

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

**Aspectos imunoinflamatórios e da matriz extracelular na
patogênese da macrovasculopatia diabética**

Dissertação de Mestrado

Autor: Paulo Sérgio Abunader Kalil

Orientadora: Professora Nadine Clausell

1998

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Nadine Clausell, pela oportunidade e incentivo, e por ela acreditar que sua linha de trabalho desenvolvida no Canadá possa ter continuidade em nosso meio. Fazer pesquisa sem a retaguarda técnica de outros centros não é fácil, orientar colegas sem a experiência na área é ainda mais difícil. Somente alguém com sua capacidade, determinação e sabedoria é capaz de “difundir ciência”. Agradeço pela compreensão e paciência dedicados, sei que ela o fez com carinho.

À acadêmica Andréia Biolo, por sua participação direta na elaboração desta dissertação. Foi sempre incansável. Apesar de sua juventude e do tempo que a separa da formatura já posso considerá-la “doutora”.

À Dr^a. Mirela de Azevedo que contribuiu com orientações tão importantes na realização deste trabalho.

À Dr^a. Silvana Molossi, pela ajuda na execução da pesquisa, justo em uma área onde suas publicações são tão valiosas e reconhecidas.

Aos Drs. Jorge Pinto Ribeiro e Waldomiro Manfrói, pela chance de poder ter participado do curso de pós-graduação, e pelo incentivo de ambos.

Ao Dr. João Carlos Prolla, pelo apoio logístico recebido no Laboratório de Citopatologia do HCPA. Também aos Drs. Vinícius e Luize, e ao acadêmico Roberto Müller.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do HCPA, onde foi executada grande parte deste trabalho, em especial ao Dr. Diego Uchoa, e aos técnicos Elhane Gomes, Jorge Lopes, Rosália Guimarães e Liane Cabreira.

Ao Serviço de Cirurgia Vascular do HCPA, pela ajuda imprescindível dos Drs Eduardo Marcon, Márcio Pasa e Marco Aurélio Grüdtner.

Aos Drs. Alexandre Quadros, Beatriz Seligman, Renato Lazaretti, Marco Torres e Paulo Caramori, pelo incentivo tão importante.

Ao Dr. Mário Wagner e , em especial, à Dr^a Lúcia Zimmer, pela orientação na análise estatística.

Aos meus pais, pelos exemplos de vida, dedicação e amor à família.

Ao meu filho Diogo, ainda bebê, mais um motivo de emoção e felicidade.

À mulher de minha vida, Ana Clara, pela compreensão e pelo imenso amor que vivemos.

ÍNDICE

SINOPSE.....	i
ABSTRACT.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
<i>Aterosclerose</i>	1
Aspectos gerais.....	1
Patogênese da aterosclerose convencional.....	2
Lipídeos e lesão oxidativa.....	3
Endotélio, moléculas de adesão e células inflamatórias.....	4
Células da musculatura lisa e citocinas.....	7
Matriz extracelular.....	8
<i>Macrovasculopatia diabética</i>	10
Conceito e características principais.....	10
Hiperinsulinemia, resistência à insulina e hiperglicemia.....	11
Dislipidemia.....	12
Hipercoagulabilidade.....	13
Glicação e oxidação de proteínas.....	14
Matriz extracelular e macrovasculopatia diabética.....	14
HIPÓTESE.....	16
OBJETIVOS.....	17
PACIENTES E MÉTODOS.....	18
<i>Delineamento de pesquisa</i>	18
<i>População em estudo</i>	18
<i>Coletas de dados clínicos e laboratoriais</i>	19
<i>Cálculo do tamanho da amostra</i>	20

<i>Preparação do material</i>	20
<i>Histologia</i>	20
<i>Imunoistoquímica</i>	21
<i>Análise estatística</i>	22
<i>Considerações éticas</i>	23
RESULTADOS	24
<i>Características clínicas e laboratoriais</i>	24
<i>Características histológicas</i>	26
<i>Características imunoistoquímicas</i>	31
Linfócitos e macrófagos.....	31
Fibronectina.....	34
Fator de necrose tumoral- α	36
DISCUSSÃO	41
<i>Características clínicas da população estudada</i>	41
<i>Características histológicas</i>	41
<i>Células inflamatórias</i>	42
<i>Fibronectina</i>	43
<i>Fator de necrose tumoral-α</i>	44
<i>Limitações do estudo</i>	45
<i>Síntese</i>	45
CONCLUSÕES	46
ESTUDOS FUTUROS	47
ANEXO I	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

SINOPSE

Introdução - A macrovasculopatia, um achado comum no diabetes melito, parece se desenvolver de uma forma acelerada, mas seus aspectos celulares e moleculares permanecem apenas parcialmente elucidados. Enquanto na aterosclerose comum e especialmente em outras formas de vasculopatia acelerada, mecanismos imunoinflamatórios participam no processo da doença, não está claro se isto acontece na vasculopatia diabética. Nós formulamos a hipótese de que a macrovasculopatia diabética, comparada com a aterosclerose clássica, está associada com aumento da expressão imunoinflamatória e acúmulo de matriz extracelular.

Objetivos - Este trabalho teve por objetivo analisar e comparar aspectos histológicos em lesões ateroscleróticas em secções de grandes artérias de pacientes com diabetes melito tipo 2 e de pacientes não-diabéticos submetidos a amputação de membros inferiores, e caracterizar, por imunoistoquímica, a presença de uma reação imunoinflamatória e o acúmulo de matriz extracelular, através da expressão de linfócitos T, macrófagos, fibronectina e fator de necrose tumoral- α .

Material e métodos - Neste estudo, foram analisados segmentos arteriais obtidos após amputação de membros inferiores, por doença aterosclerótica avançada, de pacientes com diabetes melito tipo 2 e de pacientes não-diabéticos. Características histológicas (extensão da proliferação intimal, celularidade, acúmulo de matriz extracelular, fragmentação da lâmina elástica interna e presença de cálcio e colesterol) foram semiquantitativamente graduadas nos dois tipos de lesão. Usando imunoistoquímica, através de análise semiquantitativa, também foram avaliados a presença de linfócitos T e macrófagos, o acúmulo de fibronectina, e a expressão do fator de necrose tumoral- α .

Resultados - Foram estudados 20 pacientes com diabetes melito tipo 2 (idade $68,9 \pm 10,9$ anos) e 16 pacientes não-diabéticos (idade $67,1 \pm 14,6$ anos). Achados histológicos destas lesões ateroscleróticas avançadas foram similares nos dois tipos de

lesões examinados. Por imunistoquímica, foi observado um padrão similar de infiltração de linfócitos T, com coloração positiva em 12/19 dos pacientes com diabetes melito e em 8/16 dos pacientes não-diabéticos, bem como de macrófagos (13/20 dos pacientes com diabetes melito e 10/16 dos pacientes não-diabéticos), e de acúmulo de fibronectina (16/20 dos pacientes diabéticos e 10/16 dos não-diabéticos). Entretanto, um aumento da expressão do fator de necrose tumoral- α foi observado em lesões de pacientes com diabetes melito tipo 2 (13/19 pacientes tinham coloração positiva) em relação às lesões de pacientes não-diabéticos (2/16 tinham coloração positiva), com $p < 0,003$ e razão de chance de 15,17 (IC 2,12-139,5).

Conclusões - Estes dados sugerem que o aumento da expressão do fator de necrose tumoral- α , observado nas lesões dos pacientes com diabetes melito tipo 2, pode refletir uma maior atividade inflamatória associada com o desenvolvimento das lesões vasculares nestes pacientes.

ABSTRACT

Background - Large vessel disease, a common feature of diabetes mellitus, appears to run an aggressive course but its cellular and molecular aspects remain partially elucidated. While in common atherosclerosis and especially in other forms of accelerated vasculopathy, immunoinflammatory mechanisms participate in the disease process, it is unclear whether this is present in diabetic vasculopathy. We hypothesized that diabetic macrovasculopathy, compared to classical atherosclerosis, is associated with increased immunoinflammatory features and matrix accumulation.

Objectives - To analyze and compare features of atherosclerotic lesions on vessel segments obtained from type 2 diabetic patients and nondiabetic patients submitted to limb amputation. Lesions were studied by histology and for the presence of an immunoinflammatory reaction by the expression of T cells, macrophages and tumor necrosis factor- α , and matrix accumulation by fibronectin expression in the two groups.

Material and methods - In this study, vessel segments obtained after lower limb amputation for advanced atherosclerotic disease, from type 2 diabetic patients and nondiabetic patients were analyzed. Histological characteristics (extent of intimal proliferation, cellularity, matrix accumulation, internal elastic lamin fragmentation, presence of calcium and cholesterol) were semiquantitatively graded in the two lesion types. Using immunohistochemistry, the presence of T cells and macrophages, accumulation of fibronectin, and expression of tumor necrosis factor- α were semiquantitatively assessed in the two groups.

Results - Twenty type 2 diabetic patients (age 68.9 ± 10.9 years) and 16 non-diabetic patients (age 67.1 ± 14.6 years) were studied. Histological features of advanced atherosclerotic lesions were similar in the two groups. By immunohistochemistry, a similar pattern of T cell infiltration (with positive staining in 12/19 diabetic patients and

in 8/16 of non-diabetic patients), and of macrophage infiltration (13/20 of diabetic patients and 10/16 of non-diabetic patients) were observed. Increased fibronectin accumulation was observed in 16/20 diabetic patients and in 10/16 non-diabetic patients. Nevertheless, increased expression of tumor necrosis factor- α was observed in diabetic patients lesions (13/19 had positive staining) whereas only 2/16 lesions from nondiabetic patients had positive staining ($p < 0.003$), with an odds ratio of 15.17 (CI 2.12-139.5).

Conclusions - These data suggest that increased expression of tumor necrosis factor- α observed in the diabetic patients lesions may reflect an enhanced inflammatory activity associated with the development of vascular lesions in type 2 diabetic patients.

ABREVIATURAS

LDL	-	Lipoproteína de baixa densidade
VLDL	-	Lipoproteína de muito baixa densidade
LDL-OX	-	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
IL	-	Interleucina
Fc	-	Fragmento de imunoglobulina cristalizável
LpL	-	Lipase lipoproteica
TNF-α	-	Fator de necrose tumoral alfa
CSF	-	Fator estimulador de colônias
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
MCP-1	-	Fator quimiotático monócito específico
MHC-II	-	Complexo de histocompatibilidade principal classe II
HLA-DR	-	Antígeno leucocítico humano
VLA-1	-	Antígeno de ativação muito tardia
IFN-γ	-	Interferon gama
cDNA	-	Ácido desoxirribonucleico complementar
VCAM-1	-	Molécula de adesão da célula vascular tipo 1
ICAM-1	-	Molécula de adesão intercelular tipo 1
FGF	-	Fator de crescimento de fibroblastos
TGF-β	-	Fator transformador de crescimento beta
AGE	-	Produtos finais de glicação avançada
HDL	-	Lipoproteína de alta densidade
PAI-1	-	Inibidor da ativação do plasminogênio
GAG	-	Glicosaminoglicano
TTOG	-	Teste de tolerância oral à glicose
HAS	-	Hipertensão arterial sistêmica

HE	-	Hematoxilina-eosina
PBS	-	Solução tampão fosfato
BSA	-	Albumina sérica humana
EI	-	Espessamento intimal
Cel.	-	Celularidade
LEI(F)	-	Fragmentação da lâmina elástica interna
Mz	-	Matriz extracelular
RNA	-	Ácido ribonucleico
IC	-	Intervalo de confiança

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela I	Caraterísticas clínicas e laboratoriais dos grupos	25
Tabela II	Achados histológicos dos pacientes com diabete melito	27
Tabela III	Achados histológicos dos pacientes não-diabéticos	28
Tabela IV	Achados histológicos dos grupos	29
Tabela V	Achados de imunoistoquímica dos pacientes com diabete melito	38
Tabela VI	Achados de imunoistoquímica dos pacientes não-diabéticos	39
Tabela VII	Achados de imunoistoquímica dos grupos	40
Figura 1	Fotomicrografia de coloração tricromo em corte transversal de segmento arterial	30
Figura 2	Fotomicrografia de coloração HE em corte transversal de segmento arterial	30
Figura 3	Fotomicrografia da detecção de linfócitos T por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação alta	32
Figura 4	Fotomicrografia da detecção de linfócitos T por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação ausente	32
Figura 5	Fotomicrografia da detecção de macrófagos por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação alta	33
Figura 6	Fotomicrografia da detecção de macrófagos por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação ausente	33
Figura 7	Fotomicrografia da detecção de fibronectina por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação alta	35

Figura 8	Fotomicrografia da detecção de fibronectina por imunistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação leve	35
Figura 9	Fotomicrografia da detecção de TNF- α por imunistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação alta	37
Figura 10	Fotomicrografia da detecção de TNF- α por imunistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação ausente	37

INTRODUÇÃO

Aterosclerose

Aspectos gerais

A aterosclerose é o principal processo na patogênese do infarto agudo do miocárdio e de infarto cerebral, gangrena e perda de função nas extremidades. Esta pode ser definida como uma resposta imunoinflamatória à lesão química ou física do endotélio, consistindo na formação de lesões fibrogordurosas e fibrosas que acometem a íntima arterial focalmente(1). A distribuição da doença aterosclerótica não é uniforme. Enquanto algumas artérias são poupadas, outras, como as coronárias, são de alto risco. Num mesmo indivíduo, o grau de aterosclerose coronária, cerebral e carotídea é freqüentemente variável(2).

