de interesse.

Em nossos ensaios, cada citocina foi medida com um conjunto específico, que continha uma placa de poliestireno com 96 valetas impregnadas com a concentração conhecida do anticorpo monoclonal para a substância a ser medida e todos os reagentes necessários para a execução do ensaio. Uma solução com a concentração conhecida da substância a ser medida (fornecida pelo fabricante) foi utilizada para realização de uma curva padrão, sendo que oito diluições foram realizadas e colocadas em duplicata em oito valetas. As amostras de plasma dos pacientes foram então colocadas, também em duplicata, nas valetas restantes e incubadas em temperatura ambiente para permitir adequada ligação entre o anticorpo monoclonal e o antígeno a ser testado. Cada valeta foi aspirada e lavada e o conjugado de anticorpo policlonal ligado à enzima foi então adicionado a todas elas. Após um novo período de incubação, cada valeta foi aspirada e lavada e a solução com reagente colorimétrico adicionada. Ao final deste período de

incubação, uma solução com ácido sulfúrico para interrupção da reação foi adicionada em cada valeta. As densidades ópticas geradas pela reação entre a enzima ligada à placa e o reagente colorimétrico adicionado foram lidas em um espectrofotômetro para testes ELISA (Microplate Reader, Behring EL 311) com um comprimento de onda de 450 nanômetros e um filtro secundário de 630 nanômetros. A concentração dos marcadores em cada amostra foi obtida pela interpolação dos resultados de densidade óptica em uma equação polinomial de terceiro grau gerada a partir de uma curva padrão realizada com as diferentes densidades ópticas e concentrações conhecidas da substância de interesse. O limite mínimo de detecção para os ensaios variou conforme a substância e o conjunto utilizado.

Em relação a execução dos ensaios já tínhamos adquirido experiência prévia com o método em estudos anteriores (30,98). Neste estudo, não houve problemas técnicos quanto à realização dos ensaios. Todas as curvas-padrão foram apropriadas e não foi necessário repetir nenhum dos ensaios. Em relação aos coeficientes de variação entre as duplicatas, obtivemos níveis menores de 5 % para o rs I e II do TNF α , e em torno de 10 % para o rs-IL 2, TNF α e IL-1 β .

5.4. Considerações éticas -

De acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, resolução número 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos, aprovada pelo Conselho Nacional de Saúde em 10/10/96, esta pesquisa foi considerada como risco mínimo, já que os procedimentos hemodinâmicos invasivos (cineangiocoronariografia diagnóstica e angioplastia coronária) foram realizados por indicação do médico assistente de cada paciente. O único procedimento invasivo derivado

da investigação foi a punção de uma veia periférica nos indivíduos normais, que poderia provocar dor e desconforto no local puncionado, e, eventualmente, pequena equimose. A retirada de 20 ml de sangue periférico, tanto dos pacientes quanto dos controles, representa uma pequena perda sangüínea sem conseqüências clínicas.

Antes de seu início, o projeto da pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O termo de consentimento pós-informação foi assinado por todos os indivíduos incluídos no estudo, conforme já descrito (Anexos 1, 2 e 3).

5.5. Análise estatística -

O nível de significância considerado para todos os testes foi menor do que 0,05 em teste bicaudal.

Como não havia relato prévio de estudos com esta metodologia em pacientes com reestenose coronária, realizamos um estudo piloto. O cálculo do poder estatístico do estudo foi realizado durante sua execução, a partir da diferença entre as médias dos níveis de rs-IL 2 dos dois grupos de pacientes, as variâncias desta variável, o número de pacientes alocados no estudo até aquele momento e o nível de significância adotado. O poder estatístico estimado do estudo foi então de 80 %.

As variáveis estudadas são descritas conforme sua média e desvio-padrão, exceto o $TNF\alpha$ que é descrito conforme sua mediana e extremos.

As diferenças dos níveis plasmáticos dos marcadores imunoinflamatórios entre os grupos com reestenose coronária, com aterosclerose primária e de indivíduos normais foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), sendo que as diferenças entre os subgrupos foram avaliadas pelo teste de Scheffé. As diferenças dos níveis de $TNF\alpha$ entre

os três subgrupos de pacientes foram avaliadas por método não paramétrico de Kruskal-Wallis com método “post-hoc” específico para análise de subgrupos de dados não paramétricos (126). As diferenças entre as variáveis contínuas dos dois grupos foram avaliadas pelo Teste T para amostras independentes e as diferenças entre as variáveis categóricas foram avaliadas pelo Teste Exato de Fisher. A presença de correlação entre os níveis plasmáticos de cada um dos marcadores entre si e com outras variáveis contínuas foi avaliada pelo coeficiente de Pearson, e, no caso do $\text{TNF}\alpha$, pelo coeficiente de Spearman.

Foi utilizado método de regressão linear múltipla para avaliar se as diferenças entre as características clínicas dos grupos de pacientes com reestenose coronária e aterosclerose primária poderiam explicar as diferenças encontradas na concentração plasmática dos marcadores. As variáveis independentes analisadas foram a idade, o número de vasos comprometidos, a presença de angina instável, o comprometimento proximal da artéria descendente anterior e o tempo desde o último episódio de dor, e a variável dependente analisada foi a concentração plasmática de cada marcador.

6.RESULTADOS

6.1. Características clínicas -

Os dados relacionados à idade, sexo, apresentação clínica, tempo de evolução de angina instável, tempo do último episódio de angina, história de cirurgia de revascularização do miocárdio e história de IAM prévio encontram-se na tabela 1. O número de indivíduos alocados em cada grupo de estudo foi semelhante. Observamos idade significativamente menor no grupo de indivíduos normais, já que um dos critérios de inclusão para este grupo era justamente idade menor do que 35 anos. A idade dos dois grupos de pacientes não apresentou diferença significativa. Não houve também diferenças significativas em relação ao sexo e a presença ou não de angina instável, embora todos os pacientes do grupo com aterosclerose primária apresentassem angina instável contra 7 dos 11 pacientes com reestenose coronária. Em relação à proximidade do último episódio sintomático de isquemia observamos que os pacientes com reestenose coronária apresentaram angina há significativamente menos tempo do que aqueles com aterosclerose primária. Nos dois grupos somente um paciente havia realizado revascularização cirúrgica do miocárdio previamente. Em relação à ocorrência prévia de IAM, 5 pacientes do grupo com reestenose coronária haviam apresentado infarto do miocárdio previamente contra somente 1 paciente do grupo com reestenose coronária, diferença que não atingiu significância estatística.

O tempo da angioplastia coronária até a coleta nos pacientes com reestenose coronária foi de 163 ± 86 dias. Não houve diferença significativa entre os dois grupos de pacientes quanto à história prévia de fatores de risco para cardiopatia isquêmica. No grupo

Tabela 1 - Características clínicas, angiográficas e laboratoriais da amostra.

	ATEROSCLEROSE	REESTENOSE	CONTROLE
n	10	11	9
Idade (anos)	64 ± 6	58 ± 13	28 ± 4 **
Sexo (masculino)	6	7	10
Angina Instável (n)	10	7	
Tempo de angina instável (dias)	36 ± 34	29 ± 29	
Tempo do último episódio de angina (horas)	124 ± 144	77 ± 214 *	
IAM prévio (n)	1	5	
Cirurgia de revascularização do miocárdio prévia (n)	1	1	
Comprometimento de 1 vaso (n)	9	2 *	
Envolvimento proximal da DA (n)	5	3	
Gravidade de estenose (%)	97 ± 4	88 ± 14	
Fração de ejeção (%)	63 ± 6	52 ± 8	
LDL-Colesterol (mg/dl)	123 ± 28	141 ± 47	121 ± 39
HDL-Colesterol (mg/dl)	41 ± 9	38 ± 9	42 ± 9

Os dados estão descritos conforme suas médias e desvios-padrão ou o número de pacientes.

* p < 0,05 na comparação com o grupo de pacientes com aterosclerose primária;

** p < 0,05 na comparação com os dois grupos de pacientes.

LEGENDAS - n - número de pacientes; IAM - Infarto agudo do miocárdio; DA - artéria descendente anterior; ACTP - Angioplastia coronária transluminal percutânea.

da reestenose coronária, 2 pacientes relatavam história de tabagismo, 7 apresentavam hipertensão arterial sistêmica, 8 tinham história de dislipidemia e nenhum apresentava diabetes mellitus. No grupo de pacientes com aterosclerose primária, história de tabagismo foi relatada por 4 pacientes, hipertensão arterial por 5, dislipidemia por 3 e diabetes mellitus por apenas 1 paciente. Quanto a aspectos relacionados ao tratamento, também não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Nos pacientes com reestenose coronária, 6 estavam em uso de betabloqueadores e nitrato, 9 em uso de ácido acetilsalicílico, 7 pacientes recebiam antagonistas do cálcio e 3 pacientes usavam ticlopidina. Todos os pacientes deste grupo estavam em regime ambulatorial no momento da coleta. No grupo com aterosclerose primária, 6 pacientes estavam em uso de betabloqueadores, 7 em uso de nitrato, 6 pacientes em uso de ácido acetilsalicílico, 5 recebiam antagonistas do cálcio, 3 usavam ticlopidina e 2 pacientes estavam internados em uso de heparina endovenosa contínua. Quanto a variáveis hemodinâmicas no momento da coleta dos dados, também não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes. Nos pacientes com reestenose coronária, observamos pressão arterial sistólica de 150 ± 16 mm Hg, a pressão arterial diastólica foi 82 ± 15 mm Hg e a frequência cardíaca foi 75 ± 15 batimentos por minuto. Nos pacientes com aterosclerose primária, a pressão arterial sistólica foi 136 ± 21 mm Hg, a pressão arterial diastólica foi 86 ± 12 mm Hg e a frequência cardíaca foi 70 ± 8 batimentos por minuto.

6.2. Características angiográficas -

Conforme os dados ilustrados na Tabela 1, os pacientes com reestenose coronária apresentaram cardiopatia isquêmica mais grave do que o grupo com aterosclerose primária. Observa-se que quando o número de vasos comprometidos foi avaliado como

uma variável dicotômica (presença ou não de comprometimento de 1 vaso), houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Desta forma, somente 2 pacientes do grupo da reestenose coronária apresentavam lesão de 1 vaso, 8 apresentavam lesão de 2 vasos e 1 paciente apresentava lesão de 3 vasos e de 2 pontes de safena. Por outro lado, 8 pacientes do grupo com aterosclerose primária apresentava lesão de 1 vaso, 1 paciente apresentava lesão de 2 vasos e 1 paciente apresentava lesão de 3 vasos e de duas pontes de safena. O envolvimento proximal da artéria descendente anterior foi semelhante nos dois grupos, bem como a gravidade da lesão culpada, conforme os dados da Tabela 1. É importante ressaltar que, no grupo de pacientes com reestenose coronária, foram incluídos dois pacientes que apresentavam lesão culpada que não a lesão reestenótica.

