

**A Atividade Inflamatória Sistêmica e a Doença
Aterosclerótica Subclínica em Indivíduos Muito Idosos**

Wladimir Magalhães de Freitas

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade de Brasília para
obtenção do Título de Mestre.

Brasília

2010

Dedicatória

Aos meus **Pais a Liliana, Clara e Sofia** que são ao mesmo tempo meu estímulo e minha recompensa

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Andrei Sposito** que pacientemente me educa para ciência.

Ao **Dr. Genibeto Paiva Campos** e ao **Sr. Alcides Bolgue** pelo incentivo intelectual, emocional e financeiro sem o qual nada seria possível.

Aos Acadêmicos **Alexandre A. Souza Soares, André V.T. Japiassú e Vinícios Boaventura** que agora iniciam onde muitos não terminam

Ao **corpo clínico da Clínica Biocárdios** que generosamente estimulou este estudo

Aos **pacientes e seus familiares** que confiaram no nosso trabalho

Índice remissivo

- Lista de abreviaturas. 7**
- Lista de Tabelas.9**
- Lista de Figuras. 10**
- 0.0 Resumo.11**
- 1.0 Summary.15**
- 2.0 Prefácio.18**
- 3.0 Introdução ao Tema.20**
- 4.0 Manifestações da doença cardiovascular e aterosclerótica no idoso.24**
- 4.1 Epidemiologia.24**
- 4.2 A doença aterosclerótica e a Imunossenescência.26**
- 4.3 Visão geral dos mecanismos imunológicos da aterosclerose.26**
- 4.4 Aspectos biológicos da Imunossenescência.32**
- 4.5 Imunossenescência e o sistema inato.33**
- 4.6 Imunossenescência e o sistema adaptativo.36**
- 4.7 Aspectos clínicos da imunossenescência.37**
- 4.8 Aspectos anatômicos e funcionais da aterosclerose no idoso. 39**

- 4.9 O desafio da estratificação de risco na prevenção primária do idoso.40**
- 4.10 A calcificação coronariana como estratificador de risco no idoso.42**
- 5.0 Justificativas do estudo.43**
- 6.0 Objetivos.44**
- 7.0 Materiais e Métodos.46**
 - 7.1 Delineamento do estudo.47**
 - 7.2 Amostra da pesquisa.47**
 - 7.3 População alvo.47**
 - 7.4 Critérios de inclusão.47**
 - 7.5 Critérios de exclusão.47**
 - 7.6 Captação de participantes.48**
 - 7.7 Método de coletas de dados.51**
 - 7.8 Padronização das técnicas .51**
 - 7.9 Análises bioquímicas. 51**
 - 7.10 Avaliação da função endotelial pelo teste de reatividade da artéria Braquial.53**
 - 7.11 Avaliação da espessura médio intimal, da presença de placas em artérias carótidas e do score de cálcio como marcadores de aterosclerose subclínica e da densidade mineral óssea.55**

7.12	Métodos estatísticos.	55
8.0	Resultados.	57
8.1	Características gerais dos participantes.	58
8.2	Associação entre a atividade inflamatória sistêmica medida por PCR e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas.	62
8.3	Associação entre a calcificação coronária e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas.	67
8.4	Associação entre a presença de placas ateroscleróticas em carótidas e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas.	73
9.0	Discussão.	77
9.1	Da associação entre a atividade inflamatória sistêmica medida por PCR e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas.	79
9.2	Da associação entre calcificação coronária e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas.	80
9.3	Da associação entre a presença de placas ateroscleróticas em carótidas e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas.	84
10.0	Críticas.	87
11.0	Conclusão.	89
12.0	Referências.	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ANCOVA- análise de covariância

Apo B – Apolipoproteína B

AVC- acidente vascular cerebral

AVE- acidente vascular encefálico

CAC – calcificação arterial coronariana

D.M. diabetes Mellitus

DFM- dilatação fluxo mediada

DMO – densidade mineral óssea

DNA- ácido desóxirribonucléico

DNM- dilatação nitrato mediada

DVD- disco de vídeo digital

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

F.A. fosfatase alcalina

FC- frequência cardíaca

HAS- hipertensão arterial sistêmica

HbA1c- hemoglobina glicada

IAM- infarto agudo do miocárdio

IBGE- instituto brasileiro de geografia e estatística

IDL- lipoproteínas de densidade intermediária

IL-6 – interleucina 6

IMC- índice de massa corpórea

IMT- espessamento médio intimal

LISTA DE ABREVIATURAS

LDL- lipídios de baixa densidade

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos tipo 1

MDRD- Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equation

MESA – Multi Ethnic Study of Atherosclerosis

MMS- mini mental escore

OMS- organização mundial da saúde

P.T.H.- hormônio paratireoidiano

PAD- pressão arterial diastólica

PAS- pressão arterial sistólica

PCR – proteína C reativa

PNAD- pesquisa nacional por amostras de domicílios

SL- sublingual

TNF alfa – fator de necrose tumoral alfa

VLDL- lipoproteínas de densidade muito baixas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características clínicas dos indivíduos arrolados.60