Um importante achado das lesões precoces (estrias gordurosas) ou das lesões mais avançadas (placa fibrosa) é a consistente topografia focal, particularmente em relação a locais de divisão de fluxo, ramificações e áreas de curvatura arterial. Esta distribuição focal das lesões ateroscleróticas sugere um papel de forças hemodinâmicas na iniciação ou progressão da doença. As lesões desenvolvem-se preferencialmente em áreas de baixo estresse de cisalhamento, onde há um prolongado tempo de contato das moléculas, especialmente lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e células como monócitos e plaquetas(3). Também é proposto que uma deficiência localizada de nutrientes como glicose e oxigênio nestas áreas críticas da árvore arterial possam ser a causa principal da disfunção endotelial e iniciação da lesão(4). A análise imunohistoquímica destas lesões revela que as estrias gordurosas são lesões ricas em lipídeo, consistindo primariamente de ésteres de colesterol englobados por macrófagos, alguns linfócitos, e mesmo raramente por células da musculatura lisa. A placa fibrosa

consiste quase que exclusivamente de células da musculatura lisa com alguns macrófagos e grande acúmulo de componentes da matriz extracelular. As áreas de lesão avançada são formadas por camadas de células da musculatura lisa que proliferaram, macrófagos contendo lipídeos e alguns linfócitos T, cristais de colesterol, debris necróticos e calcificação(5).

Sintomas clínicos decorrentes da aterosclerose dependem de vários mecanismos. O processo primário de acúmulo lipídico e a produção de matriz extracelular por células da musculatura lisa podem levar ao aumento do volume de uma ou mais placas até a obstrução da luz do vaso e limitação do fluxo sanguíneo. A placa também pode entrar em uma fase de instabilidade e ser complicada pela formação de um trombo. Além disto, a alteração do tônus vascular na artéria afetada favorece vasoconstrição, e a atrofia e destruição da média secundárias à aterosclerose intimal podem levar à formação de aneurismas(2).

Patogênese da aterosclerose convencional

A hipótese de resposta à lesão, proposta por Ross, sugere a participação de diferentes fatores de risco levando à disfunção endotelial, o que pode provocar uma série de interações celulares que culminam nas lesões de aterosclerose, incluindo uma fixação aumentada de lipoproteínas na artéria, o aparecimento de glicoproteínas específicas de adesão na superfície das células endoteliais, com migração de monócitos e linfócitos T através do endotélio, mediada pela influência de moléculas reguladoras de crescimento e quimioatrativos, liberados por células endoteliais, inflamatórias e musculares lisas. A progressão da lesão é marcada pelo acúmulo de camadas de células musculares e macrófagos cheios de lipídeos, além da síntese de colágenos, elastina e proteoglicanos(1).

Muitos estudos têm sido realizados nesta área, e o resultado é o marcado progresso na identificação de diferentes tipos celulares e várias moléculas que estão envolvidas na aterogênese.

Lipídeos e lesão oxidativa

As já citadas áreas propensas ao desenvolvimento de lesões ateroscleróticas são caracterizadas por um elevado influxo intimal e pela acúmulo de proteínas plasmáticas e monócitos, o que é marcadamente acelerado na presença de hipercolesterolemia(3,6). Além disso, é sabido que níveis plasmáticos elevados de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e LDL, bem como o aumento dos níveis destas lipoproteínas no espaço intersticial da íntima arterial, levam a um maior tempo de permanência da lipoproteína e a um aumento da probabilidade de oxidação oportunística, tanto pelo endotélio adjacente como por células da musculatura lisa(7,8).

A modificação oxidativa da LDL é iniciada pela peroxidação das cadeias duplas nos ácidos graxos poli-insaturados. Neste processo estão envolvidos oxigenases celulares, especialmente a 15-lipoxigenase e o ânion superóxido, resultando na alteração e fragmentação da molécula da apoproteína-B100 da LDL(9-11).

A LDL modificada oxidativamente apresenta propriedades físico-químicas e biológicas diferentes da LDL nativa, como o aumento de sua densidade e de sua carga negativa, alterando radicalmente seu estado passivo, induzindo quimiotaxia para monócitos circulantes e inibindo a motilidade de macrófagos teciduais. Além disso, a LDL oxidada (LDL-OX) é citotóxica para células endoteliais e induz a síntese de interleucina-1 β (IL-1 β) e a ativação de linfócitos T. A ingestão aumentada de LDL-OX pelos macrófagos, principalmente via receptor de varredura, não é regulada pelo conteúdo lipídico intracelular, tornando o macrófago estufado por excesso de gordura e originando as células espumosas(9).

As lipoproteínas alteradas também podem ser englobadas pelos macrófagos através de complexos lipoproteína-anticorpo, mediados pelo receptor Fc (fragmento de imunoglobulina cristalizável)(12), ou por fagocitose não específica, após agregação da lipoproteína induzida por oxidação(13). Os macrófagos secretam vários produtos que podem influenciar a ingestão de lipoproteínas, entre eles a lipase lipoproteica (LpL), radicais livres de oxigênio e proteases que podem promover agregação e subsequente fagocitose(14).

A geração de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres por macrófagos ativadas, células endoteliais e da musculatura lisa é de grande importância na aterogênese. Os radicais livres gerados oxidativamente modificam lipoproteínas, presumidamente no interstício intimal. Nesta seqüência de eventos, a molécula de LDL-OX gerada é citotóxica e juntamente com a influência direta de radicais livres é responsável por necrose das células espumosas e desenvolvimento do core lipídico extracelular(3,9,15).

A LDL-OX também pode alterar a expressão de genes e a secreção de vários fatores de crescimento e citocinas pelos macrófagos, como por exemplo o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a IL1 β , o fator estimulador de colônias (CSF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator quimiotático monócito-específico-1 (MCP-1)(16,17).

Apesar de fortes evidências suportarem a existência de LDL-OX *in vivo*, o papel da oxidação de lipoproteína no desenvolvimento da lesão foi demonstrado somente de maneira indireta, através de estudos indicando que certos anti-oxidantes impedem a progressão de lesões arteriais(16,18).

Há fortes indícios sugerindo um papel do sistema imune na aterosclerose. Neste sentido, lipoproteínas modificadas também parecem ter importância, já que podem ser altamente imunogênicas e estimular células imunocompetentes a secretar fatores vasoativos e citocinas(18,19). Por outro lado, uma variedade de citocinas agem em diferentes receptores, podendo afetar múltiplos processos e assim alterar o metabolismo e aumentar o nível sérico dos lipídeos(20).

Endotélio, moléculas de adesão e células inflamatórias

O recrutamento intimal de monócitos desempenha um papel vital na aterogênese, e em parte, reflete a natureza inflamatória da doença. Múltiplos aspectos contribuem para o processo deste recrutamento, incluindo ativação endotelial, síntese de várias moléculas de adesão celular e migração transendotelial, mediada por fatores

quimiotáticos, como o MCP-1 e LDL-OX. É importante salientar que a expressão e secreção de MCP-1 por células da musculatura lisa e células endoteliais também podem ser induzidos por LDL minimamente oxidado(3,19,21).

Os monócitos sofrem um processo complexo de ativação e diferenciação, principalmente na íntima arterial, onde tornam-se maiores com um auge de atividade secretória de enzimas hidrolíticas e proteolíticas, complemento, apoproteína E e LpL (3,21). Embora os radicais livres de oxigênio também sejam gerados por células da musculatura lisa e células endoteliais, é sabido que o macrófago intimal é o seu principal produtor.

A análise de secções de placas ateroscleróticas usando anticorpos monoclonais específicos mostra que o infiltrado mononuclear é composto de macrófagos e linfócitos T(5,22). O processo inflamatório secundário torna-se evidente em lesões avançadas. Infiltrado linfocítico é relatado inclusive na adventícia de artérias com aterosclerose avançada. Hansson e colaboradores, ao estudarem a placa aterosclerótica através de imunohistoquímica, demonstraram a combinação de linfócitos T, macrófagos, e células endoteliais expressando antígenos do Complexo de Histocompatibilidade Principal classe II (MHC-II), o que indica uma resposta local imune contribuindo para o desenvolvimento da doença. Além disso, uma alta frequência de antígeno leucocítico humano (HLA-DR) e do antígeno de ativação muito tardia (VLA-1), expressos em linfócitos T, e uma expressão menos marcante do receptor para IL-2, similar ao que ocorre em condições inflamatórias, podem ser marcadores da ativação destas células. Muitas delas contêm o interferon- γ (IFN- γ), sugerindo que a ativação é acompanhada pela síntese desta citocina, originada por células T ativadas(23,24). A VLA-1 é um membro da subfamília β 1 da família das integrinas, uma molécula de adesão celular, que serve como receptor celular para colágeno e laminina, ancorando a célula à matriz extracelular, e também é importante no extravasamento e acúmulo local de linfócitos na resposta inflamatória(25).

As células espumosas contendo colesterol, marca registrada na aterosclerose, são macrófagos, na maior parte das vezes derivados de monócitos da circulação sanguínea.

A capa fibrosa que envolve o núcleo lipídico é dominada por células da musculatura lisa, mas contém também um número substancial de linfócitos T e macrófagos. Uma análise da composição proteica da superfície destas células mostra que elas diferem das células correspondentes no sangue e que muitas delas estão em estado ativado. Estudos usando anticorpos monoclonais e DNA complementar (cDNA) mostraram que muitas citocinas derivadas de células imunes são produzidas na placa aterosclerótica(17,23).

As citocinas derivadas dos macrófagos e linfócitos também podem regular o metabolismo celular, tendo-se como exemplo o metabolismo do colesterol nos macrófagos, onde a expressão do receptor de varredura está sob controle de citocinas. Tanto o IFN- γ quanto o TNF- α , que é produzido por células T e macrófagos, podem desativar o gene para o receptor de varredura, inibindo a transformação do macrófago em uma célula espumosa (26,27).

As células do endotélio vascular têm um papel ativo no processo de infiltração intersticial leucocítica que caracteriza as respostas inflamatórias crônicas. Este processo parece ser iniciado por células endoteliais, as quais influenciadas por mediadores inflamatórios expressam várias moléculas de adesão na superfície. Ainda caracterizando este aspecto de ativação endotelial, Ginbrone e colaboradores(28) demonstraram em aortas de coelhos que uma dieta rica em lipídeos também é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão no endotélio. Estas interagem com contra-receptores nos leucócitos circulantes e provocam sua adesão ao endotélio vascular com a primeira etapa na migração dos leucócitos nos tecidos. Estudos com células endoteliais em cultura humana mostraram que IL-1 β , TNF- α e IL-4 estão entre os mediadores inflamatórios que podem promover a expressão da molécula de adesão da célula vascular tipo 1 (VCAM-1) em células endoteliais de veia umbilical humana (29,30). Além disso, expressão da molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1) e da VCAM-1 ocorre em artérias coronárias e no miocárdio em trasplante cardíaco heterotópico em coelhos, promovendo adesão e migração transendotelial de células inflamatórias. Entretanto, o bloqueio seletivo do TNF- α , com o uso de um receptor solúvel, diminuiu significativamente a incidência e a severidade de arteriopatia coronária neste

modelo(31,32), o que ilustra as similaridades entre um processo primariamente imunoinflamatório e o desenvolvimento de aterosclerose.

Células da musculatura lisa e citocinas

A migração e a proliferação das células da musculatura lisa na íntima arterial participam na progressão da aterosclerose. Diversos fatores interagem, promovendo a síntese de colágeno, elastina e proteoglicanos na placa, o que contribui para a progressão da lesão. Por exemplo, dados da literatura indicam que o fator de crescimento derivado de plaquetas pode promover quimiotaxia para a migração de células da musculatura lisa em direção à íntima, enquanto o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) parece aumentar a replicação das células da musculatura lisa (19).

Citoquinas produzidas por células inflamatórias, endoteliais e da musculatura lisa modulam a interação entre células imunoreativas circulantes e o endotélio vascular, através do aumento da expressão e ativação de receptores e contra-receptores. Podem também regular vários processos celulares, como proliferação de células da musculatura lisa, ativação de linfócitos T, e também produção de proteínas da matriz extracelular. Entretanto, os linfócitos T também podem ter um papel oposto ao produzir IFN- γ , a qual é uma citocina inibidora do crescimento endotelial e das células da musculatura lisa (33).

Por apresentar várias funções biológicas, a IL-1 tem um papel importante na patologia vascular ao modular o metabolismo de LDL, regular proliferação de célula muscular lisa, estimular a adesão de leucócitos ao endotélio aumentando a permeabilidade endotelial, induzir a produção de glicosaminoglicanos pelas células endoteliais e promover atividade pró-coagulante(34). Clausell e colaboradores demonstraram a presença de uma resposta imunoinflamatória em coronárias de corações transplantados de porcos, o que era associado à acúmulo de fibronectina e ao aumento da expressão de IL-1 β e TNF- α (34-36) e que o efeito do TNF- α parece ser mediado via IL-1 β (37).

Entre as várias citocinas existentes, o TNF- α parece ser o mais complexamente envolvido na patogênese da aterosclerose. O TNF- α media a resposta imunológica de células T no processo de rejeição coronária em transplante cardíaco, tem um papel na ativação endotelial, aumenta a expressão de moléculas de adesão, induz angiogênese e a formação de outras citocinas, especialmente a IL-1(32). Além disso, estudos *in vitro* indicam que o TNF- α pode iniciar uma cascata de citocinas por meio da indução de IL-1 β e do aumento da síntese de fibronectina por células da musculatura lisa em artéria coronária de porcos(38).

Desta forma, estudos *in vivo* e *in vitro* dos efeitos das citocinas nas células vasculares demonstram que as citocinas do sistema imune podem modular respostas vasculares e influenciar no processo aterosclerótico. É possível que o monitoramento da resposta imune possa ser útil no diagnóstico e na avaliação do processo aterosclerótico, e que a interferência com uma rede de citocinas possa ser usada para inibir ou reverter os processos patológicos na parede do vaso (33).

Matriz extracelular

As proteínas mais importantes da matriz extracelular são o colágeno, os proteoglicanos e a fibronectina. Este conjunto de componentes confere força mecânica aos tecidos e mantém a placa como uma estrutura estável(2). Os processos que envolvem adesão celular, migração e diferenciação, proliferação e interação celular com a matriz extracelular, são influenciados por uma complexa interação de citocinas e peptídeos reguladores de crescimento.