Em relação às artérias comprometidas, 5 pacientes apresentaram reestenose coronária na artéria descendente anterior (sendo que em 3 houve envolvimento do terço proximal), 4 pacientes na artéria coronária direita e 2 pacientes na artéria circunflexa. A lesão culpada no grupo da aterosclerose primária ocorreu na artéria descendente anterior em 6 pacientes (sendo que em 5 a lesão era no terço proximal deste vaso), na artéria coronária direita em 2 pacientes e na artéria circunflexa nos outros dois pacientes. Quanto à análise da morfologia das lesões coronárias no grupo de pacientes com aterosclerose primária pelos critérios de Ambrose e colaboradores (123), observamos os seguintes achados: um paciente apresentava irregularidades múltiplas, 1 paciente apresentava lesão excêntrica tipo I, 1 paciente apresentava oclusão aguda de uma lesão concêntrica imediatamente após a coleta de sangue e antes da injeção de contraste (este paciente apresentava uma lesão concêntrica de 99% no segmento médio da descendente anterior na cineangiocoronariografia realizada alguns dias antes e iniciou com angina de forte intensidade imediatamente antes do exame) e os demais pacientes apresentavam lesões concêntricas. A fração de ejeção avaliada por ventriculografia esquerda com contraste não foi diferente entre os dois grupos de pacientes.

6.3. Análises laboratoriais -

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis séricos de LDL-colesterol e HDL-colesterol dos três grupos (dados na Tabela 1). Os níveis de triglicerídeos foram 192 ± 133 mg/dl no grupo de pacientes com reestenose coronária, 116 ± 52 mg/dl nos pacientes com aterosclerose primária e 126 ± 46 mg/dl nos indivíduos normais; não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nenhum dos indivíduos ou dos pacientes estudados apresentou nível de glicose sérico maior do que 140 mg/dl ou nível sérico de creatinina maior do que 1.5 mg/dl. Os níveis de CPK-MB foram abaixo do limite superior do normal em todos os pacientes. Um paciente do grupo com reestenose coronária apresentou CPK = 250 mg/dl (valor de referência < 180 mg/dl), mas o valor da fração MB foi normal. O último episódio de dor relatado por este paciente havia sido há 70 horas, com duração de 5 minutos e o eletrocardiograma de repouso não evidenciava alterações do segmento ST ou ondas Q patológicas.

6.4. Níveis plasmáticos dos marcadores -

Em relação ao rs-IL 2, observamos níveis plasmáticos significativamente mais altos nos pacientes com reestenose coronária (1640 ± 576 pg/ml) quando comparados com os indivíduos normais (796 ± 470 pg/ml; $p < 0.05$). Por sua vez, os pacientes com aterosclerose primária apresentaram níveis significativamente mais elevados do que ambos os grupos citados (2283 ± 542 p/ml; $p < 0.05$ para ambas as comparações) (Figura 1).

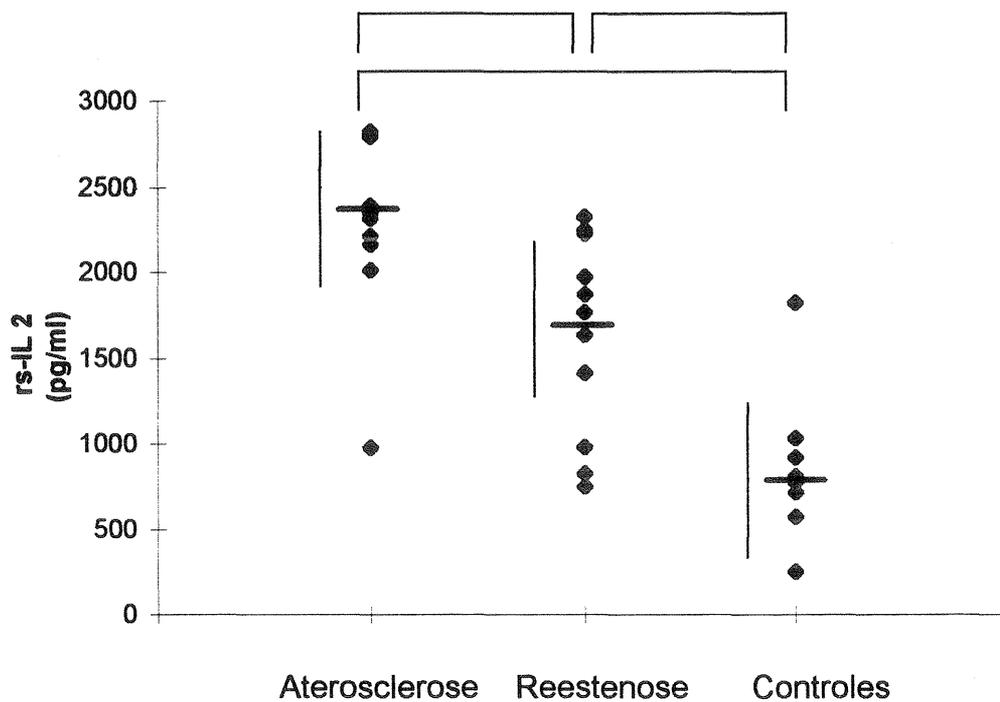


Figura 1 -Gráfico de pontos individuais das concentrações plasmáticas do rsIL-2 em cada grupo estudado. Observam-se níveis significativamente mais elevados nos pacientes com aterosclerose primária quando comparados tanto com os pacientes com reestenose coronária quanto com os controles. Os níveis dos pacientes com reestenose coronária também foram significativamente mais elevados quando comparados com os controles (as linhas que unem os grupos representam as diferenças significativas: $p < 0,05$ por ANOVA com método de Scheffé para análise dos subgrupos; as barras horizontais representam a média e as linhas verticais o desvio padrão de cada grupo).

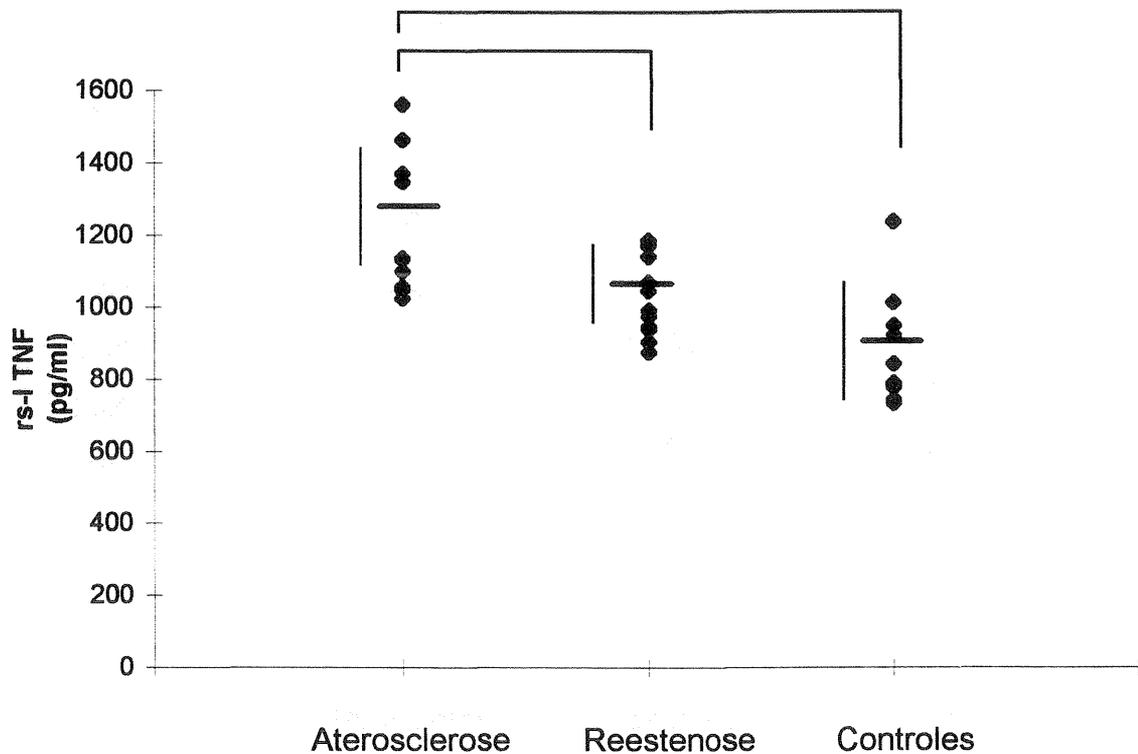


Figura 2 -Gráfico de pontos individuais das concentrações plasmáticas do rs-I TNF α em cada grupo estudado. Observam-se níveis significativamente mais elevados nos pacientes com aterosclerose primária quando comparados com os outros dois grupos. Não houve diferença entre os pacientes com reestenose coronária e os controles (as linhas que unem os grupos representam as diferenças significativas: $p < 0,05$ por ANOVA com método de Scheffé para análise dos subgrupos; as barras horizontais representam a média e as linhas verticais o desvio padrão de cada grupo).

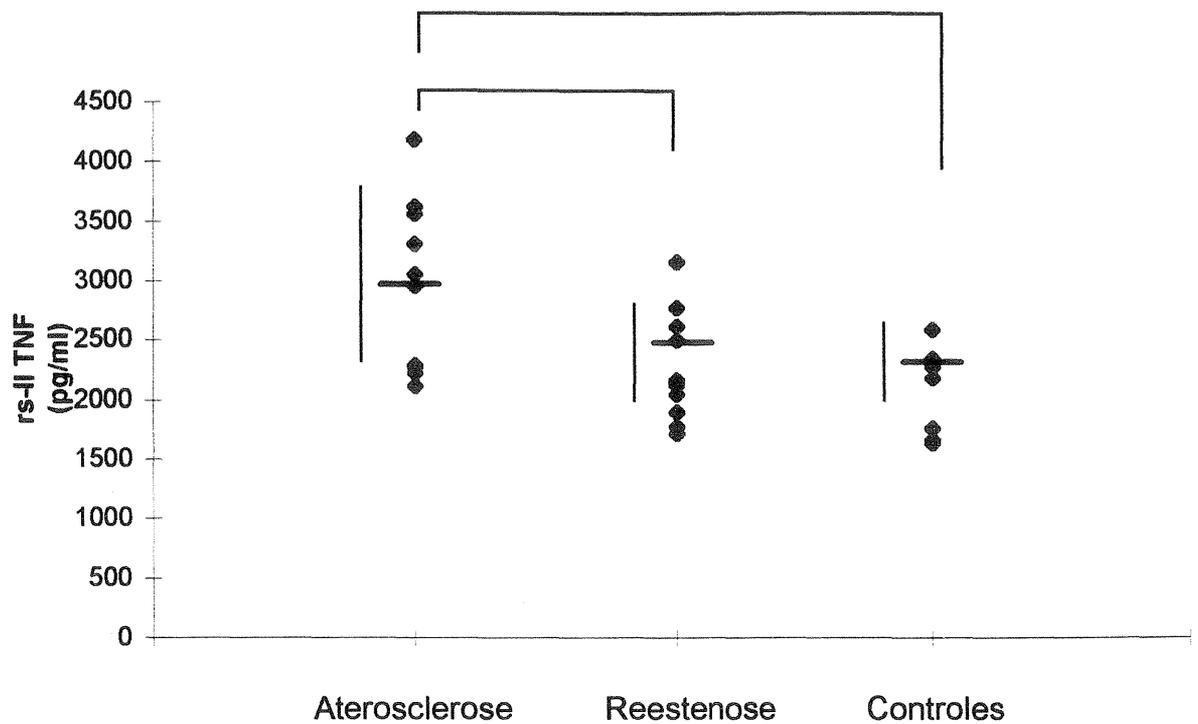


Figura 3 - Gráfico de pontos individuais das concentrações plasmáticas do rs-II TNF α em cada grupo estudado. Observam-se níveis significativamente mais elevados nos pacientes com aterosclerose primária quando comparados com os outros dois grupos. Não houve diferença entre os pacientes com reestenose coronária e os controles (as linhas que unem os grupos representam as diferenças significativas: $p < 0,05$ por ANOVA com método de Scheffé para análise dos subgrupos; as barras horizontais representam a média e as linhas verticais o desvio padrão de cada grupo).