Tabela 2- Características laboratoriais dos indivíduos arrolados.61

Tabela 3- Comparação entre os grupos segundo a mediana da PCR.64

Tabela 4- Regressão logística binomial com a variável dependente $PCR \geq 1,6$.65

Tabela 5- Características dos indivíduos com CAC maior e menor que 100.71

Tabela 6- Metabolismo do cálcio, função arterial, espessamento médio intimal e atividade inflamatória dos indivíduos com CAC maior ou menor que 100.72

Tabela 7- Características clínicas segundo a presença ou ausência de placas em carótidas.74

Tabela 8- Características laboratoriais na presença ou ausência de placas em carótidas.75

Tabela 9- Presença de CAC e função arterial conforme a presença ou ausência de placas em carótidas.76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estimativa de indivíduos idosos acima de 80 anos em 2050 (Fonte IBGE) .22

Figura 2- TRL na aterosclerose(Immunological Reviews 2007 Vol 219: 187 – 203). 28

Figura 3- Processo de seleção dos indivíduos.50

Figura 4- Distribuição da PCR na amostra.62

Figura 5- Histograma e percentil do escore de cálcio de Agatstone.67

Figura 6- Diferenças na DFM (A) e DNM (B) entre os grupos com CAC < ou \geq 100.69

Figura 7- Diferença no IMT médio (A) e máximo (B) entre os grupos com CAC < ou \geq 100.70

0.0 RESUMO

Introdução: O envelhecimento populacional representa um grande desafio do ponto de vista social, médico e científico. Neste último contexto, a associação de comorbidades e as particularidades da fisiologia do envelhecimento inviabilizam a extrapolação dos conhecimentos adquiridos em populações mais jovens. Esta limitação é particularmente relevante na doença aterosclerótica, não apenas por ser a principal causa de morte nos indivíduos idosos como também por ter toda a sua base fisiopatogênica delineada em pesquisas em indivíduos mais jovens. Por exemplo, a atividade inflamatória sistêmica que está intimamente relacionada a aterogênese, nos idosos apresenta uma maior expressão. Além disso, mudanças no metabolismo do cálcio e a redistribuição da calcificação nos tecidos dos idosos, criam um cenário distinto ao dos estudos do valor preditivo da calcificação das artérias coronárias. Entre os idosos, a parcela de indivíduos que mais cresce e que proporcionalmente são os mais afetados pela doença cardiovascular são aqueles com mais de 80 anos. E estes indivíduos são o foco deste estudo. **Objetivo:** Avaliar a associação entre a atividade inflamatória sistêmica, a função arterial vasomotora sistêmica, densidade mineral óssea, a calcificação coronariana e a presença de placas ateroscleróticas em carótidas em indivíduos com 80 ou mais anos de idade, não institucionalizados e sem doença cardiovascular sintomática prévia ou atual.

Materiais e métodos: A partir de 1196 candidatos, entre dezembro de 2008 a junho de 2010, 201 indivíduos foram selecionados para participar do estudo. Foram excluídos os indivíduos com doença auto-imune, neoplasias atuais ou prévias, doença pulmonar obstrutiva, em uso de antiinflamatórios hormonais ou não hormonais, doença renal grave, portadores de infecções atuais ou recorrentes, com hepatopatias ou insuficiência cardíaca. Os indivíduos selecionados foram submetidos a avaliação bioquímica, angiotomografia coronariana, estudo da função endotelial por hiperemia reativa da artéria radial, ecografias carotídeas e cardíacas, avaliação de densidade mineral óssea.