Estudos de Boudreau e colaboradores, sobre o papel de diferentes componentes da matriz extracelular na proliferação intimal em modelos experimentais, demonstraram que no ductus arteriosus existe aumento da síntese de fibronectina, e isto foi associado com uma maior migração de células da musculatura lisa (39). Estas células também expressavam maior densidade do receptor para motilidade mediada pelo ácido hialurônico, um glicosaminoglicano presente na matriz extracelular (40). Também no

ductus arteriosus, foi demonstrado que o fator de crescimento β (TGF- β) regula o aumento da produção, pelas células endoteliais, de matriz extracelular associada ao espessamento intimal(41). Em estudos posteriores usando coelhos pós-transplante cardíaco, foi demonstrado que o bloqueio *in vivo* de TNF- α usando receptores solúveis desta citocina causou uma diminuição do aparecimento de lesões coronarianas, associada a menor reação inflamatória do vaso e a um menor acúmulo de fibronectina na matriz extracelular(32). Os mesmos autores, comparando espécimes obtidos de aterectomia de pacientes com doença coronariana primária e de lesões reestenóticas, demonstraram uma reação semelhante, com expressão de TNF- α e acúmulo de fibronectina na matriz extracelular, ambos aumentados nas lesões reestenóticas(42).

Navab e colaboradores, usando co-culturas de células endoteliais e da musculatura lisa de aorta, demonstraram que o aumento da síntese de fibronectina era parcialmente dependente de IL-1 e IL-6, confirmando a relação entre células inflamatórias, citocinas e um aumento de proteínas da matriz extracelular no espessamento intimal(43). Já Molossi e colaboradores, em modelo semelhante, confirmam a importância da produção de fibronectina mediada por citocinas, que atuam na migração transendotelial de linfócitos(44).

Libby e colaboradores, estudando arteriopatia pós-transplante cardíaco em humanos, sugerem a presença de uma reação imunoinflamatória na parede arterial, com a ativação de células endoteliais expressando antígenos MHC-II. Em consequência, a proliferação linfocitária e a liberação sustentada de citocinas levariam à proliferação e migração de células da musculatura lisa para o subendotélio e ao acúmulo de matriz extracelular, contribuindo para o espessamento intimal(45).

Portanto, pode-se considerar que as proteínas da matriz extracelular, além de exercerem um papel regulador no processo aterosclerótico, podem ser influenciadas por mediadores biológicos imunes como as citocinas, estabelecendo uma interação com elementos inflamatórios participantes do processo aterosclerótico.

Macrovasculopatia diabética

Conceito e características principais

A presença de diabetes melito, tanto do tipo 1 como do tipo 2, aumenta o risco para o desenvolvimento de aterosclerose coronária, cerebral e em artérias periféricas(46). Além disso, a aterosclerose é a maior complicação do diabetes melito, contribuindo para 60% da mortalidade em pacientes diabéticos. No estudo Framingham, a mortalidade por infarto do miocárdio foi 2,5 vezes maior nos pacientes diabéticos quando comparados aos não-diabéticos(47).

Embora as lesões ateromatosas em pacientes diabéticos pareçam ser histologicamente idênticas às observadas em população não-diabética, elas são mais extensas e mostram um ritmo de progressão acelerada(46). Pacientes portadores de diabetes melito se caracterizam por apresentarem uma concomitância de fatores de risco para doença vascular, mas dados de Stander e colaboradores indicam que isto não justifica o aumento total na morbidade e mortalidade cardiovascular presentes no diabetes melito(48). É possível, então, que possam haver aspectos distintos próprios da macrovasculopatia diabética envolvidos nos mecanismos patogênicos da doença.

As alterações estruturais na parede arterial de pacientes diabéticos, como as descritas por Ledet e colaboradores, são de grande importância para o entendimento da patogênese da macrovasculopatia entre estes pacientes(49). Deve-se mencionar que uma das propriedades comuns aos inúmeros fatores que favorecem o desenvolvimento da aterosclerose em diabéticos é que eles contribuem para a disfunção endotelial (50). Também há evidências de que um mecanismo imunoinflamatório possa desempenhar um papel importante(51,52). Por exemplo, o TNF- α tem sido recentemente implicado em mecanismos de resistência à insulina, pela inibição do receptor de atividade insulínica(53), o que sugere um papel desta citocina no estado hiperglicêmico, sabidamente causador de lesão endotelial. Contudo, ainda não está claro se estas

características imunoinflamatórias, celulares e moleculares estão presentes na lesão aterosclerótica da macrovasculopatia diabética.

Hiperinsulinemia, resistência à insulina e hiperglicemia

A resistência à insulina e a hiperinsulinemia exercem papéis centrais na patogênese da aterosclerose no diabetes melito. O hiperinsulinismo endógeno tem recebido atenção como possível fator de risco cardiovascular, podendo ser pró-aterogênico por modular receptores lipoproteicos e a migração e proliferação de células da musculatura lisa, por levar ao aumento local de síntese de colesterol, ou por diminuir o efluxo do colesterol(54).

Em pacientes com diabetes melito tipo 2 os níveis de insulina endógena estão aumentados, e nos pacientes com diabetes melito tipo 1 os níveis de insulina periférica circulantes estão aumentados como resultado de injeções intermitentes de insulina exógena. Interessantemente, os níveis circulantes em jejum de insulina ou peptídeo-C entre pacientes diabéticos com cardiopatia isquêmica são maiores do que nos pacientes diabéticos sem cardiopatia(55,56).

A hiperinsulinemia em pessoas normais e em pacientes com diabetes melito tipo 2 parece estar ligada à obesidade. As consequências metabólicas adversas da obesidade, incluindo a hiperinsulinemia, estão relacionadas à distribuição regional da gordura corporal. O aumento da adiposidade visceral abdominal está associado com resistência à insulina e hiperinsulinemia compensatória(57,58). Outros autores, porém, propõem que o diabetes melito tipo 2 esteja associado à resistência à insulina e à hiperinsulinemia, independentemente do aumento da gordura abdominal(59).

Há evidências de que a insulina pode afetar diretamente a parede arterial, produzindo alterações compatíveis com o processo aterogênico. Efeitos diretos da insulina na parede arterial incluem a promoção de proliferação de células da musculatura lisa(60) e acúmulo de ésteres de colesterol. A insulina juntamente com outros fatores de crescimento pode aumentar o depósito de colesterol intracelular pelo aumento da

liberação de LDL e aumentar a biosíntese endógena de colesterol, tornando-o disponível para síntese de novas membranas no processo de proliferação celular(37). Isto sugere que a insulina e outros fatores de crescimento tenham o potencial de promover acúmulo celular de ésteres de colesterol, particularmente em estados onde as células são estimuladas, mas não podem proliferar normalmente, como pode ser o caso do diabetes melito (29) .

A hiperglicemia pode ser considerada como um fator causal no desenvolvimento das complicações vasculares do paciente diabético. Vários mecanismos podem explicar os efeitos adversos da glicose sobre as células vasculares: a glicação não-enzimática, as alterações sorbitol-mioinositol, as alterações do potencial redox, e a ativação do diacilglicerol-proteínaquinase C(61).

Além disso, a hiperglicemia altera a produção de matriz na célula endotelial, o que pode contribuir para o espessamento generalizado da membrana basal que ocorre no diabetes melito. Também é demonstrado que altas concentrações de glicose aumentam a produção endotelial de colágeno do tipo IV e fibronectina, aumentando a atividade das enzimas envolvidas na síntese de colágeno(62).

Dislipidemia

Há evidências de que triglicerídeos elevados sejam um fator de risco independente no diabetes melito. Um estudo prospectivo com 11 anos de duração, realizado por Fontbonne e colaboradores, indica que níveis altos de triglicerídeos entre pacientes diabéticos aumentam o risco destes desenvolverem cardiopatia isquêmica(63).

A hipertrigliceridemia no diabetes pode estar associada a várias alterações nas lipoproteínas circulantes. Achados *in vitro* indicam que o aumento na concentração de VLDL e quilomicrons remanescentes, vistos nos diabéticos, são potencialmente capazes de aumentar a deposição de ésteres de colesterol nas células da parede arterial(64,65).

Tanto a LDL como a HDL podem se tornar ricas em triglicerídeos como efeito direto da hipertrigliceridemia, mas também é verdade que o diabetes melito sem hipertrigliceridemia não está associado com o enriquecimento do LDL por triglicerídeos.

Em cultura, a LDL rica em triglicérido apresenta uma interação alterada com fibroblastos, havendo ligação diminuída e uma redução na capacidade de internalizar o colesterol, levando a um prejuízo na regulação da síntese do colesterol(66).

Há evidências de que o diabetes melito é acompanhado por aumento da peroxidação lipídica ou oxidação de lipoproteínas, e que hiperglicemia e oxidação acelerada estão relacionados. Por outro lado, é demonstrado, *in vitro*, que a peroxidação lipídica está aumentada na presença da glicose(67), e que a produção de superóxidos por células mononucleares está aumentada em pacientes com hipertrigliceridemia, sendo estes diabéticos ou não (68).

Hipercoagulabilidade

O diabetes melito se associa a um estado trombogênico, e vários são os fatores relacionados a esta característica.

A hipertrigliceridemia está associada com um aumento da atividade coagulante de fatores trombogênicos, como o fator VII e o fator X, e da concentração do inibidor da ativação do plasminogênio (PAI-1). Estas alterações, em associação com o bem conhecido aumento da agregação plaquetária *in vitro*, contribuem para um estado pró-coagulante no diabetes melito. A lipoproteína (a) pode bloquear a ação do plasminogênio em estimular a lise do coágulo e também pode contribuir para um estado de hipercoagulabilidade(69).

Além disso, pacientes diabéticos apresentam aumento dos níveis circulantes do fator de von Willebrand e suas plaquetas produzem mais tromboxane, tendendo à agregação mais rapidamente se comparadas com plaquetas de pacientes não diabéticos, o que pode contribuir para o estado trombogênico(70).

Glicação e oxidação de proteínas

Há um número de modificações nas lipoproteínas nos pacientes diabéticos que afetam as interações celulares. A glicosilação ou glicação de lipoproteínas ocorre no diabetes melito, e o LDL glicado pode ser funcionalmente anormal, sendo imunogênico e podendo aumentar o acúmulo de ésteres colesterol nos macrófagos(71,72).

Há vários fatores que promovem a oxidação de lipoproteínas no diabetes. A glicosilação auto-oxidativa ou glico-oxidação está aumentada na presença de concentrações altas de glicose. Também um aumento na produção de radicais livres e peroxidação lipídica desempenham seus papéis e podem contribuir para a aterogênese(73).

No diabetes melito, a glicação não-enzimática de certas proteínas leva à formação de produtos finais de glicação avançada (AGE), os quais, na parede arterial, podem modular a expressão de fatores de crescimento e citocinas bem como aspectos da matriz extracelular, tudo isto estimulando aterogênese(74,75). Mais especificamente, os AGE interagem com células inflamatórias e induzem a síntese e a liberação de citocinas como IL-1 β , TNF- α , e PDGF(76). Além disso, é demonstrado que a oxidação de LDL está aumentada no estado diabético, possivelmente devido a atividade de AGE(77), o que favorece a adesão de células inflamatórias à superfície endotelial(73).

Matriz extracelular e macrovasculopatia diabética

Alterações estruturais nos componentes da matriz extracelular parecem desempenhar um papel no desenvolvimento de doença arterial em pacientes com diabetes melito.

A fibronectina é uma glicoproteína importante para a comunicação e ligação entre células e componentes da matriz extracelular, e também para o crescimento e migração de células, processos fundamentais na aterogênese. Um estudo realizado em aortas obtidas de autópsia de pacientes com diabetes melito e de pacientes não-diabéticos, mostrou uma presença aumentada de fibronectina na íntima dos vasos de pacientes

diabéticos em relação aos não-diabéticos, especialmente em áreas sem placa aterosclerótica visível macroscopicamente. Contudo, somente nos pacientes com diabetes melito tipo 1 quantidades aumentadas desta glicoproteína foram aparentes em áreas com placa(49). Usando o mesmo modelo, Ledet e colaboradores também demonstraram aumento da concentração de colágeno tipo IV na túnica média em áreas com ou sem placa, ao comparar espécimes de pacientes diabéticos e não-diabéticos(78). Também foram demonstradas alterações do conteúdo de glicosaminoglicanos (GAG) na túnica média de aorta de pacientes diabéticos, analisando-se áreas normais e áreas com placas fibrosas. Além disso, pacientes com diabetes melito tipo 1 apresentam um aumento na concentração de ácido hialurônico na túnica média normal quando comparados com pacientes não-diabéticos. Quando a túnica média de áreas com placa aterosclerótica foi comparada a de áreas normais da mesma amostra, foi evidente entre pacientes diabéticos e não-diabéticos, o significativo aumento da proporção de dermatan sulfato e a redução do ácido hialurônico. Os dados concordam com a noção de que a parede arterial é sujeita a diferentes processos patológicos no diabetes melito: um de aterosclerose clássica com alterações nos GAG similares aos pacientes não-diabéticos, e outro, visto em áreas sem placas, com diferentes alterações nos GAG(79). Isto reforça, pelo menos parcialmente, o conceito da presença de uma doença macrovascular em diabéticos diferente da doença aterosclerótica convencional.

Estes resultados indicam que pacientes diabéticos desenvolvem alterações estruturais no tecido conjuntivo de suas artérias, consistentes com a hipótese de uma macroangiopatia diabética. No entanto, o papel funcional de proteínas da matriz extracelular e seus mecanismos regulatórios em relação à presença ou não de citocinas continua relativamente inexplorado no estado diabético.

HIPÓTESE

A macrovasculopatia em pacientes portadores de diabetes melito tipo 2 está associada com uma reação imunoinflamatória mais proeminente na lesão aterosclerótica vascular, com um maior acúmulo de células inflamatórias e citocinas, e de um componente da matriz extracelular, a fibronectina, quando comparados às lesões em pacientes não-diabéticos.