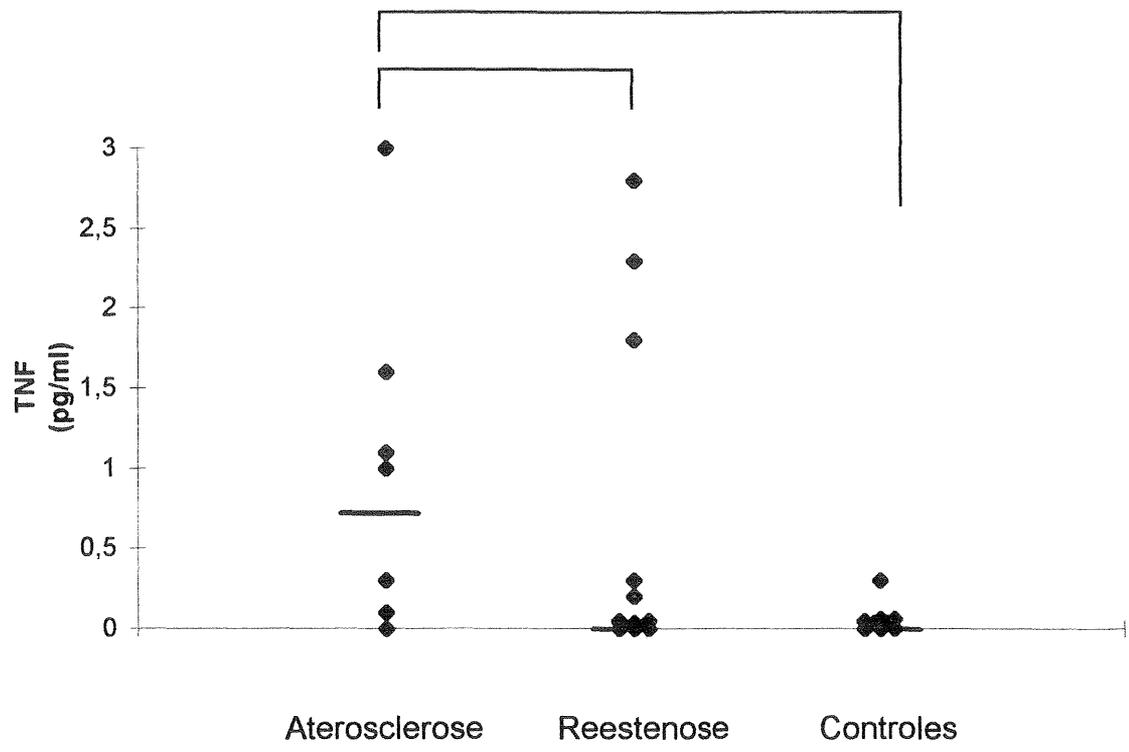


Figura 4 -Gráfico de pontos individuais das concentrações plasmáticas de TNF α em cada grupo estudado. Observam-se níveis significativamente mais elevados nos pacientes com aterosclerose primária do que nos pacientes com reestenose coronária e nos controles (as linhas que unem os grupos representam as diferenças significativas: $p < 0,05$ por método de Kruskal Wallis, com análise dos subgrupos por teste “post hoc” não paramétrico; as barras horizontais representam a mediana de cada grupo).

Quanto ao rs I-TNF α , não houve diferença significativa entre os níveis plasmáticos encontrados nos pacientes com reestenose coronária (1021 ± 108 pg/ml) e aqueles dos indivíduos normais (888 ± 162 pg/ml), embora os pacientes com aterosclerose primária tenham apresentado níveis significativamente mais elevados do que ambos os outros grupos (1223 ± 194 pg/ml; $p < 0.05$ para ambas as comparações) (Figura 2).

Em relação aos níveis plasmáticos do rs II-TNF α , também não foi observada diferença entre o grupo da reestenose coronária (2267 ± 447 pg/ml) e os indivíduos normais (2123 ± 345 pg/ml), sendo que os pacientes com aterosclerose primária apresentaram níveis significativamente mais elevados do que ambos os grupos (2958 ± 716 pg/ml) (Figura 3).

Os níveis plasmáticos de TNF α também não foram diferentes entre os pacientes com reestenose coronária (0 pg/ml [0-2.8 pg/ml]) e os indivíduos normais (0 pg/ml [0-0.3 pg/ml]). Novamente, o grupo de pacientes com aterosclerose primária apresentou níveis significativamente mais elevados do que ambos os grupos anteriores (0.65 pg/ml [0-3.0 pg/ml]) ($p < 0.01$ para as diferenças) (Figura 4). É importante ressaltar que vários indivíduos apresentaram níveis indetectáveis de TNF α , considerados como zero. No grupo de pacientes com aterosclerose, 2 pacientes apresentaram valores indetectáveis, enquanto que no grupo com reestenose coronária, 6 pacientes tiveram níveis indetectáveis e nos indivíduos normais somente 1 apresentou níveis detectáveis.

Os níveis plasmáticos de IL-1 β foram indetectáveis em todos os pacientes e indivíduos normais estudados. Segundo o fabricante, 40 indivíduos doadores de sangue e considerados "aparentemente normais" apresentaram níveis inferiores a 3.9 pg/ml, sendo que o nível mínimo detectável de IL-1 β com este ensaio foi "tipicamente menor do que 1 pg/ml".

6.5. Associações entre variáveis -

Observamos uma correlação muito boa entre os níveis plasmáticos dos receptores I e II do TNF α ($r = 0,85$; $p < 0,0001$). As correlações entre os níveis do TNF α e seus dois receptores também foram significativas ($r=0,61$ para correlação com rs I e $r=0,6$ para correlação com receptor II; $p < 0,0001$ para ambos os testes). Observamos uma correlação fraca porém significativa entre os níveis plasmáticos do rs-IL 2 e o TNF α ($r=0,45$, $p < 0,05$), mas ausência de correlação com os receptores solúveis do TNF α .

Não houve correlação entre a idade, o tempo do último episódio de dor, a gravidade da estenose coronária, o número de vasos comprometidos e os níveis de colesterol sérico e os marcadores imunoinflamatórios. Além disso, realizamos regressão linear múltipla com o objetivo de avaliar se diferenças nas características clínicas e angiográficas dos dois grupos de pacientes poderiam explicar as diferenças no nível plasmático de cada um dos marcadores estudados. Foram realizados quatro modelos de entrada progressiva, nos quais a idade, a presença ou não de angina instável, o tempo do último episódio de dor, o número de vasos comprometidos e o comprometimento proximal da artéria descendente anterior foram as variáveis independentes, e o nível plasmático de cada um dos marcadores foi a variável dependente. Nenhum dos modelos realizados apresentou associação significativa.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que pacientes com reestenose coronária pós-angioplastia apresentam elevação significativa dos níveis plasmáticos do rs-IL 2 quando comparados com indivíduos normais, mas não do TNF α , de seus receptores solúveis ou de IL-1 β . Por outro lado, verificamos que pacientes com aterosclerose primária apresentam aumento significativo do rs-IL 2, do TNF α e de seus receptores solúveis quando comparados tanto com indivíduos normais quanto com pacientes com reestenose coronária. Estes achados são sugestivos de ativação linfocitária moderada nos pacientes com reestenose coronária, mas mais importante nos pacientes com aterosclerose primária. Além disso, estes últimos apresentam uma maior atividade imunoinflamatória global, conforme demonstrada pelo aumento dos níveis plasmáticos do TNF α e de seus receptores. Desta forma, estes resultados não confirmam nossa hipótese inicial de que os pacientes com reestenose coronária pós angioplastia apresentariam níveis mais elevados de todos os marcadores imunoinflamatórios circulantes do que pacientes com aterosclerose primária.

7.1. Ativação linfocitária na reestenose coronária -

A presença e a importância de atividade imunoinflamatória na reestenose coronária pós-angioplastia já foram comentadas previamente e estão bem demonstradas por diversas evidências científicas consistentes (18-21). Neste estudo, evidenciamos aumento dos níveis circulantes do rs-IL 2, um marcador clássico de ativação linfocitária, em pacientes com reestenose coronária pós-angioplastia. Apesar da importância dos

macrófagos e das células musculares lisas na fisiopatologia deste processo, o papel dos linfócitos T tem sido menos estudado. Neste contexto, evidências recentes implicando estas células na formação, evolução e instabilização das lesões ateroscleróticas (13,111) parecem ter alertado para sua relevância no âmbito da reestenose coronária.

Embora estudos que tenham analisado níveis de marcadores da função linfocitária circulantes na reestenose coronária não sejam disponíveis, diversos relatos sugerem a participação dos linfócitos T na formação das lesões reestenóticas. Estudando espécimes de aterectomia e com seguimento angiográfico de seis meses após o procedimento, Lima e colaboradores (20) demonstraram uma tendência à maior concentração de células T em placas ricas em células espumosas que eventualmente desenvolveriam reestenose coronária, sugerindo que os linfócitos T pudessem estar implicados nas fases fisiopatológicas iniciais do processo. O mesmo grupo (22) também demonstrou que lesões reestenóticas também apresentavam infiltrado inflamatório composto por linfócitos T, assim como Arbustini e colaboradores (127). Similarmente, Blum e colaboradores (78) verificaram que pacientes com aumento dos níveis plasmáticos do rs-IL 2 antes da angioplastia normalizavam este índice após o procedimento com sucesso, mas não quando havia reestenose coronária ou complicação.