OBJETIVOS

1. Comparar semiquantitativamente em secções de grandes artérias de pacientes com diabetes melito tipo 2 e pacientes não-diabéticos, submetidos à amputação de membro inferior por doença aterosclerótica crônica, os aspectos histológicos em relação à presença de proliferação intimal, celularidade relativa, acúmulo de matriz extracelular, fragmentação da lâmina elástica interna e presença de cálcio e de colesterol.
2. Caracterizar por imunoistoquímica a presença de uma reação imunoinflamatória e o acúmulo de matriz extracelular através da análise semiquantitativa da expressão de linfócitos T, macrófagos, fibronectina e de fator de necrose tumoral- α em secções de grandes artérias de pacientes com diabetes melito tipo 2 e pacientes não-diabéticos, submetidos à amputação de membro inferior por doença aterosclerótica crônica. Comparar os achados de imunoistoquímica nos dois grupos estudados.

PACIENTES E MÉTODOS

Delineamento de pesquisa

Estudo transversal com casos contemporâneos, em que o fator em estudo constitui-se na presença de diabetes melito (macrovasculopatia diabética) e os desfechos são expressos pelas características histológicas e imunoistoquímicas descritas.

População em estudo

Os casos estudados foram pacientes portadores de diabetes melito tipo 2 submetidos à amputação de membro inferior, e os controles foram pacientes não-diabéticos que também sofreram amputação de membro inferior por doença vascular periférica grave. Foram obtidos segmentos de grandes artérias dos pacientes de ambos os grupos submetidos ao procedimento pela equipe médica do Serviço de Cirurgia Vascular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre Abril de 1995 e Maio de 1996.

Os pacientes incluídos no estudo foram classificados em dois grupos de acordo com os seguintes critérios:

Grupo 1 - Pacientes com diabetes melito tipo 2 - História clínica de diabetes melito ou a presença de pelo menos um dos seguintes critérios diagnósticos: glicemia ao acaso $> 200\text{mg/dl}$ mais sinais e sintomas clássicos de diabetes melito; glicemia de jejum $> 140\text{mg/dl}$ em no mínimo duas ocasiões; Teste de Tolerância Oral à Glicose (TTOG) com a ingestão de 75g de glicose via oral com glicemia após 2h $> 200\text{mg/dl}$ (80).

Grupo 2 - Pacientes não-diabéticos - Os critérios de inclusão para o grupo controle foram a ausência de história clínica de diabetes melito e a dosagem de glicose em jejum $\leq 120\text{mg/dl}$.

Quatro pacientes do grupo controle que apresentavam glicemias de jejum em faixa duvidosa, entre 122 e 139mg/dl foram submetidos ao TTOG com 75g de glicose

para melhor definição do grupo. Nenhum apresentava história clínica de diabetes melito. Somente um destes pacientes apresentou TTOG positivo (glicemia de 222mg/dl após 2h da ingestão de 75g de glicose), sendo então considerado como pertencente ao grupo dos pacientes diabéticos.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram a presença de doença autoimune ou inflamatória crônica, neoplasia maligna, evidência de infecção e/ou necrose no segmento arterial estudado e o uso de medicações antiinflamatórias sistêmicas ou imunossupressoras. Também foi considerado critério de exclusão a suspeita clínica de causa embólica para a oclusão arterial.

Coleta de dados clínicos e laboratoriais

O prontuário de cada paciente foi analisado sendo preenchida uma ficha (ANEXO I) com os dados de identificação, idade, peso e altura na data da cirurgia, a presença ou não de fatores de risco para a aterosclerose como hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, dislipidemia, diabetes melito, e, nos casos dos pacientes diabéticos, o tempo conhecido da doença. Foram registrados também os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica no pré-operatório e no momento da entrada no estudo. Foram considerados hipertensos os pacientes com níveis de pressão arterial maior do que 140/90mmHg ou que usassem medicação anti-hipertensiva(81). No caso dos pacientes diabéticos, era identificado o tipo de tratamento a que estes eventualmente se submetiam: dieta e/ou hipoglicemiante oral e/ou insulina. Medicações em uso no pré-operatório e as doenças associadas foram registradas. Características bioquímicas foram avaliadas desde o ano anterior à entrada no estudo, tendo sido considerados os níveis de glicemia de jejum, creatinina sérica, hemograma, plaquetas, tempo de protrombina, triglicérides, colesterol total e frações de colesterol.

Cálculo do tamanho da amostra

Baseado em estudos que analisaram perfil de matriz extracelular em material de autópsia em pacientes diabéticos (49,79) o cálculo da amostra indicou a necessidade da análise de material de 15 pacientes em cada grupo, mantendo-se um equilíbrio em relação à sexo e idade entre os grupos e considerando-se uma probabilidade de erro α de 5% e um poder estatístico de 80%.

Preparação do material

Imediatamente após a amputação ficou a cargo da equipe cirúrgica a dissecação de 5cm de artéria de grande calibre do membro amputado observando uma distância mínima de 2cm das bifurcações arteriais. As artérias estudadas foram a artéria femoral superficial se realizada amputação supra-condiliana ou artéria tibial anterior se amputação infra-condiliana. Uma vez feita a dissecação, em um prazo de até 1 hora, os segmentos arteriais eram enviados pelo próprio autor do estudo ao laboratório do Serviço de Anatomia Patológica. Após o corte transversal das extremidades das peças cirúrgicas para permitir margem de segurança do ponto de amputação, os segmentos arteriais eram divididos em peças de 2cm e colocados em formalina a 10%. Para posterior análise histológica e imunohistoquímica as peças eram embebidas em parafina e os blocos seccionados sucessivamente em cortes histológicos de 5 μ m. Os cortes foram colocados em lâminas especiais previamente cobertas com poli-L-lisina (Sigma).

Histologia

A seguir, os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e também com coloração tricromo. As lâminas coradas com HE foram analisadas por microscopia óptica para detecção qualitativa de áreas de espessamento intimal, celularidade relativa e depósitos de cálcio nas lesões. Matriz extracelular, fragmentação da lâmina elástica interna e a presença de cristais de colesterol foram avaliados nas

secções coradas com tricromo. As lâminas foram analisadas por dois observadores que desconheciam o grupo de origem das secções, havendo concordância entre as duas análises. As alterações foram graduadas conforme estudo prévio realizado por Clausell e colaboradores (42) como: ausente (0), mínima (1/2), leve (1), moderada (2) e alta (3). Para fim de análise estatística foram consideradas como negativas as lâminas com graduações ausente e mínima, e como positivas as lâminas com graduações leve, moderada e alta.

Imunoistoquímica

Secções desparafinizadas foram usadas para determinar a presença de células inflamatórias, fibronectina e TNF- α usando a técnica de imunoperoxidase já descrita em estudos prévios(32,82).

Os cortes histológicos foram inicialmente desparafinizados em xilol (2 x 15') e soluções alcoólicas decrescentes (álcool a 100%: 2 x 10'; a 95%, 70% e 50%:1 x 10'), realizados a seguir banhos com solução tampão (PBS+BSA 0.1%, 2 x 5') e incubação com solução de peróxido de hidrogênio a 1% (3 x 10') para remover atividade endógena de peroxidase nos tecidos. Imediatamente anterior à aplicação dos anticorpos específicos, as lâminas foram incubadas com solução de soro caprino normal a 10% por 15 minutos.

Para determinar a presença de células inflamatórias foram usados anticorpos monoclonais em diluição 1:50 para linfócitos T (família LCA/CD45, clone UCHL1) e macrófagos (clone MAC 387) adquiridos da DAKO Corporation, Carpinteria, CA. Para a detecção de fibronectina foi usado anticorpo monoclonal específico anti-fibronectina de origem celular em diluição 1:100 (clone DH1, sequencia anti-EDA, Chemicon Intl.Inc.). A expressão de TNF- α foi avaliada usando-se anticorpo monoclonal anti-TNF- α humano, MCA1385, em diluição 1:100 (IgG1 da Serotec Ltd, 22Bankside, Station Approach, Kidlington, Oxford OX5 1JE, England). As secções usadas como controle foram tratadas com imunoglobulina isotípica não-imune IgG (DAKO). A seguir as

lâminas foram incubadas por 14h em câmara úmida e então tratadas com PBS + BSA 0,1%, 3 x 10'. Foram incubadas com o anticorpo secundário apropriado por 60' e a seguir tratadas novamente com PBS + BSA 0.1%, 2 x 10', e lavadas com TRIS 0,05 M, pH 7,6, 2 x 2'. Finalmente incubadas com 3,3'' diaminobenzidina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) por 10', lavadas em água corrente e coradas com hematoxilina por 45'', na sequência lavados com água corrente, álcool ácido 10'', água corrente, álcool a 95% por 2 x, álcool a 100% por 3 x e montadas as lamínulas com o uso de xilol.

A expressão de cada antígeno específico no corte foi semiquantitativamente medida por dois observadores com experiência na técnica e de forma cega, e graduada da mesma forma que a usada na análise histológica. As secções foram analisadas com microscópio óptico e aumentos de 10x e 40x.

Análise estatística

Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão (DP) para variáveis contínuas, e sob forma de proporções para as variáveis categóricas.

Para a comparação de médias das variáveis contínuas entre os dois grupos foi usado o teste *t* de Student.

Para a comparação de variáveis categóricas entre os grupos foi utilizado o teste exato de Fischer ou teste do qui-quadrado. Para a construção das tabelas de contingências, considerou-se como casos negativos aqueles com ausência de coloração ou com coloração de intensidade mínima, e considerados positivos os casos com coloração leve, moderada ou intensa.

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

Considerações éticas

O projeto da pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Grupo de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Como o estudo foi realizado com material obtido de amputação, e que já seria objeto de análise pelo serviço de anatomia patológica, não foi solicitado o consentimento dos pacientes previamente à cirurgia.

RESULTADOS

Características clínicas e laboratoriais

O número total de casos alocados foi de 36, sendo 20 no grupo de pacientes diabéticos e 16 no grupo controle. Não houve diferença significativa quanto ao sexo e idade entre os grupos. Também não foi significativa a diferença na prevalência de HAS. Tabagismo como fator de risco para aterosclerose foi detectado em 8 pacientes diabéticos e em 14 pacientes do grupo controle, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). As médias de glicemias de jejum foram de $239,6 \pm 71,8$ mg/dl entre os pacientes com diabetes melito tipo 2 e de $90,7 \pm 13,8$ mg/dl entre os controles ($p < 0,001$). Em relação aos níveis de creatinina sérica nos pacientes diabéticos e nos controles não houve diferença significativa. Estes dados estão descritos na tabela I.

Os níveis de colesterol total, LDL e HDL colesterol foram obtidos em 9 casos dos pacientes diabéticos e em 7 casos dos pacientes controle, não sendo encontrada diferença significativa ao se comparar os grupos. No grupo dos pacientes com diabetes melito, o tempo conhecido da doença foi de $19,5 \pm 8,8$ anos e o tratamento da doença era feito com medicação em 15 dos 20 casos, oito pacientes usavam hipoglicemiante oral e outros 7 faziam uso de insulina NPH diariamente.

Tabela I. Características clínicas e laboratoriais dos grupos.

	Pacientes diabéticos tipo 2 n = 20	Pacientes não-diabéticos n = 16
Sexo (M / F)	10 / 10	12 / 4
Idade (anos) †	68,9 ± 10,9	67,1 ± 14,6
Hipertensão	14	8
Tabagismo	8	14*
Glicemia de Jejum(mg/dl) †	239,6 ± 71,8	90,7 ± 13,8*
Creatinina sérica(mg/dl) †	0,97 ± 0,37	0,93 ± 0,26

† Média ± desvio-padrão.

* p<0,05 na comparação entre os grupos.

M-masculino; F-feminino

Características histológicas

A análise das lâminas coradas com HE e tricromo não evidenciou diferença estatística quanto à extensão das áreas com espessamento intimal, presença de celularidade relativa, fragmentação da lâmina elástica interna, acúmulo de matriz extracelular e presença de cálcio e colesterol comparando-se os dois grupos. De modo geral, a julgar por características histológicas convencionais, as lesões provenientes de pacientes com diabetes melito tipo 2 e não-diabéticos foram semelhantes.

Dados individuais com relação às características histológicas dos pacientes com diabetes melito tipo 2 estão apresentados na tabela II e dos pacientes não-diabéticos na tabela III.

Os achados histológicos dos grupos estão apresentados na tabela IV.

Fotomicrografias ilustrativas das colorações por HE e tricromo em cortes transversais de segmentos arteriais estão apresentadas nas figuras 1 e 2 respectivamente.

Tabela II. Achados histológicos dos pacientes com diabetes melito.

Caso	HE			TV		
	EI	Cel.	Cálcio	LEI(F)	Mz	Colesterol
1	3	1	0	1	1	0
2	2	1	1	½	2	1
3	3	1	0	NA	2	0
4	3	2	0	1	3	0
5	3	½	0	½	3	0
6	2	1	0	½	0	½
7	1	1	0	½	1	0
8	2	1	1	½	2	0
9	2	1	0	½	2	½
10	2	1	0	NA	1	0
11	1	1	0	½	1	0
12	1	½	0	NA	1	0
13	1	1	0	½	1	1
14	1	½	1	NA	1	½
15	1	½	0	½	1	0
16	1	1	0	1	1	0
17	½	½	0	½	½	2
18	2	½	0	½	2	0
19	2	½	0	½	2	0
20	2	1	0	½	2	0

HE – Hematoxilina-eosina; TV – Tricromo; EI – Espessamento intimal; Cel. – Celularidade; LEI(F) – Fragmentação da lâmina elástica interna; Mz – Matriz extracelular.

NA - Não analisado.

Tabela III. Achados histológicos dos pacientes não-diabéticos.

Caso	HE			TV		
	EI	Cel.	Cálcio	LEI(F)	Mz	Colesterol
1	1	1	1	½	1	0
2	2	1	1	½	2	0
3	½	½	0	½	½	0
4	2	½	0	½	2	0
5	2	½	0	NA	3	0
6	3	2	0	1	2	0
7	2	1	0	1	2	0
8	1	1	0	½	1	0
9	½	½	0	0	½	0
10	1	½	0	1	1	0
11	2	1	0	1	1	0
12	2	½	1	1	2	0
13	½	1	0	½	1	0
14	2	½	0	NA	2	0
15	1	½	0	½	1	0
16	1	1	0	1	2	0

HE – Hematoxilina-eosina; TV – Tricromo; EI – Espessamento intimal; Cel. – Celularidade; LEI(F) – Fragmentação da lâmina elástica interna; Mz – Matriz extracelular.

NA - Não analisado.

Tabela IV. Achados histológicos dos grupos.

	Pacientes diabéticos tipo 2 n = 20	Pacientes não-diabéticos n = 16	valor de p
EI			
0 a ½	1	3	0,30
1 a 3	19	13	
Cel.			
0 a ½	7	8	0,57
1 a 3	13	8	
Cálcio			
0 a ½	17	13	0,88
1 a 3	3	3	
LEI(F)			
0 a ½	13	8	0,30
1 a 3	3	6	
Mz			
0 a ½	2	2	0,77
1 a 3	18	14	
Colesterol			
0 a ½	17	16	0,31
1 a 3	3	0	

E I – Espessamento intimal

Cel. – Celularidade

LEI(F) – Fragmentação da lâmina elástica interna

Mz – Matriz extracelular.

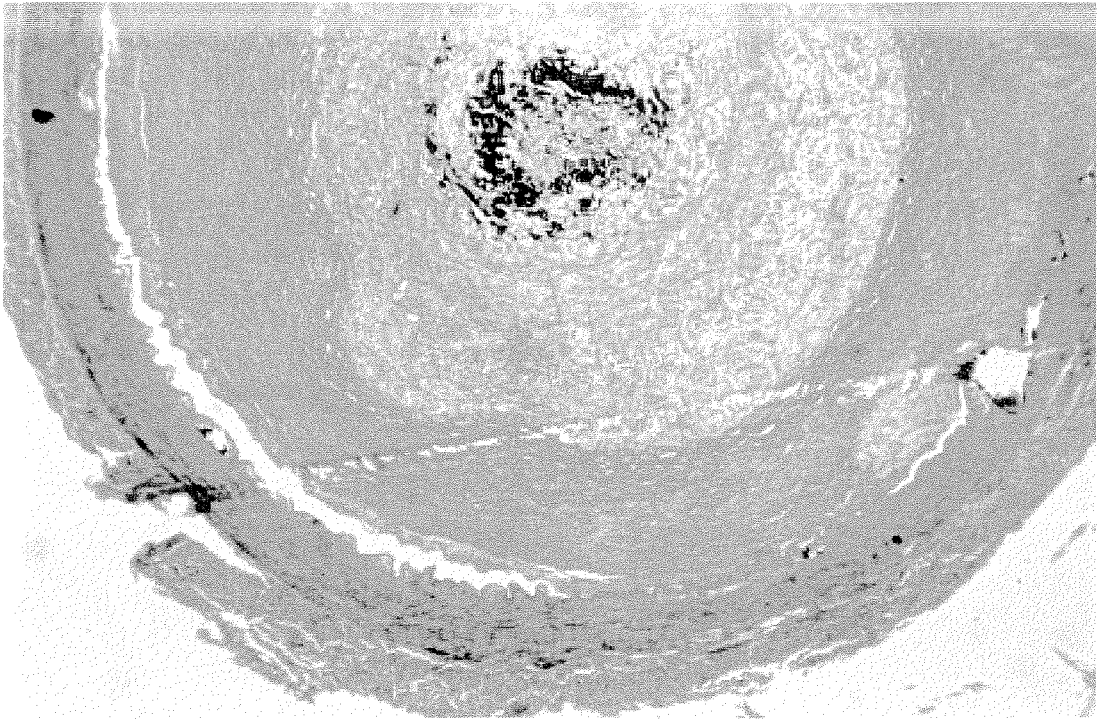


Figura 1. Fotomicrografia ilustrativa da coloração por tricromo em corte transversal de segmento arterial. Aumento final de 40x.

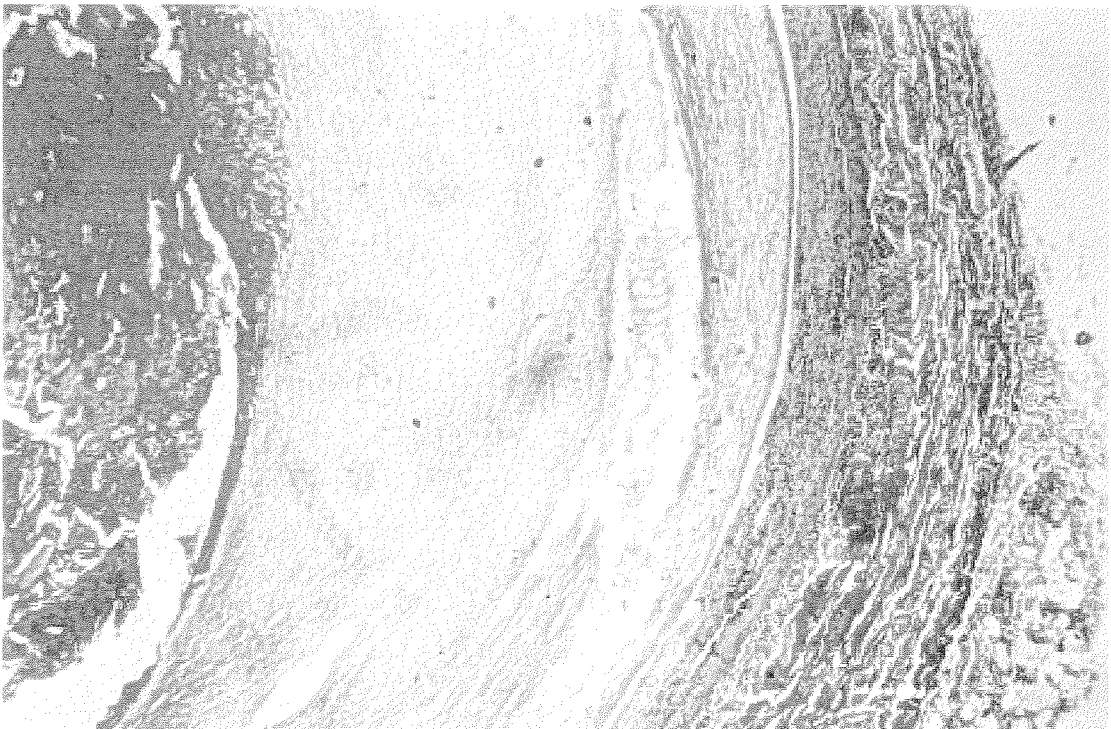


Figura 2. Fotomicrografia ilustrativa da coloração por HE em corte transversal de segmento arterial. Aumento final de 40x.

Características imunoistoquímicas

Linfócitos e macrófagos

A análise semiquantitativa não mostrou diferença significativa quanto à presença de linfócitos T ou macrófagos quando comparadas lesões ateroscleróticas de pacientes com diabetes melito tipo 2 e pacientes não-diabéticos. A presença de linfócitos T foi considerada aumentada em 12 de 19 secções dos pacientes com diabetes melito tipo 2 (63%), com perda de 1 dos 20 casos durante a execução da técnica. Em pacientes não-diabéticos, linfócitos T foram considerados em concentração aumentada em 8 de 16 casos (50%), $p=0,66$. Os macrófagos foram considerados como presentes em concentração aumentada em 13 das 20 secções dos pacientes com diabetes melito tipo 2 (65%) e em 10 dos 16 casos controle (62%), $p=0,85$. A presença destas células independentemente da origem das lesões foi evidente tanto na região neointimal como na adventícia arterial.

Fotomicrografias ilustrativas da detecção de linfócitos T por imunoistoquímica em cortes transversais de segmentos arteriais, graduação alta e graduação ausente, estão apresentadas nas figuras 3 e 4 respectivamente.

Fotomicrografias ilustrativas da detecção de macrófagos por imunoistoquímica em cortes transversais de segmentos arteriais, graduação alta e graduação ausente, estão apresentadas nas figuras 5 e 6 respectivamente.

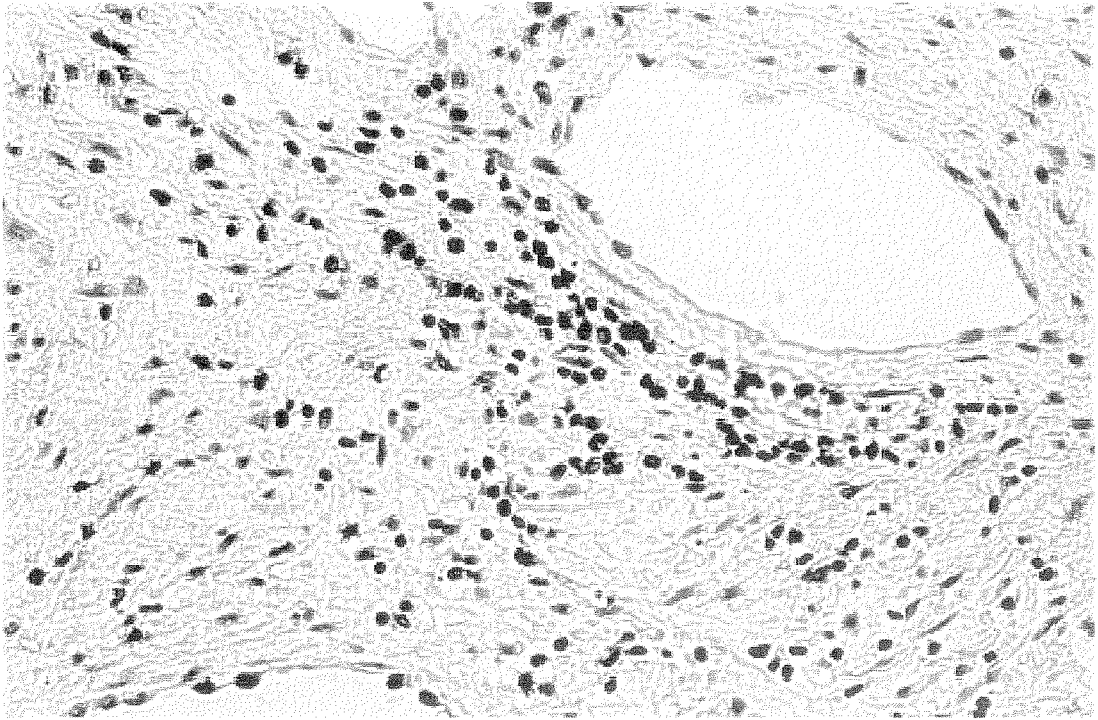


Figura 3. Fotomicrografia ilustrativa da detecção de linfócitos T por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação alta. Aumento final de 100x.

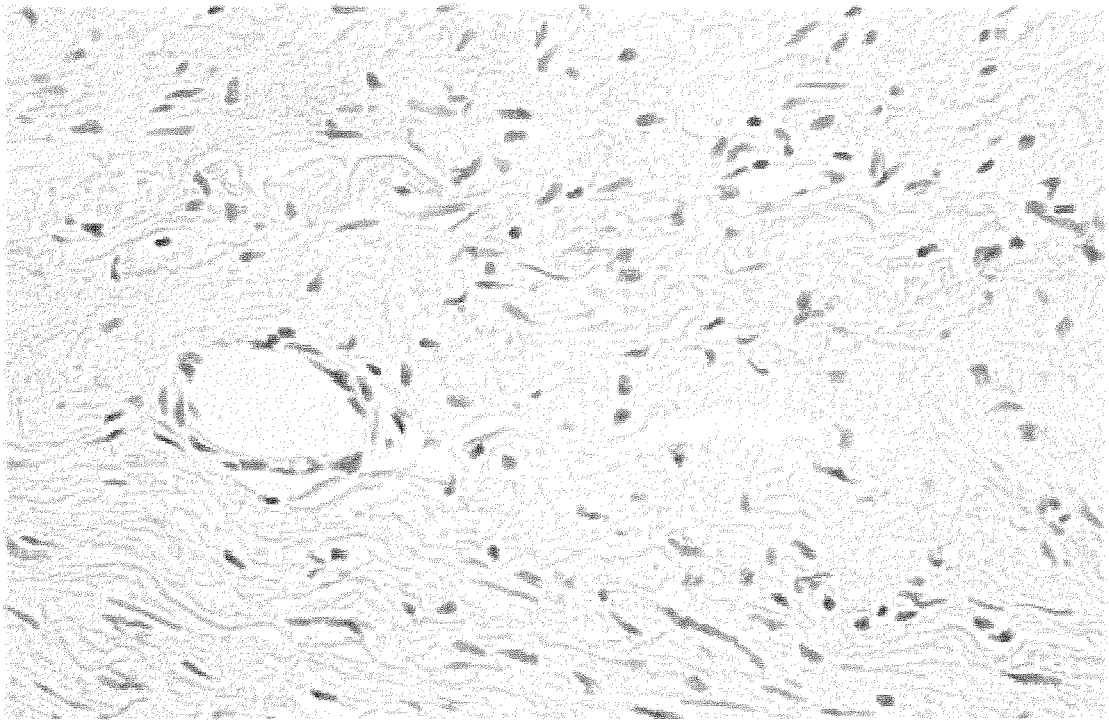


Figura 4. Fotomicrografia ilustrativa da detecção de linfócitos T por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação ausente. Aumento final de 100x.