A análise conjunta de nossos resultados e dos dados citados apontam para a participação dos linfócitos T na evolução das lesões reestenóticas. Uma especulação que poderia ser feita é que, nas fases mais tardias, como é o caso de nosso estudo, os linfócitos T poderiam estar secretando interferon-gama como parte do processo de regeneração da parede celular. Nesta fase de evolução da doença, as lesões reestenóticas podem ainda sofrer remodelamento e a neointima está em processo de involução. O interferon-gama poderia estar envolvido através da inibição da proliferação muscular lisa e da produção de matriz extracelular por estas células (128).

Em relação à comparação dos níveis do rs-IL2 entre os pacientes com reestenose coronária e aqueles com aterosclerose primária, observamos níveis significativamente mais elevados nesta última situação. A seleção de pacientes com angina instável em ambos os grupos poderia ser o fator responsável por estas diferenças, já que diversas evidências recentes indicam que a angina instável secundária à aterosclerose primária é mais "instável" do que àquela secundária à reestenose coronária (16). A primeira condição apresenta quase sempre importante infiltração lipídica (111), alta concentração de fator tecidual (129) e o achado de trombo na superfície das placas é freqüente (127). Na reestenose coronária, não se observa infiltração de colesterol (130), a concentração de fator tecidual é menor e é raro o achado de trombos (131). Estas diferenças na composição das placas poderiam explicar porque a incidência de IAM secundário à angina instável por reestenose coronária é mais baixa do que em pacientes com aterosclerose primária (132,133) e o índice de complicações agudas após angioplastia é menor (134). Além disso, as diferenças na fisiopatologia das duas doenças também se refletem em relação ao tratamento, tendo sido demonstrado que na angina instável secundária à reestenose coronária o uso de heparina não proporciona o mesmo efeito terapêutico do que em pacientes com aterosclerose primária (135), presumivelmente devido à menor importância de trombo na primeira situação.

7.2. TNF α na reestenose coronária -

A importância do TNF α na reestenose coronária já foi comentada previamente e é ilustrada por evidências que demonstram que esta citocina está presente no interior de lesões reestenóticas maduras (22), pela possibilidade de inibição da proliferação neointimal com o bloqueio do TNF α em modelos experimentais (94) e pelo fato de que muitas

funções celulares envolvidas na fisiopatologia da reestenose são mediadas pelo TNF α (14). No entanto, não verificamos aumento dos níveis plasmáticos do TNF α ou de seus receptores solúveis nos pacientes com reestenose coronária quando comparados a indivíduos normais, tendo inclusive observado níveis significativamente menores do que nos pacientes com aterosclerose primária. Uma explicação para estes resultados poderia ser o tempo prolongado após a realização da angioplastia, com conseqüente diminuição da atividade imunoinflamatória e ausência de expressão significativa na circulação.

7.3. Atividade imunoinflamatória na aterosclerose primária -

Nossos achados de atividade imunoinflamatória plasmática aumentada em pacientes com aterosclerose primária são compatíveis com o fato de que a ativação do sistema imune e a inflamação desempenham um papel importante na fisiopatologia desta doença (13,14,42,110,111). Macrófagos e linfócitos T estão presentes durante toda a evolução da placa e as demais células da parede vascular (células endoteliais e musculares lisas) encontram-se ativadas e capazes de produzir diversas citocinas e fatores de crescimento (109,111). Além disso, diversos outros grupos demonstraram elevação de marcadores imunoinflamatórios circulantes utilizando o método de ELISA em pacientes com aterosclerose primária e diversas apresentações clínicas, principalmente angina instável (32-35,78,136).

7.4. Atividade imunoinflamatória na angina instável -

Uma característica importante de nossa amostra é que todos os pacientes com aterosclerose primária estudados apresentavam angina instável com dor em repouso. Embora não exista sempre uma correlação estreita entre o quadro clínico e a histopatologia da lesão, diversos estudos vêm demonstrando que atividade imunoinflamatória mais intensa ocorre nas síndromes isquêmicas agudas. Assim Arbustini e colaboradores (127), Flugelman e colaboradores (137) e Vince e colaboradores (138) demonstraram que as placas de pacientes com angina instável apresentam maior infiltrado inflamatório, maior concentração de células ativadas e de fatores de crescimento do que lesões de pacientes com angina estável. van der Wal e associados (112) demonstraram que um importante mecanismo de fragilização da placa é a infiltração e ativação de linfócitos T e macrófagos nos ombros de sua capa fibrosa, e estes achados têm sido considerados como um dos fatores responsáveis pela instabilização da lesão (139). Libby e colaboradores (91,114) e Fuster (140) sugerem que o mecanismo pelo qual as células inflamatórias fragilizariam a capa fibrosa seria a produção de citocinas, degradação de matriz e indução de apoptose mediada por IL-1 β . Weber e colaboradores (141) verificaram aumento da concentração da proteína quimioattractante de monócitos 1 e de TNF α em placas instáveis quando comparados a placas de pacientes com angina estável, sugerindo que o TNF α possa contribuir para a indução desta proteína e conseqüentemente aumento do infiltrado inflamatório.

A tradução desta atividade imunoinflamatória dentro da placa em elevação de marcadores na circulação de pacientes com angina instável não tem sido tão consistentemente demonstrada (29,142). Em relação aos níveis circulantes de TNF α e de seus receptores solúveis, seu aumento em pacientes com angina instável ou cardiopatia

isquêmica quando comparados a indivíduos normais já foi demonstrado previamente (29,33,136).

Em relação à avaliação da função linfocitária, a ativação de linfócitos circulantes de pacientes com angina instável já foi demonstrada "in vitro" e está relacionada ao início da instabilização da angina (143). No entanto, foram relatados resultados divergentes utilizando metodologia semelhante à nossa. Em estudo prévio, não encontramos diferença significativa entre os níveis de rs-IL 2 do seio coronário e do sangue periférico de 18 pacientes com angina instável, 14 pacientes com angina estável e 10 controles normais (30). Analisando um número significativamente maior de pacientes, Simon e colaboradores (32) verificaram um surpreendente aumento dos níveis de rs-IL 2 e da IL 2 65 em pacientes com angina estável quando comparados com 24 pacientes com angina instável, sendo que este último grupo não apresentou níveis significativamente mais elevados que controles normais.

Mais recentemente, Neri Serneri e colaboradores (31) avaliaram por citometria de fluxo a expressão de antígenos linfocitários precoces (receptor da interleucina-2, CD25,CD71) e tardios (HLA-DR) e analisaram os níveis circulantes do rs-IL 2 de 29 pacientes com angina instável, 36 com angina estável e 30 indivíduos normais. Observou-se que os níveis circulantes do rs-IL 2 e do HLA-DR estavam significativamente aumentados nos pacientes com angina instável, que regrediam ao normal após a regressão do evento isquêmico agudo e que a intensidade da reação imunológica parecia estar ligada ao prognóstico.

As razões para as diferenças entre estes três estudos poderiam estar relacionadas a aspectos metodológicos e da seleção de pacientes. Os resultados de Neri Serneri e colaboradores nos parecem mais consistentes, já que a ativação linfocitária foi analisada através de um amplo espectro de sua expressão antigênica e ao longo de um período prolongado de tempo, por um grupo pioneiro na área e com experiência nas técnicas

empregadas (143). Os pacientes neste último estudo apresentavam todos angina instável com dor em repouso (classe IIB e IIIB da classificação de Braunwald), enquanto não dispomos de dados relacionados à seleção dos pacientes com angina instável incluídos no estudo de Simon e colaboradores (32) e em relação à metodologia específica empregada.

Além do exposto, também é útil considerar que tanto a reestenose coronária quanto a aterosclerose primária constituem-se em respostas de reparo vascular à lesão (42,111). Entretanto, enquanto que no processo da reestenose o dano vascular é bem definido, na aterosclerose o insulto vascular é crônico com períodos de agudização (144). Como já comentado, nossa amostra de pacientes com reestenose coronária apresentava um tempo médio de angioplastia de 5 meses e, neste período, talvez muitas das alterações inflamatórias já houvessem regredido. Por outro lado, todos os pacientes com aterosclerose primária apresentavam angina instável com dor em repouso. Se a instabilização da angina é causada por ruptura e/ou erosão da placa e um dos principais determinantes desta alteração é a inflamação, talvez tenhamos comparados grupos desiguais quanto ao tempo após a lesão. Assim, este poderia ser um dos motivos pelo qual os pacientes com reestenose coronária não apresentaram atividade imunoinflamatória maior.

Concluindo, nossos dados demonstram que pacientes com aterosclerose primária e angina instável apresentam atividade imunoinflamatória importante. Estes resultados são compatíveis com o conceito de que este é um aspecto importante desta doença, podendo ser, inclusive, uma das causas da instabilização da placa.

7.5. Significado biológico das alterações nos marcadores imunoinflamatórios -

A evidência de que a elevação dos níveis circulantes de citocinas e de seus receptores solúveis realmente representam atividade imunoinflamatória decorre do fato destes marcadores encontrarem-se aumentados em situações onde há reconhecidamente ativação do sistema imune e processo inflamatório em andamento e ausentes ou em níveis baixos em indivíduos normais. Vários estudos que avaliaram pacientes com sepse, choque, falência hepática fulminante e transplante hepático demonstraram níveis circulantes de TNF α e de seus receptores dez vezes acima do normal (81,83,84,98-100), bem como do receptor solúvel da interleucina 2 (103). Em um estudo prévio realizado em nosso laboratório, Brauner avaliou os níveis plasmáticos dos receptores solúveis do TNF α e do TNF α em pacientes com choque séptico, verificando valores semelhantes aos estudos relatados (98).

As interrelações entre as diversas células da parede vascular são dinâmicas e as citocinas são fundamentais na regulação de suas funções. Neste estudo, detectamos níveis circulantes elevados de citocinas e de seus receptores solúveis, que são considerados índices indiretos de sua presença. Mais importante, as alterações detectadas apresentaram um perfil consistente, ou seja, as maiores elevações dos níveis circulantes dos marcadores foram observadas no grupo de pacientes com aterosclerose primária, sendo que os pacientes com reestenose coronária apresentaram aumento de somente um dos marcadores. Estes achados reforçam a validade interna do estudo, já que a atividade imunoinflamatória excessiva geralmente provoca ativação de todas as células envolvidas, como um fenômeno em cascata.

Como já discutido previamente, nossos dados indicam maior ativação linfocitária nos pacientes com aterosclerose primária, já que o rs-IL 2 é produzido exclusivamente após a ativação de células T por qualquer estímulo. O aumento dos receptores solúveis do

TNF α e do próprio TNF α circulante indicam aumento de sua expressão por células imunocompetentes da placa aterosclerótica ou por células circulantes ativadas na sua passagem por ela . Embora o TNF α seja predominantemente um produto de macrófagos ativados, muitas células produzem simultaneamente esta citocina nos pacientes com aterosclerose (109,145). Mesmo que este estudo não tenha sido delineado para identificar mecanismos de ativação celular e a fonte da produção das citocinas, os dados obtidos podem proporcionar algumas suposições.