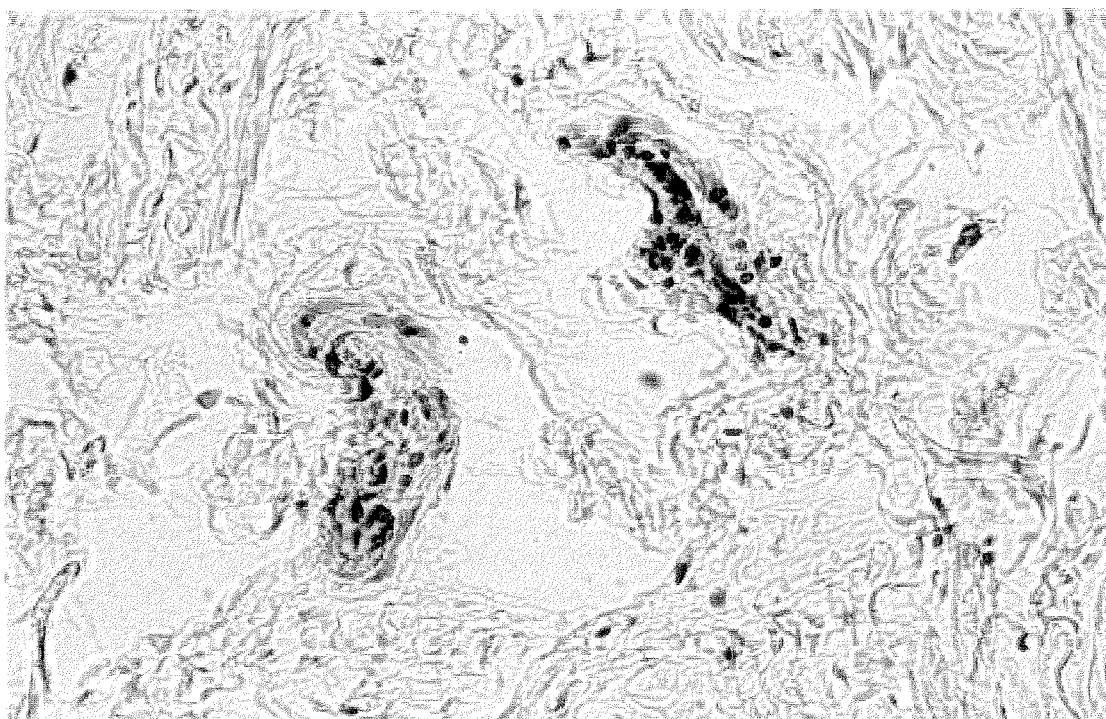


Figura 5. Fotomicrografia ilustrativa da detecção de macrófagos por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação alta. Aumento final de 100x.

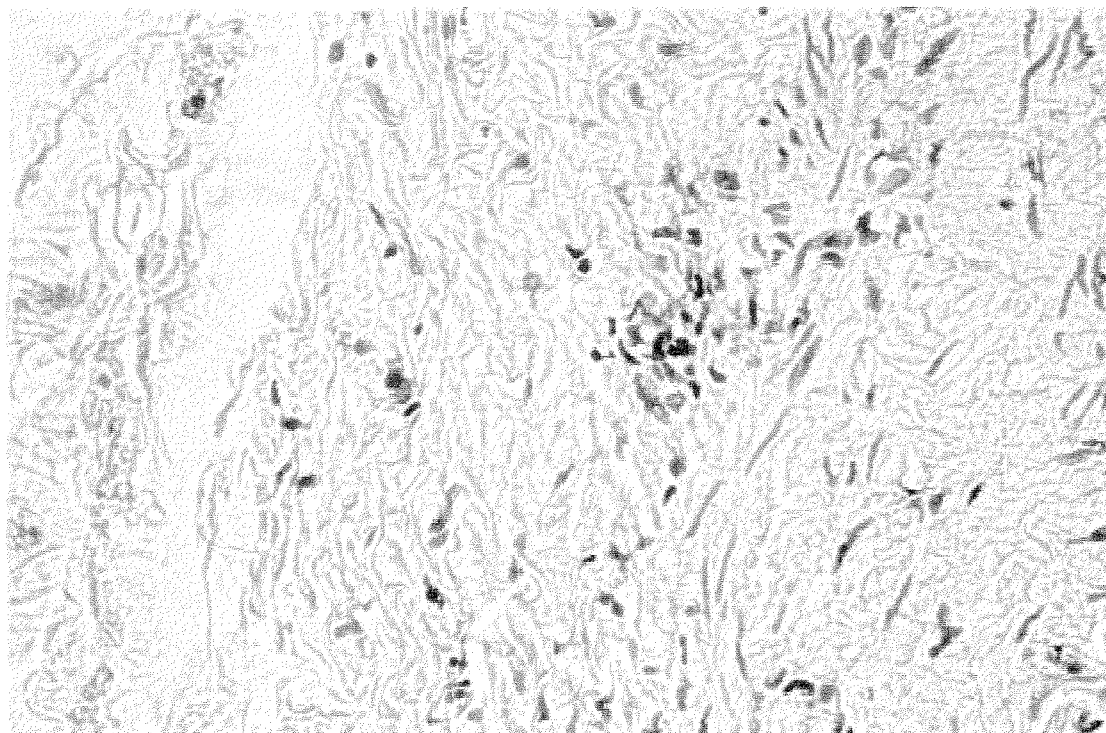


Figura 6. Fotomicrografia ilustrativa da detecção de macrófagos por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação ausente. Aumento final de 100x.

Fibronectina

Quanto ao acúmulo de fibronectina, também não foi detectada diferença estatística comparando-se o padrão observado nas lesões de pacientes com diabetes melito tipo 2 e não-diabéticos. Foi observada elevação desta glicoproteína em 16 de 20 pacientes com diabetes melito tipo 2 (80%) e em 10 de 16 casos controle (62%), $p=0,28$. O acúmulo desta proteína foi evidente tanto na região neointimal como na camada média, de forma similar nos dois tipos de lesão.

Fotomicrografias ilustrativas da detecção de fibronectina por imunohistoquímica em cortes transversais de segmentos arteriais, graduação alta e graduação ausente, estão apresentadas nas figuras 7 e 8 respectivamente.



Figura 7. Fotomicrografia ilustrativa da detecção de fibronectina por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação alta. Aumento final de 40x.

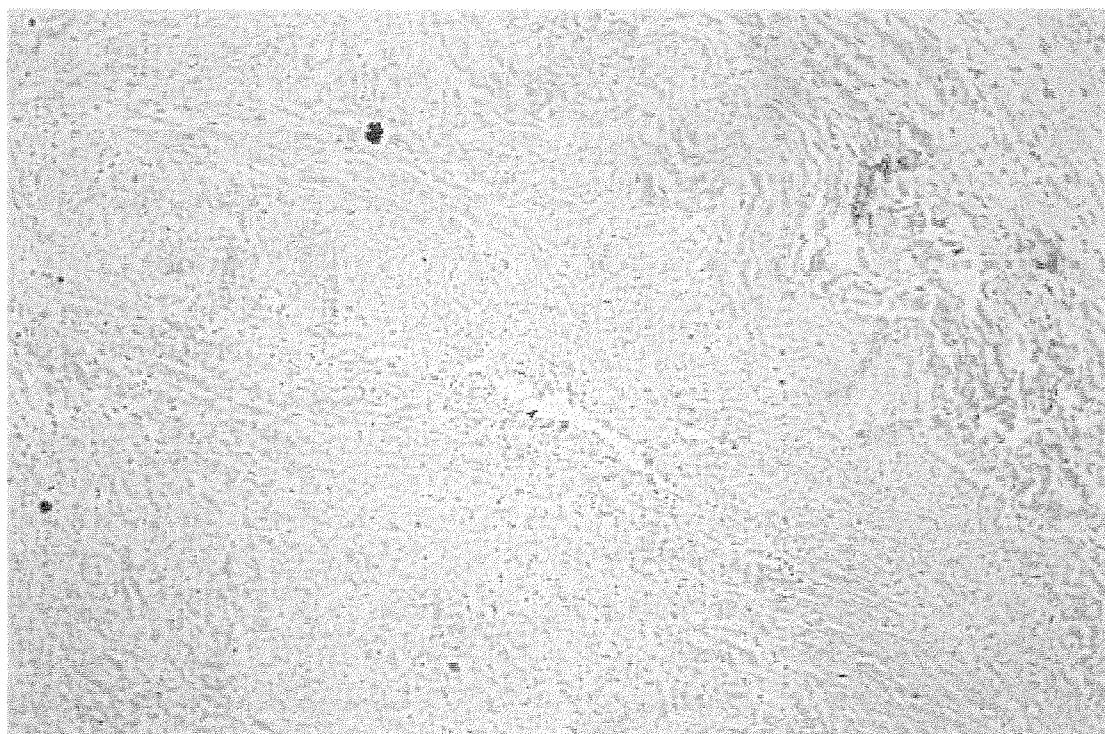


Figura 8. Fotomicrografia ilustrativa da detecção de fibronectina por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação leve. Aumento final de 40x.

Fator de necrose tumoral- α

A análise das secções incubadas com anticorpo anti-fator de necrose tumoral- α , revelou diferença significativa na expressão desta citocina ao se comparar pacientes com diabetes melito tipo 2 e pacientes não-diabéticos. Nas lesões do grupo de pacientes diabéticos, treze de dezenove casos analisados (68%) mostraram aumento na concentração de TNF- α , um caso perdido na técnica. Nas secções arteriais de pacientes não-diabéticos, somente 2 casos entre os 16 estudados (12%) mostraram aumento na expressão desta citocina, $p=0,0028$ (Razão de Chances 15,17 [2,12-139,5]). A expressão do TNF- α parecia estar associada às células de natureza inflamatória, estando estas por sua vez presentes na região neointimal e de forma marcada na região adventícia.

Fotomicrografias ilustrativas da detecção de TNF- α por imunistoquímica em cortes transversais de segmentos arteriais, graduação alta e graduação ausente, estão apresentadas nas figuras 9 e 10 respectivamente.

Dados individuais com relação às características imunistoquímicas dos pacientes com diabetes melito tipo 2 estão apresentados na tabela V e dos pacientes não-diabéticos na tabela VI.

Os achados de imunistoquímica dos grupos estão apresentados na Tabela VII.

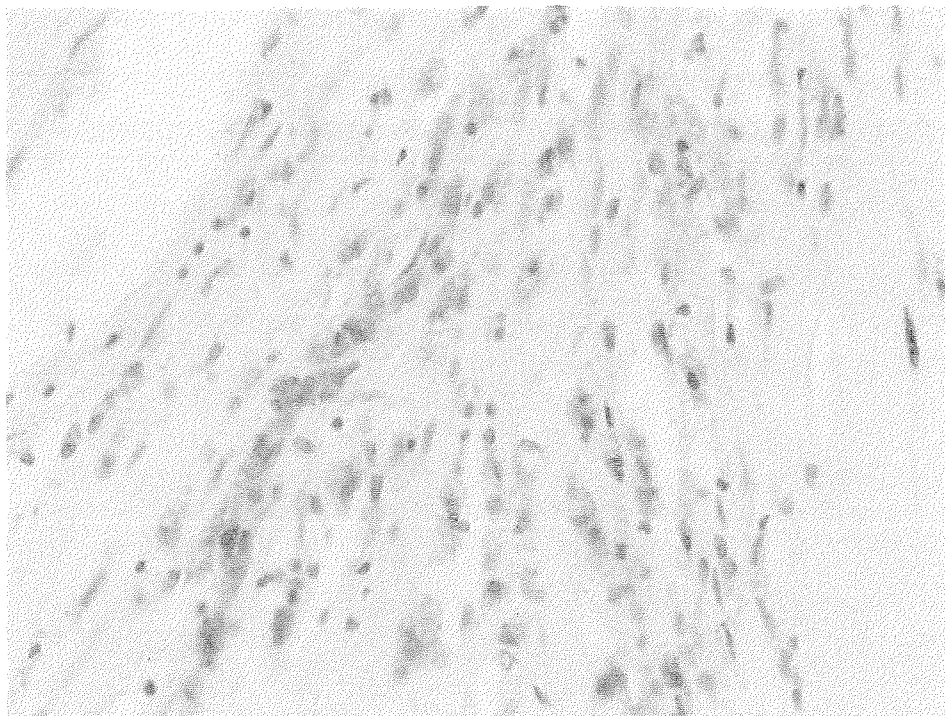


Figura 9. Fotomicrografia ilustrativa da detecção de TNF- α por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação alta. Aumento final de 100x.

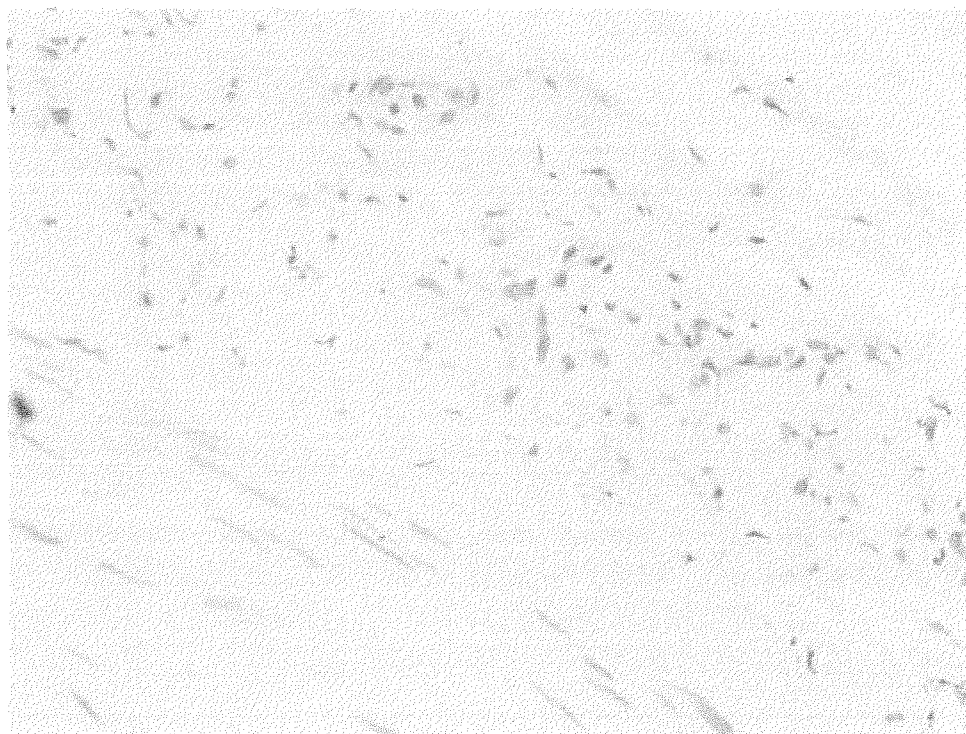


Figura 10. Fotomicrografia ilustrativa da detecção de TNF- α por imunoistoquímica em corte transversal de segmento arterial, graduação ausente. Aumento final de 100x.

Tabela V. Achados de imunoistoquímica dos pacientes com diabetes melito.

Caso	Linfócitos T	Macrófagos	Fibronectina	TNF- α
1	1	2	1	$\frac{1}{2}$
2	2	3	$\frac{1}{2}$	1
3	NA	$\frac{1}{2}$	2	1
4	3	2	1	2
5	3	1	3	1
6	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{2}$
7	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1	0
8	1	2	1	2
9	1	2	1	2
10	$\frac{1}{2}$	1	2	$\frac{1}{2}$
11	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
12	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{2}$
13	2	2	3	1
14	1	1	1	2
15	2	2	1	1
16	2	$\frac{1}{2}$	1	2
17	1	1	2	1
18	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1
19	0	1	2	NA
20	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{2}$	1

NA - Não analisado.

Tabela VI. Achados de análise imunoistoquímica de pacientes não-diabéticos.

Caso	Linfócitos T	Macrófagos	Fibronectina	TNF- α
1	2	3	1	$\frac{1}{2}$
2	1	2	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
3	$\frac{1}{2}$	2	1	$\frac{1}{2}$
4	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{2}$	0
5	3	3	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
6	$\frac{1}{2}$	1	3	$\frac{1}{2}$
7	1	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
8	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{2}$	1
9	1	$\frac{1}{2}$	1	0
10	1	1	$\frac{1}{2}$	2
11	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	3	$\frac{1}{2}$
12	1	1	1	$\frac{1}{2}$
13	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1	$\frac{1}{2}$
14	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	2	$\frac{1}{2}$
15	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	1	0
16	2	0	1	0

Tabela VII. Achados de imunoistoquímica dos grupos

	Pacientes diabéticos tipo 2	Pacientes não-diabéticos	valor de p
Linfócitos T			
0 a ½	7	8	0,66
1 a 3	12	8	
Macrófagos			
0 a ½	7	6	0,85
1 a 3	13	10	
Fibronectina			
0 a ½	4	6	0,28
1 a 3	16	10	
TNF-α			
0 a ½	6	14	0,0028
1 a 3	13	2	

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi caracterizado um aumento na expressão de um mediador imunoinflamatório, o TNF- α , em lesões ateroscleróticas de pacientes com diabetes melito tipo 2, quando comparados a lesões de pacientes não-diabéticos. Este estudo parece ser o primeiro a investigar a presença de uma reação imunoinflamatória associada com lesões macrovasculares avançadas em pacientes com diabetes melito. Estes achados podem proporcionar um auxílio na compreensão mecanística da patogênese desta doença.

Características clínicas da população estudada

Nosso estudo não foi delineado para ajustar achados histológicos e especialmente imunohistoquímicos à presença de fatores de risco específicos para a doença aterosclerótica entre os pacientes estudados. Contudo, a julgar pelas características clínicas da população estudada, esta representa um grupo típico de pacientes com diabetes melito de longa duração, nos quais a doença de grandes vasos progrediu a um ponto no qual a amputação foi necessária. Nossos pacientes não-diabéticos apresentavam doença isquêmica vascular com uma evolução similar, sem a interferência de eventos agudos, como embolias, que poderiam potencialmente produzir diferenças histológicas comparadas ao processo em pacientes com diabetes melito tipo 2. A única diferença clínica aparente entre os grupos foi um número significativamente maior de pacientes tabagistas no grupo de pacientes não-diabéticos. Portanto, nosso grupo controle, mesmo exposto a um outro importante fator de risco de modo significativo, se comparado ao grupo de pacientes com diabetes melito, apresentava menor reação imune na parede arterial. Isto pode sugerir que o estado diabético *per se* proporciona um potente insulto à vasculatura. Isto vai ao encontro do fato de que, embora os fatores de risco para a

aterosclerose sejam mais prevalentes entre a população diabética, isto é responsável por somente 25% do excesso de doença coronariana observada em pacientes diabéticos(83).

Características histológicas

Alterações em artérias coronárias de pacientes com diabetes melito, como proliferação de células musculares, calcificação e aumento da acúmulo de matriz extracelular já foram descritos por Ledet(84), o que se assemelha à aterosclerose comum. No presente estudo, somente lesões avançadas foram estudadas, as quais eram associadas à isquemia severa evoluindo para amputação. Nossa análise dos achados histológicos nestas lesões avançadas também mostrou características comuns à aterosclerose. Por exemplo, o espessamento intimal, a presença de calcificações e de cristais de colesterol eram similares em lesões de pacientes diabéticos e de não-diabéticos. Portanto, considerando somente a análise histológica, as lesões ateroscleróticas de pacientes com diabetes melito tipo 2 e de pacientes não-diabéticos apresentaram-se indistinguíveis neste estudo.

Células inflamatórias

Nos últimos anos, os componentes inflamatórios da lesão aterosclerótica têm sido melhor identificados(5,23); contudo, estudos dedicados a caracterizar aspectos vasculares imunoinflamatórios do processo aterogênico no diabetes são incomuns. Além disso, há indicadores de que alguns fatores ou condições que sabidamente influenciam a aterosclerose podem estar exagerados no diabetes melito, ou que o “milieu” diabético com alguns achados específicos, como um maior grau de LDL oxidado ou hiperinsulinismo podem configurar um forte insulto ao endotélio(85). A possibilidade de que estes aspectos possam ser traduzidos em uma reação imunoinflamatória vascular mais proeminente permanece desconhecida no diabetes melito.

Linfócitos e monócitos/macrófagos estão presentes nas lesões ateroscleróticas e são responsáveis pela ativação de outras células, síntese de várias citocinas e sinalização entre diferentes tipos celulares(24). Neste estudo, nós identificamos de modo similar estes dois tipos de células nas lesões de pacientes com diabetes melito tipo 2 e de não-diabéticos, já que não foi observado diferença na sua expressão. Isto concorda com a descrição prévia de lesões reestenóticas (lesões mais aceleradas) de artéria coronária, as quais mostravam número similar de células inflamatórias quando comparados a lesões não-reestenóticas, mas eram mais ricas em mediadores inflamatórios(42). De fato, a identificação de células inflamatórias em um dado tecido ou lesão em um determinado momento pode variar, pois considera-se que estas células comportam-se em constante tráfico entre os diferentes compartimentos teciduais(86).

Fibronectina

O aumento do acúmulo do componente fibronectina da matriz extracelular tem sido descrito na aterosclerose(87). Trabalhos prévios têm relacionado a presença de fibronectina à proliferação intimal presente em aterosclerose acelerada pós-transplante cardíaco, e isto parece ser regulado por citocinas como IL-1 β e TNF- α (31,35). No diabetes melito, Rasmussen e colaboradores descreveram a presença de fibronectina em secções de aorta em pacientes com diabetes melito tipo 1 e tipo 2 bem como em pacientes controle, não-diabéticos. Interessantemente, estes investigadores demonstraram aumento desta proteína em secções de pacientes com diabetes melito tipo 2 mas somente em área da aorta sem placa aterosclerótica, e em áreas com placas em pacientes com diabetes melito tipo 1 comparados aos controles(49). Em nosso estudo a fibronectina foi observada em lesões ateroscleróticas em pacientes com diabetes melito tipo 2 e no grupo controle, sem diferença significativa entre os grupos. Portanto estes achados corroboram relatos anteriores e podem sugerir que em lesões de pacientes com diabetes melito tipo 2 o aumento da fibronectina como observada por Rasmussen e colaboradores só é evidente em lesões precoces, antes da formação da placa, e que em lesões avançadas como em

nosso estudo, esta diferença pode não mais ser aparente. De fato, Glukhova e colaboradores demonstraram que a presença de fibronectina em lesões ateroscleróticas precoces, se associava com a capacidade desta em promover migração de células da musculatura lisa da camada média para a íntima(88).

Fator de necrose tumoral- α

O fator de necrose tumoral- α tem sido identificado em lesões ateroscleróticas e parece estar envolvido em muitas vias neste processo, incluindo a ativação do endotélio vascular, expressão de moléculas de adesão para células inflamatórias no endotélio(89). Em experimento prévio, Clausell e colaboradores usando modelo de aterosclerose acelerada com transplante cardíaco heterotópico em coelhos, demonstraram que o bloqueio *in vivo* do TNF- α foi associado com diminuição da acúmulo de fibronectina e diminuição da gravidade e do número das lesões coronárias(31). Em nosso estudo foi demonstrado que a expressão de TNF- α foi significativamente maior em lesões de pacientes com diabetes melito tipo 2 comparadas a lesões em não-diabéticos, embora um mínimo grau de coloração para esta citocina tenha sido aparente na maioria das lesões em não-diabéticos. Contudo, o aumento do TNF- α foi o único achado capaz de distinguir os dois tipos de lesões. Embora não tenham sido observadas diferenças quanto às células T ou macrófagos entre os dois tipos de lesão, o aumento no TNF- α , o qual pode ser sintetizado por estas células pode indicar um aumento no estado de ativação das células inflamatórias no estado diabético. De fato, Lopes-Virella e colaboradores demonstraram que no diabetes melito, o LDL modificado antígenicamente pode aumentar a habilidade dos macrófagos em liberar TNF- α (90). Uma dissociação similar entre citocinas e o número de células inflamatórias nas lesões vasculares também foi observada em estudo prévio em reestenose de artéria coronária(42).

Limitações do estudo

A principal limitação deste estudo está relacionada com o fato de que a imunistoquímica foi avaliada somente de forma semiquantitativa. Contudo, ao nosso ver, o uso da imunistoquímica não tem a intenção de proporcionar dados quantitativos definitivos. Ao contrário, ela oferece os meios de produzir compreensão de possíveis mecanismos os quais deveriam ser seguidos por novos estudos, como os com identificação de RNA tecidual usando sondas apropriadas, e eventualmente modelos nos quais hipóteses específicas possam ser testadas.

Síntese

Em resumo, este estudo semiquantitativo demonstrou que, histologicamente, lesões ateroscleróticas de pacientes com diabetes melito tipo 2 e não-diabéticos apresentam muitos achados em comum. Além disso, achados imunoinflamatórios em lesões ateroscleróticas também estão presentes em pacientes com diabetes melito tipo 2, sendo observados células T e macrófagos, bem como alterações do componente fibronectina da matriz extracelular. Contudo, um aumento da presença de TNF- α foi evidente nas lesões em pacientes com diabetes melito tipo 2 comparados aos pacientes não-diabéticos. Isto pode indicar um aumento do estado de ativação das células inflamatórias envolvidas na patogênese da vasculopatia diabética. Implicações específicas destes achados permanecem para ser explorados no futuro com respeito ao seu papel funcional no desenvolvimento da macrovasculopatia diabética.

CONCLUSÕES

1. Os aspectos histológicos compreendidos pelo grau de espessamento intimal, celularidade relativa, acúmulo de matriz extracelular, fragmentação da lâmina elástica interna e presença de cálcio e colesterol, em lesões ateroscleróticas de artérias de membros inferiores, são semelhantes em pacientes com diabetes melito tipo 2 e em pacientes não-diabéticos.

2. Aspectos de imunoistoquímica em lesões ateroscleróticas são semelhantes quanto ao acúmulo de matriz extracelular e quanto à expressão de linfócitos T, macrófagos, e fibronectina em pacientes com diabetes melito tipo 2 e em pacientes não-diabéticos. A expressão do fator de necrose tumoral- α é maior em lesões ateroscleróticas de grandes artérias de pacientes com diabetes melito tipo 2 quando comparada a lesões de pacientes não-diabéticos.

ESTUDOS FUTUROS

Uma das prováveis linhas de pesquisa a serem desenvolvidas compreende a identificação do RNA tecidual com o uso de sondas específicas para o fator de necrose tumoral- α , e a possibilidade de se obter dados quantitativos e de localização celular em relação a esta citocina.

A avaliação histológica e por imunistoquímica de lesões ateroscleróticas em pacientes diabéticos tipo 1 também deve ser levada em consideração. Informações adicionais ao se comparar os três grupos de pacientes: com diabetes melito tipo 1 ou 2, e pacientes não-diabéticos, poderiam ajudar no entendimento da doença macrovascular.

Em modelos experimentais de diabetes melito, poderia ser testada a hipótese de uma menor reação inflamatória, demonstrada por um menor acúmulo de fibronectina e por menor proliferação intimal, ao se realizar o bloqueio seletivo in vivo do TNF- α , com o uso de um receptor solúvel.