Na aterosclerose, acredita-se que o LDL-colesterol seja o principal mecanismo para o dano vascular e início deste processo (111). Em placas já formadas, o LDL-colesterol oxidado pode também estar envolvido na sua instabilização. Através da ativação de macrófagos, estas células desencadeariam o início dos fenômenos imunoinflamatórios (112,140). O TNF α poderia ser um dos mediadores deste processo, já que é uma citocina produzida principalmente pelos macrófagos e, após sua produção, é capaz de ativar diversas células da parede vascular, inclusive os linfócitos T (87). Nestas células, estimula seu crescimento e proliferação, além de induzir a expressão do rs-IL 2 na sua superfície. É importante ressaltar que, embora compatível com nossos dados, esta seqüência de eventos não foi demonstrada “in vivo” ou experimentalmente.

Em relação aos receptores solúveis do TNF α , várias evidências demonstram que estas substâncias têm um papel regulatório importante na função desta citocina, embora alguns aspectos ainda sejam controversos. Sabe-se que ao estimular a célula-alvo através de seu receptor específico localizado na membrana, o TNF α provoca descolamento deste receptor, que transforma-se em uma forma solúvel circulante (receptor solúvel) (95). Estas formas solúveis ainda exibem o sítio de ligação para o TNF α e a observação de que sua administração em doses farmacológicas bloqueia a ação da citocina levantou a hipótese de que os receptores solúveis seriam seus antagonistas endógenos (94). Na verdade, o descolamento do receptor após sua estimulação "in vivo" funciona como retroalimentação

negativa para os efeitos do TNF α , já que diminui o número de receptores disponíveis na superfície celular para estimulação (97). Além disso, os receptores solúveis circulantes também são capazes de ligar-se ao TNF α , o que inibe os efeitos endócrinos da citocina a curto prazo mas permite a criação de um reservatório circulante de TNF α para posterior liberação.

De qualquer forma, os receptores solúveis são marcadores mais confiáveis para a presença de TNF α do que a dosagem direta da citocina, já que apresentam níveis circulantes mais elevados e meia vida maior (97). Este conceito é reforçado pela verificação de que estão aumentados em diversas condições nas quais o TNF α reconhecidamente está presente, como na sepse, choque, falência hepática fulminante e pós-operatório (81,83,84,98-100). Em nosso estudo, observamos aumento tanto dos níveis de TNF α quanto dos dois receptores nos pacientes com aterosclerose primária. A importância da mensuração dos receptores é ilustrada pelo fato de que nos nove pacientes do grupo controle onde não fomos capazes de detectar o nível da citocina, os dois receptores estavam presentes. Além disso, a correlação excelente entre os dois receptores é compatível com sua ativação simultânea pelo TNF α , conforme descrito por Flier e Underhill (95).

Os níveis de IL-1 β foram indetectáveis em todos os pacientes e controles analisados, o que é compatível com a maioria dos estudos de que o nível desta citocina em pacientes com cardiopatia isquêmica é inferior à 1 pg/ml (30,34,35,146). Somente Hasdai e colaboradores relataram níveis de IL-1 β acima de 10 pg/ml em pacientes com aterosclerose mínima, avaliado também por método de ELISA (147). As causas destas diferenças entre este estudo e os demais não nos parecem claras, embora diferenças significativas entre os níveis obtidos com diversos conjuntos comerciais para análise da IL-1 β tenham sido demonstradas por Ledur e colaboradores (146).

7.6. Limitações -

Em relação ao aumento do rs-IL 2 nos pacientes com reestenose coronária e o aumento dos marcadores nos pacientes com aterosclerose primária, alguns aspectos devem ser considerados. A ocorrência de isquemia miocárdica tem sido citada como um fator de confusão à inferência de que marcadores imunoinflamatórios circulantes representem a expressão local de citocinas dentro de lesões ateroscleróticas (ou reestenóticas)(148,149). Tem sido sugerido que tanto a inflamação na parede arterial quanto a interface capilar com o miócito lesado por isquemia e/ou fenômenos de isquemia reperfusão poderiam ser a fonte de produção de citocinas (148). No entanto, diversos relatos demonstram que o aumento das citocinas e de mediadores imunoinflamatórios precedem a ocorrência da isquemia (143,150), que não existe associação entre a extensão da isquemia e o nível das citocinas (31) e que a origem de pelo menos alguns marcadores imunoinflamatórios circulantes é a parede vascular (119). Da mesma forma, neste estudo não evidenciamos associação entre os níveis dos marcadores circulantes e o número de vasos comprometidos e o tempo do último episódio sintomático de isquemia. Em um modelo de regressão linear múltipla de entrada progressiva onde foram incluídas variáveis relacionadas à isquemia e o nível de cada um dos marcadores, não houve evidência de associação em qualquer dos casos.

Em nosso estudo, a maioria dos pacientes com reestenose coronária apresentava uma outra lesão por aterosclerose primária, sendo que em 2 pacientes deste grupo esta outra lesão foi considerada a lesão culpada. Mesmo sendo esta uma questão controversa, alguns autores relataram aumento dos níveis do rs-IL2 em pacientes com angina estável (32,78) e este deve ser considerado um possível fator de confusão. Por outro lado, dados de nosso laboratório (30) e de Neri Sernerri e colaboradores (31) não evidenciaram

diferença entre os níveis plasmáticos de pacientes com angina estável e aqueles de indivíduos normais.

Por último, alguns estudos têm demonstrado que crianças até os primeiros 2 anos de idade apresentam níveis significativamente mais elevados do rs-IL 2 circulante (151), talvez devido a maior atividade do sistema imune nesta fase da vida. Embora dados específicos de quanto a idade poderia influir nos níveis plasmáticos deste marcador não sejam disponíveis, Rubin (103) sugere que possam aumentar com a idade. Em nosso estudo, não observamos associação entre os níveis plasmáticos de nenhum dos marcadores e a idade. A escolha de paciente jovens teve o objetivo de descartar cardiopatia isquêmica subclínica com segurança, já que havia sido relatado aumento de IL-1 β circulante em pacientes com aterosclerose coronária mínima (147), o que não foi confirmado em estudos posteriores. De qualquer forma, acreditamos que a diferença de idade entre os grupos deva ser considerada uma potencial limitação deste estudo.

Um outro aspecto que merece consideração são as limitações do método de ELISA para detectar a atividade biológica das citocinas (146). Como trata-se de um método imunológico, é suscetível à interferência de autoanticorpos ao antígeno de interesse ou à ligação de substâncias circulantes a este, o que proporcionaria resultados falsamente baixos. Embora tenhamos observado níveis indetectáveis da IL-1 β e níveis baixos ou indetectáveis de TNF α em todos os indivíduos analisados, os conjuntos utilizados foram testados pelo fabricante para interferência com diversas substâncias, inclusive o antagonista endógeno do receptor da IL-1 β (IL-RA) e os receptores solúveis do TNF α , em cada caso. Além disso, conforme já discutido, os níveis encontrados são compatíveis com a grande maioria dos relatos da literatura. Uma outra potencial fonte de erro seria a desnaturação das proteínas analisadas com a perda do epítipo reconhecível pelo anticorpo monoclonal usado no ensaio. A este respeito, todas as amostras foram processadas e congeladas imediatamente (menos de 30 minutos) após a coleta.

Por outro lado, o método de ELISA pode proporcionar resultados falsamente elevados de um antígeno quando o anticorpo monoclonal usado reconhece fragmentos deste antígeno provavelmente derivados de clivagem proteolítica, desta forma multiplicando seus valores. Também não acreditamos que este tenha sido um fator de confusão, já que, novamente, nossos resultados encontram-se em consonância com a maioria dos dados da literatura.

Uma maneira de evitar as limitações dos ensaios ELISA seria com a realização de ensaios citotóxicos. Estes, por sua vez, apresentam a limitação de serem inibidos por antagonistas circulantes das citocinas, em nosso caso, os receptores solúveis do TNF α e o antagonista endógeno da IL-1 β (97). Outros métodos imunológicos poderiam ser empregados para a dosagem de substâncias com pequenas concentrações circulantes, como o radioimunoensaio e o ELFA ("enzyme linked fluorescent antibody"). Embora possam ter uma sensibilidade discretamente maior do que o ELISA, a maioria dos estudos relatados nesta área empregou este último método.

Em resumo, embora o método de ELISA apresente as diversas limitações relatadas, acreditamos que nossos resultados refletiram a atividade imunoinflamatória de cada paciente. Isto porque, não houve diferenças significativas entre as duplicatas analisadas, a metodologia utilizada foi estritamente a recomendada pelo fabricante com a supervisão de pessoal experiente e treinado, os resultados foram homogêneos em termos da ativação imunoinflamatória em bloco somente em um grupo de pacientes, com base fisiopatológica consistente e compatível com a maioria dos valores relatados na literatura.

8. CONCLUSÕES

1. Os níveis plasmáticos do rs-IL2 foram significativamente mais elevados nos pacientes com reestenose coronária do que nos indivíduos normais, mas significativamente inferiores aqueles dos pacientes com aterosclerose primária.

2. Os níveis do TNF α e de seus receptores solúveis dos pacientes com reestenose coronária não foram diferentes daqueles dos indivíduos normais. Os níveis destes marcadores dos pacientes com aterosclerose primária foram significativamente maiores do que ambos os grupos de pacientes.

3. Os níveis de IL-1 β foram indetectáveis em todos os indivíduos estudados.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Califf RM. Restenosis: the cost to society. *Am Heart J* 1995; 130:680-684.
2. Versaci F, Gaspardone A, Tomai F, Crea F, Chiariello L, Gioffrè G. A comparison of coronary-artery stenting with angioplasty for isolated stenosis of the proximal left anterior descending coronary artery. *N Engl J Med* 1997; 336:817-822.
3. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994; 331:489-495.
4. Fischman DL, Leon MB, Baim DS. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994; 331:496-501.
5. Topol EJ, Califf RM, Harlan WHF, et al. Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months. *Lancet* 1994; 343:881-886.
6. Emanuelsson H, Beatt KB, Bagger J, et al. Long-term effects of angiopeptin treatment in coronary angioplasty. Reductions of clinical events but not angiographic restenosis. *Circulation* 1995; 91:1689-1696.

7. Maresta A, Balducelli M, Cantini L, et al. Trepidil (Triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of the randomized, double-blind STARC study. *Circulation* 1994; 90:2710-2715.
8. Tamai H, Katou K, Hayakawa H, et al. The impact of tranilast on restenosis following coronary angioplasty: the second tranilast restenosis following angioplasty trial (TREAT-2). *Circulation* 1996; 94:I-620 Abstract.
9. Tardif J, Côté G, Lespérance J, et al. Prevention of restenosis by pre and post-PTCA probucol therapy. A randomized clinical trial. *Circulation* 1996; 94:I-91 Abstract.
10. Huehns TY. New ideas for restenosis research aired in Ohio [news]. *Lancet* 1996; 347:1824
11. Muller DWM, Ellis SG, Topol EJ. Experimental model of coronary artery restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:418-432.
12. Currier JW, Faxon DP. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: have we been aiming at the wrong target? *J Am Coll Cardiol* 1995; 25:516-520.
13. Hansson GK. Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993; 69:S 38-S 41.

14. Libby P, Hansson G. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* 1991; 64:5-15.
15. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 1992; 86:III-47-III-52.
16. Kranzhofer R, Libby P. Interrelation between atherosclerosis and restenosis. *Z Kardiol* 1995; 84 Suppl 4:125-128.
17. Pietersma A, Kofflard M, de Wit LE, et al. Late lumen loss after coronary angioplasty is associated with the activation status of circulating phagocytes before treatment. *Circulation* 1995; 91:1320-1325.
18. Liuzzo G, Buffon A, Vitelli A, et al. Plasma levels of interleukin-6 predict restenosis following coronary angioplasty in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94:I-330. Abstract.
19. Buffon A, Liuzzo G, Biasucci LM, et al. Serum levels of C-reactive protein predict acute complications and restenosis after PTCA in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:363A. Abstract.
20. Lima VC, Gottlieb AI, Clausell N, et al. Analysis of atherosclerotic plaques obtained by coronary atherectomy: foam cells correlated positively with subsequent restenosis. *Cardiovasc Pathol* 1996; 5:265-269.

21. Moreno PR, Bernardi V, Lopez-Cuellar J, et al. Macrophage coronary atherosclerotic content is predictor for restenosis after coronary intervention. *Circulation* 1995; 92:I-161. Abstract.
22. Clausell N, de Lima VC, Molossi S, et al. Expression of tumour necrosis factor alpha and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. *Br Heart J* 1995; 73:534-539.
23. Rozek MM, Chandrasekar RS, Kiesz GL, et al. Atherectomy specimens obtained from patients with restenotic lesions reveal higher monocyte chemoattractant protein-1 levels than those with de novo lesions. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:380A. Abstract.
24. Topol EJ, Leva F, Pinkerton CA, et al. A comparison of directional atherectomy with coronary angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1993; 329:221-227.
25. Adelman AG, Cohen EA, Kimball BP, et al. A comparison of directional atherectomy with coronary angioplasty in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1993; 329:228-33.
26. Popma J, Califf RM, Topol EJ. Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 1991; 84: 1426-36.
27. The Multicenter European Research Trial with Cilazapril After Angioplasty to Prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis (MERCATOR) Study Group. Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after

percutaneous transluminal coronary angioplasty? Results of the MERCATOR study: a multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Circulation* 1992; 86: 100-110.

28. Tanaka H, Sukhova G, Swanson SJ, et al. Sustained activation of vascular cells and leukocytes in the rabbit aorta after balloon injury. *Circulation* 1993; 88:1788-1803.

29. Vaddi K, Nicolini FA, Mehta P, Mehta JL. Increased secretion of tumor necrosis factor- α and interferon- γ by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. Relevance in superoxide anion generation. *Circulation* 1994; 90:694-699.

30. Prado KF, Ribeiro JP, Quadros AS, et al. Ausência de associação entre atividade imunoinflamatória plasmática e a apresentação clínica de doença arterial coronária. *Arq Bras Cardiol* 1996; 67:125 Abstract.

31. Neri Serneri GG, Prisco D, Martini F, et al. Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation* 1997; 95:1806-1812.

32. Simon AD, Yazdani S, Wang W, Schwartz A, Rabbani LE. Markers of T-Lymphocyte activation are elevated in stable angina but not unstable angina. *Circulation* 1996; 94:I-81. Abstract.

33. Simon AD, Yasdani S, Wang W, et al. Inflammatory cytokines in stable versus unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:233A. Abstract.

34. Ikonomidis I, Economou EV, Pitsavos C, Cole C, Loizou S, Nihoyannopoulos P. Severity of coronary artery disease is associated to macrophage colony stimulating factor, interleukin 1b and 6 plasma levels. *Circulation* 1996; 94:I-81-I-82. Abstract.
35. Tashiro H, Shimokawa H, Tada H, Mormohara M, Yamamoto k. Inflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 1996; 94:I-81. Abstract.
36. Endo S, Harada M, Sato N, et al. Elevated plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94:I-495. Abstract.
37. Baim DS. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. In: Baim DS, Grossman W, eds. *Cardiac Catheterization, angiography, and intervention*. 5 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996:537-580.
38. Fortin DF, Tchong JE, Hillegass WB, Phillips III HR. Clinical management of restenosis. In: Roubin G, Calliff R, eds. *Interventional cardiovascular medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 555-573.
39. Lincoff AM, Topol EJ. Interventional catheterization techniques. In: Braunwald E, ed. *Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997:1366-1391.
40. Muhlestein JB, Zidar JP, Jackman JD. Vascular biology of restenosis: an overview. In: Roubin G, Calliff R, eds. *Interventional cardiovascular medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 119-132.

41. Schwartz SM, Reidy MA. An assesment of factors important in arterial occlusion. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven Publishers, 1997:701-714.
42. Falk E, Nobuyoshi M. Differences between atherosclerosis and restenosis. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven Publishers, 1996:683-700.
43. Ambrose JA, Weinrauch M. Thrombosis in ischemic heart disease. Arch Intern Med 1996; 156:1382-1394.
44. Geary RL, Williams JK, Golden D, Brown DG, Benjamin ME, Adams MR. Time course of cellular proliferation, intimal hyperplasia, and remodeling following angioplasty in monkeys with established atherosclerosis. A nonhuman primate model of restenosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16:34-43.
45. Merhi Y, Lacoste L, Lam JYT. Neutrophil implications in platelet deposition and vasoconstriction after deep arterial injury by angioplasty in pigs. Circulation 1994; 90:997-1002.
46. Godfried SL, Deckelbaum LI. Natural antioxidants and restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Am Heart J 1995; 129:203-210.
47. Guzman LA, Mick MJ, Arnold AM, Forudi F, Whitlow PL. Role of intimal hyperplasia and arterial remodeling after balloon angioplasty: an experimental study in the atherosclerotic rabbit model. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16:479-487.

48. Suzuki H, Sunayama S, Okada R, et al. Extracellular matrix remodelling in restenotic human coronary atherosclerotic plaque of balloon angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:421A. Abstract.
49. Cercek B, Sharifi B, Barath P, Bailey L, Forrester JS. Growth factors in pathogenesis of coronary arterial restenosis. *Am J Cardiol* 1991; 68:24C-33C.
50. Simons M, Leclerc G, Safian R, Isner J, Weir L, Baim DS. Relation between activated smooth-muscle cells in coronary-artery lesions and restenosis after atherectomy. *N Engl J Med* 1993; 328:608-613.
51. Badimon L, Alfon J, Royo T, et al. Cell biology of restenosis post-angioplasty. *Z Kardiol* 1995; 84 Suppl 4:145-149.
52. Abedi H, Zachary I. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res* 1995; 30:544-556.
53. Jang Y, Lincoff M, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1591-1601.
54. MacLeod DC, Strauss BH, de Jong M, et al. Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:59-65.

55. Tyagi SC, Meyer L, Schmaltz RA, Reddy HK, Voelker DJ. Proteinases and restenosis in the human coronary artery: extracellular matrix production exceeds the expression of proteolytic activity. *Atherosclerosis* 1995; 116:43-57.
56. Nikol S, Isner JM, Pickering G, Kearney M, Leclerc G, Weir L. Expression of transforming growth factor- β 1 is increased in human vascular restenosis lesions. *J Clin Invest* 1992; 90:1582-1592.
57. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight T. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol* 1994; 144:962-974.
58. Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, Kearney MA, Isner JM. Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization. *J Clin Invest* 1993; 91:1469-1480.
59. Taylor AJ, Farb AA, Angello DA, Burwell LR, Virmani R. Proliferative activity in coronary atherectomy tissue. Clinical, histopathologic, and immunohistochemical correlates. *Chest* 1995; 108:815-820.
60. O'Brien ER, Alpers CE, Stewart DK, et al. Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circ Res* 1993; 73:223-231.
61. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995; 91:2703-2711.

62. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:267-274.
63. Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, et al. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med* 1996; 335:624-630.
64. Mehta VY, Jorgensen MB, Raizner AE, Wolde TG, Mahrer PR, Mansukhani P. Spontaneous regression of restenosis: an angiographic study [see comments]. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:696-702.
65. Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery [see comments]. *Circulation* 1995; 91:2793-2801.
66. Glagov S. Intimal hyperplasia, vascular modeling, and the restenosis problem. *Circulation* 1994; 89:2888-2891.
67. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis G. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316:1371-1375.
68. Phillips DF. New ideas on pathology of restenosis [news]. *JAMA* 1996; 275:1299-1300.

69. Kimura T, Kaburagi S, Tashima Y, et al. Geometric remodeling and intimal regrowth as mechanisms of restenosis: observations from serial ultrasound analysis of restenosis (SURE) trial. *Circulation* 1996; 92:I-76. Abstract.
70. Kimura T, Kaburagi S, Yokoi H, et al. Time course of vessel response after coronary angioplasty: final result of Serial Ultrasound REstenosis (SURE) study. *Circulation* 1996; 94:I-91. Abstract.
71. Sangiorgi G, Farb A, Carter AJ, Edwards WD, Virmani R, Schwartz RS. Contribution of neointima and adventitia to final lumen area in human coronary arteries treated by balloon angioplasty: a histopathologic analysis. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:200A. Abstract.
72. Andersen RA, Maeng M, Thorwest M, Falk E. Remodeling rather than neointimal formation explains luminal narrowing after deep vessel wall injury. *Circulation* 1996; 93:1716-1724.
73. Schwartz SM. How vessels narrow. *Z Kardiol* 1995; 84 Suppl 4:129-135.
74. Gertz SD, Gimple LW, Banai S. Geometric remodeling is not the principal pathogenetic process in restenosis after balloon angioplasty. Evidence from correlative angiographic-histomorphometric studies of atherosclerotic arteries in rabbits. *Circulation* 1994; 90:3001-3008.
75. Isner JM. Vascular remodeling. Honey, I think I shrunk the artery. *Circulation* 1994; 89:2937-2941.

76. Lowry SF. Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 1993; 128:1235-1241.
77. Kelso A. Cytokines: structure, function and synthesis. *Curr opin immunol* 1989; 2:215-225.
78. Blum A, Sclarovsky S, Shohat B. T lymphocyte activation in stable angina pectoris and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 1995; 91:20-22.
79. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987; 56:234-248.
80. Schols AM, Buurman WA, Brekel AJS, Dentener MA, Wouters EF. Evidence for a relation between metabolic derangements and increased levels of inflammatory mediators in a subgroup of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1996; 51:819-824.
81. Froon AH, Greve JW, Van der Linden CJ, Buurman WA. Increased concentrations of cytokines and adhesion molecules in patients after repair of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Surg* 1996; 162:287-296.
82. Gattorno M, Picco P, Buoncompagni A, et al. Serum p55 and p75 tumour necrosis factor receptors as markers of disease activity in juvenile chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55:243-247.