ANEXO I

Caso n°:	Prontuário:
Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F	Raça:
Data de nascimento:	Idade
Diabete: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Tempo de duração:
Tipo de tratamento: <input type="checkbox"/> Só dieta <input type="checkbox"/> Hipoglicemiante oral <input type="checkbox"/> Insulina	
Tabagismo: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Hipertensão: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
PAS: mmHg	PAD: mmHg
Doenças associadas:	
Medicações em uso:	
Características bioquímicas:	
Glicemia de jejum: mg/dl	
Creatinina sérica: mg/dl	
Hemograma:	
TP:	Plaquetas:
Colesterol total:	HDL:
LDL:	Triglicerídeos:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *NATURE* 1993; 362:801-809.
2. Davies MJ, Woolf N. Atherosclerosis: what is it and why does it occur? *Br Heart J* 1993; 69:S1-S11.
3. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Nerem RM. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol* 1991; 14:1-16.
4. Massaldi HA, Taquini AC. Haemodynamics and arterial wall metabolism: their possible combined role in atherogenesis. *Medical Hypotesis* 1991; 35:210-218.
5. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cell in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6:131-138.
6. Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. Dietary-induced atherogenesis in swine. I. Morphology of the intima in pre-lesions stages. *Am J Pathol* 1979; 95:775-792.
7. Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits: I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis* 1989; 9:895-907.
8. Heinecke JW, Rosen H, Chait A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* 1984; 74:1890-1894.

9. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew T, Khoo J, Witztum J. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320:915-924.
10. Rankin SM, Parthasarathy S, Steinberg D. Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophages. *J Lipid Res* 1991; 32:449-456.
11. Hiramatsu K, Rosen H, Heinecke JW, Wolfbauer G, Chait A. Superoxide initiates oxidation of low-density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* 1987; 7:55-60.
12. Griffith R, Virella G, Stevenson H, Lopes-Virella MF. Low-density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immunocomplexes. *J Exp Med* 1988; 168:1041-1059.
13. Holf HF, O'Neil J, Chisolm GM, Cole TM, Quehenberger O, Esterbauer H, et al. Modification of low density lipoprotein with 4-hydroxynonenal induces uptake by macrophages. *Arteriosclerosis* 1989; 538-549.
14. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79:319-326.
15. Kodama TK, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains α -helical and collagen-like coiled coils. *NATURE* 1990; 343:531-535.
16. Chisolm GM, Irwin KC, Penn MS. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cell injury in diabetes. *Diabetes* 1992; 41 (suppl 2):S61-S66.

17. Libby P, Hansson GK. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. *Lab Invest* 1991; 64:5-15.
18. Mol MJ, Demacker PN, Stalenhoef AF, Pierre NM. The role of modification of lipoproteins and of the immune system in early atherogenesis. *Netherlands Journal of Medicine* 1993; 43:83-90.
19. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Cayatte AJ, Rozek MM. Pathogenesis of the atherosclerotic lesion. Implications for diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1992; 15:1156-1167.
20. Feingold KR, Grunfeld C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes* 1992; 41 (suppl 2):S97-S101.
21. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Suenram CA, Rozek MM. Atherosclerosis as an inflammatory process: the roles of the monocyte-macrophage. *Ann NY Acad Sci* 1985; 454:115-120.
22. Gown AM, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analyses of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1986; 125:191-207.
23. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989; 135:169-175.
24. Stemme S, Holm J, Hansson GK. T Lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and integrin VLA-1. *Arterioscl and Thromb* 1992; 12:206-211.

25. Hemler ME. VLA proteins in the integrin family: Structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:365-400.
26. Geng YJ, Hansson GK. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 1992; 89:1322-1330.
27. Van Lenten BJ, Fogelman AM. Lipopolysaccharide-induced inhibition of scavenger receptor expression in human monocyte-macrophages is mediated through tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1992; 148:112-116.
28. Li H, Cybulsky M, Gimbrone M, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscl and Thromb* 1993; 13:197-204.
29. Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, Yee E, Rosa M, Osborn L, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 1990; 76:965-970.
30. Briscoe D, Cotran R, Pober J. Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 *in vivo*. *J Immunol* 1992; 149:2954-2960.
31. 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 ciclosporine A and TNF- α blockade. *J Pathol* 1995; 176:175-182.

32. Clausell N, Molossi S, Sett S, Rabinovitch M. In vivo blockade of TNF- α in cholesterol-fed rabbits after cardiac transplant inhibits acute coronary artery neointimal formation. *Circulation* 1994; 89:2768-2779.
33. Hansson GK. Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993; 69 (suppl):S38-S41.
34. Clausell N, Molossi S, Rabinovitch M. Increased interleukin-1 β and fibronectin expression are early features of the development of the postcardiac transplant coronary arteriopathy in piglets. *Am J Pathol* 1993; 142:1772-1786.
35. Clausell N, Rabinovitch M. Upregulation of fibronectin synthesis by interleukin-1 β in coronary artery smooth muscle cells is associated with the development of the postcardiac transplant arteriopathy in piglets. *J Clin Invest* 1993; 1850-1858.
36. Molossi S, Clausell N, Rabinovitch M. Coronary artery endothelial interleukin-1 β mediates enhanced fibronectin production related to post-cardiac transplant arteriopathy in piglets. *Circulation* 1993; 88:248-256.
37. Molossi S, Clausell N, Rabinovitch M. Reciprocal induction of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β activity mediates fibronectin synthesis in coronary artery smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1995; 163:19-29.
38. Clausell N, Molossi S, Rabinovitch M. Tumor necrosis factor- α induction of smooth muscle cell fibronectin synthesis via interleukin-1 β is associated with the development of graft atherosclerosis. *Circulation* 1993; 88 (suppl 1):419

39. Boudreau N, Rabinovitch M. Developmentally regulated changes in extracellular matrix in endothelial and smooth muscle cells in ductus arteriosus may be related to intimal proliferation. *Lab Invest* 1991; 64:187-199.
40. Boudreau N, Turley E, Rabinovitch M. Fibronectin, hyaluronan and a hyaluronan binding protein contribute to increased migration of ductus arteriosus smooth muscle cell. *Dev Biol* 1991; 143:235-247.
41. Boudreau N, Clausell N, Boyle J, Rabinovitch M. Transforming grow factor- α regulates increased ductus arteriosus endothelial glycosaminoglycan synthesis and a post-transcriptional mechanism controls increased smooth muscle fibronectin, features associated with intimal proliferation. *Lab Invest* 1992; 63:350-359.
42. Clausell N, Lima VC, Molossi S, Liu P, Turley E, Gotlieb A, et al. Expression of TNF- α and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. *Br Heart J* 1995; 73:534-539.
43. Navab M, Liao F, Hough G, Ross L, Lenten B, Rajavashisth T, et al. Interaction of monocytes with cocultures of human aortic wall cells involves interleukins 1 and 6 with marked increases in connexin 43 message. *J Clin Invest* 1991; 87:1763-1772.
44. Molossi S, Elices M, Rabinovitch M. Blockade of interleukin-1 β -induced fibronectin/lymphocyte interaction in vitro inhibits lymphocyte transendothelial migration. *FASEB* 1994; 8:A1018
45. Salomon R, Hughes C, Schoen F, Payne D, Pober J, Libby P. Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1991; 138:791-798.

46. Gray RP, Yudkins JS. John C Pickup, Gareth Williams, editors. Textbook of Diabetes. 1997:57.1-57.22.
47. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: Sixteen follow-up study. Diabetes 1974; 23:105-111.
48. Stander J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes: Other risk factors and 12-yr cardiovascular mortality for men in the Multiple Risk Factor International Trial. Diabetes Care 1993; 16:434-444.
49. Rasmussen LM, Heinckendorff L. Accumulation of fibronectin in aortas from diabetics patients. Lab Invest 1989; 61:440-446.
50. Hsueh WA, Anderson PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. Hypertension 1992; 20:253-263.
51. Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrad R, Stern D. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. J Clin Invest 1993; 91:2155-2168.
52. Lopes-Virella M, Virella G. Cytokines, modified lipoproteins, and arteriosclerosis in diabetes. Diabetes 1996; 45 (suppl 3):S40-S44.
53. Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Mühlhölfer A, et al. Tumor necrosis factor-alpha and hyperglycemia-induced insulin resistance. evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. J Clin Invest 1996; 97:1471-1477.

54. Fontbonne A, Charles MA, Thibault N, Richard JL, Claude JR, Warnet JN, et al. Hyperinsulinaemia as a predictor of coronary heart disease mortality in a healthy population: The Paris Prospective Study, 15-year follow-up. *Diabetologia* 1991; 34:356-361.
55. Bergstrom RW, Leonetti DL, Newell-Morris LL, Shuman WP, Wahl PL, Fujimoto WF. Association of plasma triglyceride and C-peptide with coronary heart disease in Japanese-American men with a high prevalence of glucose intolerance. *Diabetologia* 1990; 33:489-496.
56. Rönnemaa T, Laakso M, Pyörälä K, Puukka P. High fasting plasma insulin is an indicator of coronary heart disease in non-insulin dependent diabetic patients and nondiabetic subjects. *Arterioscl Thromb* 1991; 11:80-90.
57. Björntorp P. 'Portal' adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 1990; 10:493-496.
58. Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 1990; 10:497-511.
59. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14:173-194.
60. Pfeifle B, Ditschuneit H. Effect of insulin on growth of cultured human arterial smooth muscle cells. *Diabetologia* 1981; 20:155-158.

61. George LK, Makoto K, Yoshihiko N, Toyoshi I, Teruo S, Pu X. Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* 1996; 45 (suppl 3):S105-S108.
62. Cagliero E, Roth T, Roy S, Lorenzi M. Characteristics and mechanisms of high-glucose-induced overexpression of basement membrane components in cultured human endothelial cells. *Diabetes* 1991; 40:102-110.
63. Fontbonne A, Eschwege E, Cambien F, Richard J-L, Ducimetiere P, Thibault N, et al. Hypertriglyceridemia as risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes: Results from the 11-year follow-up of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 1989; 32:300-304.
64. Florén CH, Albers JJ, Bierman EL. Uptake of chylomicron remnants causes cholesterol accumulation in cultured human arterial smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1981; 663:336-349.
65. Klein RL, Lyons TJ, Lopes-Virella MF. Interaction of very-low-density lipoprotein isolated from Type I (insulin-dependent) diabetic subjects with human monocyte-derived macrophages. *Metabolism* 1989; 38:1108-1114.
66. Hiramatsu K, Bierman EL, Chait A. Metabolism of low-density-lipoprotein from patients with diabetic hypertriglyceridemia by cultured human skin fibroblasts. *Diabetes* 1985; 34:8-14.
67. Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP. Autooxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990; 39:1420-1424.

68. Hiramatsu K, Arimori S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes* 1988; 37:832-837.
69. Bierman EL. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscl and Thromb* 1992; 12:647-656.
70. Davi G, Rini GB, Averna M, Novo S, Di Fede G, Pinto A, et al. Thromboxane B2 formation and platelet sensitivity to prostacyclin in insulin-dependent and independent diabetics. *Thromb Res* 1982; 26:359-370.
71. Witztum JL, Mahoney EM, Branks MJ, Fisher M, Elam R, Steinberg D. Nonenzymatic glycosylation of low-density lipoproteins alters its biologic activity. *Diabetes* 1982; 31:283-291.
72. Lopes-Virella MF, Klein RL, Lyons TJ, Stevenson HC, Witztum JL. Glycosylation of LDL enhances CE synthesis in human monocyte-derived macrophages. *Diabetes* 1988; 37:550-557.
73. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications of diabetes. *Diabetes* 1991; 40:405-412.
74. Vlassara H, Bucala R. Recent progress in advanced glycation and diabetic vascular disease; role of advanced glycation end product receptors. *Diabetes* 1996; 45 (suppl 3):S65-S66.
75. Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M, Takahashi M, Wenyi C, Higashiyama S, et al. Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes* 1996; 45:S81-S83.

76. Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelets-derived grow factor: Role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:9010-9014.
77. Simionescu M, Popov D, Sima A, Hasu M, Costache G, Faitar S, et al. Pathobiochemistry of combined diabetes and atherosclerosis studied on a novel animal model. The hyperlipemic-hyperglycemic hamster. *Am J Pathol* 1996; 148:997-1014.
78. Rasmussen LM, Ledet T. Aortic collagen alterations in human diabetes mellitus. Changes in basement membrane collagen content and in the susceptibility of total collagen to cyanogen bromide solubilisation. *Diabetologia* 1993; 36:445-453.
79. Heinckendorff L, Ledet T, Rasmussen LM. Glycosaminoglicans in the human aorta in diabetes mellitus: a study of tunica media from areas with and without atherosclerotic plaque. *Diabetologia* 1994; 37:286-292.
80. WHO. WHO Study Group: Diabetes mellitus. World Health Organization Tech Report Series 727. Geneva, 1985. Abstract 1985.
81. JNC V. The Fifth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC V). *Arch Intern Med* 1993; 153:154-183.
82. Clausell N, Butant J, Molossi S, Lonn E, Gladstone P, Rabinovitch M, et al. Abnormalities in intramiocardial arteries detected in cardiac transplant biopsy specimens and lack of correlation with abnormal intracoronary ultrasound or endothelial dysfunction in large epicardial coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:110-119.

83. Pyörälä K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3:463-524.
84. Ledet T. Histological and histochemical changes in the coronary arteries of old diabetic patients. *Diabetologia* 1968; 4:268-272.
85. Ross R, Agius L. The process of atherogenesis- cellular and molecular interaction: from experimental animal models to humans. *Diabetologia* 1992; 35:34-40.
86. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76:301-314.
87. Shekhonin BV, Domogatsky SP, Idelson GL, Koteliansky VE, Rukosuev VS. Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries. *Atherosclerosis* 1987; 67:9-16.
88. Glukhova M, Frid M, Shekhonin BV. Expression of extra domain A fibronectin sequence in vascular smooth muscle cells is phenotype dependent. *J Cell Biol* 1989; 109:357-366.
89. Jäättelä M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor-alpha/cachectin. *Lab Invest* 1991; 64:724-742.
90. Virella G, Muñoz JF, Galbraith GMP, Gissinger G, Chasserean C, Lopes-Virella M. Activation of human monocyte-derived macrophages by immune complexes containing low-density lipoprotein. *Immunol Immunopathol* 1995; 75:179-189.