83. Salles G, Bienvenu J, Bastion Y, et al. Elevated circulating levels of TNF α and its p55 soluble receptor are associated with an adverse prognosis in lymphoma patients. *Br J Haematol* 1996; 93:352-359.
84. Keane HM, Sheron N, Goka J, Hughes RD, Williams R. Plasma inhibitory activity against tumour necrosis factor in fulminant hepatic failure. *Clin Sci Colch* 1996; 90:77-80.
85. Nakayama T, Hashimoto S, Amemiya E, Horie T. Elevation of plasma-soluble tumour necrosis factor receptors (TNF-R) in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 1996; 104:318-324.
86. Habib FM, Springall DR, Davies GJ, Oakley CM, Yacoub MH, Polak JM. Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy [see comments]. *Lancet* 1996; 347:1151-1155.
87. Scheurich P, Thoma B, Üger U, Pfizenmaier K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF α): induction of TNF receptors on human T cells and TNF α -mediated enhancement of T cells responses. *J Immunol* 1996; 138:1786-1790.
88. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *Am J Cardiol* 1990; 65:297-302.
89. Iocolano M, Altavilla D, Squadrito F, et al. Tumour necrosis factor mediates E-selectin production and leukocyte accumulation in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res* 1995; 31:281-288.

90. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1991; 138:447-453.
91. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:2844-2850.
92. Molossi S, Clausell N, Rabinovitch M. Reciprocal induction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta activity mediates fibronectin synthesis in coronary artery smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1995; 163:19-29.
93. Ito A, Sato T, Iga T, Mori Y. Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. *FEBS LETTERS* 1990; 269:93-95.
94. Clausell N, Molossi S, Sett S, Rabinovitch M. In vivo blockade of tumor necrosis factor-alpha in cholesterol-fed rabbits after cardiac transplant inhibits acute coronary artery neointimal formation. *Circulation* 1994; 89:2768-2779.
95. Flier JS, Underhill LH. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334:1717-1725.
96. Hale KK, Smith CG, Baker SL, et al. Multifunctional regulation of the biological effects of TNF-alpha by the soluble type I and type II TNF receptors. *Cytokine* 1995; 7:26-38.

97. Packer M. Is tumor necrosis factor an important neurohormonal mechanism in chronic heart failure. *Circulation* 1995; 92:1379-1382.
98. Brauner JS. Dosagem seqüencial de fator de necrose tumoral alfa, seus receptores solúveis e endotelina-1 em pacientes com choque séptico. Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1997.
99. Platz K, Mueller AR, Rossaint R, et al. Cytokine pattern during rejection and infection after liver transplantation - improvements in postoperative monitoring? *Transplantation* 1996; 62:1441-1450.
100. Mueller AR, Platz K, Haak M, et al. The release of cytokines, adhesion molecules, and extracellular matrix parameters during and after reperfusion in human liver transplantation. *Transplantation* 1996; 62:1118-1126.
101. Mizel SB. The interleukins. *FASEB J* 1989; 3:2379-2388.
102. Dinarello CA, Mier JW. Lymphokines. *N Engl J Med* 1987; 317:940-945.
103. Rubin LA, Nelson DL. The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann Intern Med* 1990; 113:619-627.
104. Miossec P, Elhamiani M, Edmonds-Alt X, Sany J, Hirn M. Functional studies of soluble low-affinity interleukin-2 receptors in rheumatoid synovial fluid. *Arthritis and Rheumatism* 1996; 33:1688-1694.

105. Moyer CF, Sajuthi D, Tulli H, Williams JK. Synthesis of IL-1 alpha and IL-1 beta by arterial cells in atherosclerosis. *Am J Pathol* 1991; 138:951-960.
106. Nilsson J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 1993; 27:1184-1190.
107. Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL. Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1995; 115:89-98.
108. Wang X, Feuerstein GZ, Clark RK, Yue TL. Enhanced leucocyte adhesion to interleukin-1 beta stimulated vascular smooth muscle cells is mainly through intercellular adhesion molecule-1. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1808-1814.
109. Galea J, Armstrong J, Gadsdon P, Holden H, Francis SE, Holt CM. Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1000-1006.
110. Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993; 328:113
111. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. In: Braunwald E, ed. *Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997:1105-1125.
112. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an

inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89:36-44.

113. Davies MJ, Woolf N. Atherosclerosis: What is it and why does it occur? *Br Heart J* 1993; 69:S3-S11.

114. Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme [see comments]. *Am J Pathol* 1995; 147:251-266.

115. Molossi S, Clausell N, Sett S, Rabinovitch M. ICAM-1 and VCAM-1 expression in accelerated cardiac allograft arteriopathy and myocardial rejection are influenced differently by cyclosporine A and tumour necrosis factor-alpha blockade. *J Pathol* 1995; 176:175-182.

116. Clausell N, Molossi S, Rabinovitch M. Increased interleukin-1b and fibronectin expression are early features of the development of the postcardiac transplant coronary arteriopathy in piglets. *Am J Pathol* 1993; 142:1772-1786.

117. Kurz RW, Graf B, Gremmel F, Wurnig C, Stockenhuber F. Increased serum concentrations of adhesion molecules after coronary angioplasty. *Clin Science* 1994; 87:627-633.

118. Neumann FJ, Richardt G, Schneider M, et al. Cardiac release of chemoattractants after ischaemia induced by coronary balloon angioplasty. *Br Heart J* 1993; 70:27-34.

119. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schomig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:819-824.
120. De Servi S, Mazzone A, Ricevutti G, et al. Granulocyte activation after coronary angioplasty in humans. *Circulation* 1990; 82:140-146.
121. Shimokawa H, Ito A, Fukumoto Y, et al. Chronic treatment with interleukin-1 beta induces coronary intimal lesions and vasospastic responses in pigs in vivo. The role of platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 1996; 97:769-776.
122. Braunwald E. Unstable angina. A classification. *Circulation* 1989; 80:410-414.
123. Ambrose JA, Winters SL, Arora RR, et al. Angiographic evolution of coronary artery morphology in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7:472-478.
124. Judkins MP. Selective coronary arteriography: a percutaneous transfemoral technique. *Radiology* 1967; 89:815
125. Stewart M, Male D. Immunological techniques. In: Roitt I, Brostoff J, Male D, editors. *Immunology*. 4th ed. London: Mosby, 1996:28.1-28.15.
126. Belmer Garcia Negrillo. Métodos não-paramétricos uni e multivariados. 1ed, 1992, p55-66.

127. Arbustini E, De Servi S, Bramucci E, et al. Comparison of coronary lesions obtained by directional coronary atherectomy in unstable angina, stable angina, and restenosis after either atherectomy or angioplasty. *Am J Cardiol* 1995; 75:675-682.
128. Castronuovo JJ, Guss SB, Mysh D, Sawhney MA, Wolff M, Gown AM. Cytokine therapy for arterial restenosis: inhibition of neointimal hyperplasia by gamma-interferon. *Cardiovasc Surg* 1995; 3: 463-8.
129. Annex BH, Denning SM, Channon KM, et al. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:619-622.
130. Garratt KN, Edwards WD, Kaufmann UP, Vliestra RE, Holmes DR. Differential histopathology of primary atherosclerotic and restenotic lesions in coronary arteries and saphenous vein bypass grafts: analysis of tissue obtained from 73 patients by directional atherectomy. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:442-448.
131. Nobuyoshi M, Kimura T, Ohishi H, et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17:433-439.
132. Prudêncio LAR, Centemero MP, Campos LF, et al. Eficácia da redilataço coronária em portadores de reestenose coronária da artéria descendente anterior. *Arq Bras Cardiol* 1995; 65:399-402.

133. Ribeiro JP, Quadros AS. Angioplastia coronária de lesões proximais da artéria descendente anterior. *Arq Bras Cardiol* 1995; 65:437-438.
134. McCullough PA, O'Neill WW, Hoffman M, et al. The "protective effect" of restenosis lesions on angiographic complications with new devices. *Circulation* 1996; 92:I-346. Abstract.
135. Malekianpour M, Doucet S, Théroux P, et al. A randomized trial for treatment of unstable angina in patients with restenosis post coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29:217A. Abstract.
136. Airaghi L, Lettino M, Manfredi MG, Lipton JM, Catania A. Endogenous cytokine antagonists during myocardial ischemia and thrombolytic therapy. *Am Heart J* 1995; 130:204-211.
137. Flugelman MY, Virmani R, Correa R, et al. Smooth muscle cell abundance and fibroblast growth factors in coronary lesions of patients with nonfatal unstable angina. A clue to the mechanism of transformation from the stable to the unstable clinical state. *Circulation* 1993; 88:2493-2500.
138. Vince DG, Tuzcu ME, Herderick EE, Bucknell KA, Cornhill JF. Inflammatory cell infiltration and activation in acute and chronic coronary syndromes. *Circulation* 1995; 92:I-161. Abstract.
139. Buja LM, Willerson JT. Role of inflammation in coronary plaque disruption. *Circulation* 1994; 89:503-505.

140. Fuster V, Lewis A. Conner memorial lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994; 90:2126-2146.
141. Weber KJ, Pathak A, Moses JW, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its role in the development of unstable coronary atherosclerotic plaques. *Circulation* 1995; 92:I-160. Abstract.
142. De Servi S, Mazzone A, Ricevutti G, et al. Clinical and angiographic correlates of leukocyte activation in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1146-1150.
143. Neri Serneri GG, Abbate R, Gori AM, et al. A transient intermittent lymphocyte activation is responsible for the instability of angina. *Circulation* 1992; 86:790-797.
144. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.
145. Arai K, Lee F, Miyajima A, et al. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 783-836.
146. Ledur A, Fitting C, David B, Harberger C, Cavaillon J. Variable estimates of cytokine levels produced by commercial ELISA kits: results using international cytokine standards. *J Immunol Meth* 1995; 186:171-179.
147. Hasdai D, Scheinowitz M, Leibovitz E, Sclarovsky S, Eldar M, Barak V. Increased serum concentrations of interleukin-1 β in patients with coronary artery disease. *Heart* 1996; 76:24-28.

148. Alexander RW. Inflammation and coronary artery disease. *N Engl J Med* 1994; 331:468-469.
149. Entman ML, Ballantyne CM. Inflammation in acute coronary syndromes. *Circulation* 1993; 88:800-803.
150. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, et al. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 108:626-635.
151. Komp DM, Shapiro E, McNamara. Soluble interleukin-2 receptor in childhood non-hodgkin's lymphoma. *Blood* 1988; 71: 1172-4.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO

Pacientes (Cateterismo Cardíaco)

Projeto: **ATIVIDADE IMUNOINFLAMATÓRIA NA REESTENOSE CORONÁRIA PÓS-ANGIOPLASTIA.**

O Sr (a) foi admitido neste hospital para realização de um cateterismo cardíaco por apresentar dor no peito. Estamos realizando um projeto de pesquisa sobre a aterosclerose coronária, que é a doença que provoca a deposição de placas de gordura nas artérias do coração, e gostaríamos de poder contar com sua ajuda. Como talvez o Sr (a) saiba, existem hoje em dia vários tratamentos para este problema, e um deles é a angioplastia coronária. Esta técnica consiste na desobstrução da artéria coronária comprometida pelas placas de gordura que se formaram pelo processo de aterosclerose. Isto é feito com um pequeno cateter com um balão em sua extremidade distal. Este cateter é colocado na artéria que tem o problema, o balão é inflado e após o isto o sangue pode voltar a fluir normalmente. Apesar de ser muito efetivo em abrir a artéria, em alguns casos esta obstrução volta alguns meses após o tratamento. O objetivo de nossa pesquisa é caracterizar as causas que levam a artéria a obstruir novamente. Assim, estamos estudando amostras do sangue de pacientes que têm aterosclerose para compará-las com aqueles que fizeram a angioplastia e tiveram uma recidiva da obstrução após a sua realização. Se concordar em colaborar com este estudo, coletaremos uma amostra de 10 ml de seu sangue imediatamente antes do início do seu cateterismo. Esta quantidade de sangue é muito pequena e sua retirada não provocará nenhum problema à sua saúde. Como para

fazer o cateterismo é necessária a colocação de um pequeno cateter na sua virilha ou dobra do cotovelo, não será necessário uma outra punção, e o Sr (a) não sentirá nenhuma dor ou desconforto adicional. A amostra de sangue obtido será analisada para a presença e quantificação de substâncias envolvidas no processo de inflamação e desenvolvimento de aterosclerose e também será realizado perfil lipídico.

Todas as informações obtidas neste estudo serão absolutamente confidenciais e para fins exclusivos de pesquisa. Se o Sr (a) não desejar participar, isto não provocará nenhuma mudança na qualidade de seu atendimento médico. Se desejar, o Sr (a) ou qualquer médico a seu critério poderá ter acesso aos resultados das dosagens que realizaremos. Obrigado pela atenção.

Eu, _____, aceito participar do estudo " Atividade Imunoinflamatória na reestenose coronária pós-angioplastia ", tendo sido informado previamente de suas características e potenciais riscos.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador responsável

Data -

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO

Pacientes (Angioplastia coronária / stent)

Projeto: ATIVIDADE IMUNOINFLAMATÓRIA NA REESTENOSE CORONÁRIA PÓS-ANGIOPLASTIA.

O Sr (a) foi admitido neste hospital para realização de uma angioplastia coronária ou colocação de " stent " por apresentar dor no peito. Nós estamos realizando um projeto de pesquisa justamente sobre a aterosclerose coronária, e gostaríamos de poder contar com sua ajuda. Como o Sr (a) sabe, a angioplastia coronária ou colocação de "stent" é um dos tratamentos mais empregados hoje em dia para este problema. A desobstrução da artéria coronária que é possibilitada por estas técnicas permite que o sangue possa voltar a fluir normalmente e irrigar o coração. No entanto, apesar deste procedimento ser muito efetivo em abrir esta artéria, em alguns casos esta obstrução pode voltar alguns meses após o tratamento. O objetivo de nossa pesquisa é caracterizar as causas que levam a artéria a obstruir novamente. Assim, estamos estudando amostras do sangue de pacientes que têm aterosclerose para compará-las com aqueles que fizeram ou farão a angioplastia e tiveram uma nova obstrução após a sua realização. Se concordar em colaborar com este estudo, coletaremos uma amostra de 10 ml de seu sangue imediatamente antes do início do seu procedimento. Esta quantidade de sangue é muito pequena e sua retirada não provocará nenhum problema à sua saúde. Como para fazer o cateterismo é necessária a colocação de um pequeno cateter na sua virilha, não será necessário uma outra punção, e o Sr (a) não sentirá nenhuma dor ou desconforto adicional. A amostra de sangue obtido será analisada

para a presença e quantificação de substâncias envolvidas no processo de inflamação e desenvolvimento de aterosclerose e também será realizado perfil lipídico.

Todas as informações obtidas neste estudo serão absolutamente confidenciais e para fins exclusivos de pesquisa. Se o Sr (a) não desejar participar, isto não provocará nenhuma mudança na qualidade de seu atendimento médico. Se desejar, o Sr (a) ou qualquer médico a seu critério poderá ter acesso aos resultados das dosagens que realizaremos. Obrigado pela atenção.

Eu, _____, aceito participar do estudo " Atividade Imunoinflamatória na reestenose coronária pós-angioplastia ", tendo sido informado previamente de suas características e potenciais riscos.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador responsável

Data -

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO

Indivíduos normais

Projeto: **ATIVIDADE IMUNOINFLAMATÓRIA NA REESTENOSE CORONÁRIA PÓS ANGIOPLASTIA.**

Estamos realizando um projeto de pesquisa no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e gostaríamos de poder contar com sua ajuda. A aterosclerose coronária é a doença que provoca a deposição de placas de gordura nas artérias que irrigam o coração, e o ataque cardíaco (infarto do miocárdio), sua principal consequência, é a maior causa de morte nos países industrializados. Existem vários tratamentos para esta doença, e, nos últimos anos, a angioplastia coronária tem sido cada vez mais utilizada. Esta técnica consiste na desobstrução da artéria coronária comprometida através de um pequeno cateter com um balão em sua extremidade distal. Este procedimento é muito efetivo em abrir a artéria, mas em alguns casos a obstrução volta alguns meses após o tratamento. O objetivo de nossa pesquisa é caracterizar as causas que levam a artéria a obstruir novamente. Assim, estamos estudando amostras do sangue de pacientes que realizaram a angioplastia, mas precisamos compará-los com pessoas normais para a identificação dos fatores mais alterados. Se concordar em colaborar com este estudo, retiraremos uma amostra de 10 ml de seu sangue através da punção de uma veia periférica. Este procedimento provoca dor e desconforto no local, e, eventualmente, uma pequena mancha roxa. A amostra de sangue obtido será

analisada para a presença e quantificação de substâncias envolvidas no processo de inflamação e desenvolvimento de aterosclerose e também perfil lipídico.

Todas as informações obtidas neste estudo serão absolutamente confidenciais e para fins exclusivos de pesquisa. Se desejar, o Sr (a) ou qualquer médico a seu critério poderá ter acesso aos resultados das dosagens. Obrigado pela atenção.

Eu, _____, aceito participar do estudo " Atividade Imunoinflamatória na reestenose coronária pós-angioplastia ", tendo sido informado previamente de suas características e potenciais riscos.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador responsável

Data -

ANEXO 4

Projeto: **ATIVIDADE IMUNOINFLAMATÓRIA NA REESTENOSE CORONÁRIA PÓS ANGIOPLASTIA.**

- 1) Data de aplicação - Entrevistador -
- 2) Nome -
- 3) Número do caso - 4) Número do prontuário -
- 5) Telefone -
- 6) Endereço -
- 7) Médico assistente -
- 8) Idade - 9) Sexo - 10) Raça -
- 11) Classe da angina instável -
- 12) Tempo de duração do início dos sintomas -
 - A) De angina estável (se houver) -
 - B) Da angina instável -
- 13) Último episódio de dor -
- 14) Características da dor-
 - A) Fator precipitante - Esforço () Repouso ()
Ansiiedade () Pós alimentar () Frio ()
Outros ()
 - B) Duração - Menos de 30 s () Menos de 1 min ()
Menos de 5 min () Menos de 15 min ()
Menos de 30 min () 30 min - 1 h ()
 - C) Localização - Retroesternal () Paraesternal E ()

Paraesternal D () Ombro E ()

Mandíbula () Pescoço ()

Tórax posterior () Epigástrico ()

Outros ()

D) Irradiação - Retroesternal () Paraesternal E ()

Paraesternal D () Ombro E ()

Mandíbula () Pescoço ()

Tórax posterior () Epigástrico ()

Outros ()

E) Caráter - Aperto () Ardência () Queimação ()

Pontada () Fisgada ()

Outros ()

F) Frequência -

G) Resposta ao Isordil SL - Não ()

Sim () Em segundos () Em menos de 5 min ()

Em menos de 15 min () Em mais de 15 min ()

H) Resposta aos antianginosos -

Nenhuma () Alívio parcial () Alívio total ()

15) História familiar de cardiopatia isquêmica (familiar em primeiro grau com IAM ou morte súbita (com menos de 50 anos para homens e menos de 60 anos para mulheres)

Sim () Não ()

16) História de hipertensão - Tempo -

17) História de diabetes - Tempo -

18) História de dislipidemia - Tempo -

19) Fumo - Tempo - Núm cig/dia -

Se interrompeu uso, tempo -

20) Medicações em uso (nome comercial e doses) -

21) Pressão arterial -

22) Frequência cardíaca -

23) Eletrocardiograma -

A) Sem dor - Ritmo -

Ondas Q patológicas (parede) -

Isquemia (parede) -

..... mm

Corrente de lesão subendocárdica (parede) -

..... mm

Corrente de lesão subepicárdica (parede) -

..... mm

B) Em vigência de dor - Ritmo -

Ondas Q patológicas (parede) -

Isquemia (parede) -

..... mm

Corrente de lesão subendocárdica (parede) -

..... mm

Corrente de lesão subepicárdica (parede) -

..... mm

24) Eletrocardiograma de esforço - Data do exame -

Bicicleta () Esteira ()

Protocolo -

Tempo - min VO2 máximo -

Núm. METS atingido - Duplo produto máximo -

FC máxima atingida - (..... % da prevista)

Sintomas - Angina () Arritmia () Cansaço ()

Outros -

.....

Alterações eletrocardiográficas - Sim () Não ()

Infradesnível ST - Descendente ()

Horizontal ()

Ascendente ()

..... mm Persistente - Sim () Não ()

Medicação em uso -

25) Cintilografia de esforço - Data do exame -

Bicicleta () Esteira ()

Protocolo -

Tempo - min VO2 máximo -

Núm. METS atingido - Duplo produto máximo -

FC máxima atingida - (..... % da prevista)

Sintomas - Angina () Arritmia () Cansaço ()

Outros -

.....

Alterações cintilográficas - Sim () Não ()

Descrever -

.....

.....
Medicação em uso -

26) Ecocardiograma - (conclusão) -

27) Cateterismo cardíaco - Data - Número do filme -

A) Segmento comprometido -

B) Gravidade da lesão -

28) Angioplastia coronária - Número filme -

A) Data -

B) Segmento dilatado -

C) Estenose inicial -

D) Estenose final -

E) Complicações -

29) Angioplastia coronária - Número filme -

A) Data -

B) Segmento dilatado -

C) Estenose inicial -

D) Estenose final -

E) Complicações -

30) Laboratório -

A) Proteína C Reativa-

B) Colesterol -

C) HDL -

D) Triglicerídeos -

E) Creatinina -

F) rs-IL 2 -

G) IL1-beta -

H) rs I-TNF -

I) rs 2 TNF -

31) Doenças associadas -

32) Outros dados -