Resultados: A idade média dos indivíduos arrolados foi de 85 ± 4 anos, composta de 78% do sexo feminino, sendo 76% portadores de hipertensão arterial sistêmica, 19,5% de *Diabetes Mellitus* e 26% praticantes de atividade física segundo os critérios da OMS renda familiar mediana de R\$ 3.200 (1.400-8000) sendo que 86,9% referiram sua qualidade de vida como boa e muito boa. A atividade inflamatória medida pela PCR se associou de maneira independente dentre as variáveis estudadas apenas com Apo B e Leucócitos. A avaliação da calcificação coronariana mostrou ampla variação (0 a 3586) sendo que 13% da amostra apresentaram de maneira excepcional para idade, escore de cálcio zero. Os indivíduos foram separados em dois grupos tendo como ponto de corte escore de Agatston \geq e < 100 para avaliação da associação entre calcificação coronariana e as variáveis independentes. A presença de CAC ≥ 100 se associou positivamente a dilatação fluxo mediado (DFM) e aos Monócitos. Após a avaliação de inexistência de colinearidade entre as variáveis e a avaliação de regressão logística binomial somente o número de Monócitos apresentou associação independente com CAC ≥ 100 . Na avaliação da função endotelial a média da DFM dos pacientes com CAC ≥ 100 foi 45% menor que a dos pacientes com CAC < 100 ($p= 0, 005$). Não houve diferença na DNM como também não houve diferença entre as médias do IMT médio ou do IMT máximo médio de ambas as carótidas entre os grupos com CAC \geq e < 100 . Após avaliação ultrassonográfica os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou não de placas ateroscleróticas. A presença de placas ateroscleróticas em carótidas se associou de maneira inversa apenas com a circunferência abdominal. **Conclusão:** Na amostra estudada os níveis de PCR se associaram de maneira independente apenas com Apo B, concordante aos achados em populações mais jovens. A CAC se associou com DFM e Monócitos e de maneira independente apenas com Monócitos. A presença de placas ateroscleróticas na presente amostra não foi capaz de identificar a extensão da calcificação coronariana dos indivíduos arrolados.

Palavras chaves: Idosos; muito idosos; Calcificação arterial coronariana; IMT; placas carotídeas; função endotelial; aterosclerose subclínica, TNF, IL10,

1.0 SUMMARY

Introduction: The aging population represents a major challenge in terms of social, medical and scientific. In the scientific terms, the association of comorbidities and the particularities characteristics of physiology of aging may not allow extrapolate the knowledge gained in younger populations. In atherosclerosis this limitation is particularly relevant not only by being the leading cause of death in the elderly but also because their entire pathophysiological bases were outlined in research in younger individuals. For example, the systemic inflammatory activity that is closely related to atherosclerosis in the elderly has a higher expression. Moreover, in elderly because of changes in calcium metabolism and remodeling of tissue calcification there are a distinct setting of where studies establish the predictive value of coronary artery calcification. Those over 80 years are the share of elderly population that most grow fast and them are those that are most affected by cardiovascular disease. These individuals are the focus of this study. **Objective:** To evaluate in non-institutionalized individuals with 80 or more years old, without previous or current symptomatic cardiovascular disease the association between systemic inflammatory activity, vasomotor systemic arterial function, bone mineral density, coronary calcification and the presence of atherosclerotic plaques. **Materials and methods:** Starting in 1196 candidates, from December 2008 to June 2010, 201 individuals were selected to participate in the study. We excluded individuals with autoimmune disease, current or previous cancers, obstructive pulmonary disease, using an anti-inflammatory hormonal or nonhormonal, severe kidney disease, patients with current or recurrent infections, with liver or heart failure. Selected subjects underwent biochemical evaluation, coronary angiography, study of endothelial function by reactive hyperemia of the radial artery, carotid and cardiac ultrasound and assessment of bone mineral density. **Results:** The mean age of enrolled subjects was 85 ± 4 years, consisting of 78% female, 76% of patients with hypertension, diabetes mellitus 19.5% and 26% engaged in physical activity according to the criterion of WHO median family income of R\$ 3,200 (1400-8000) of which 86.9% stated their quality of life as good or very good. The inflammatory activity measured by CRP was associated independently among the variables studied only with Apo B and leukocytes.

There was no difference in MND also as, there was no difference between the mean of IMT mean or mean maximum IMT of both carotid arteries between the groups with CAC \geq and <100 . Assessment of coronary calcification showed wide variation (0-3586) with 13% of the sample presented in an exceptional manner for age, calcium score was zero.

The subjects were divided into two groups taking as cutoff \geq or <100 Agatston score to evaluate the association between coronary calcification and the others independent variables. The presence of CAC ≥ 100 was associated with FMD and monocytes. In the assessment of endothelial function of the average FMD of patients with CAC ≥ 100 was 45% lower than that of patients with CAC <100 ($p = 0,005$). Following evaluation of absence of co linearity between variables and evaluation of binomial logistic regression only the number of monocytes was independently associated with CAC ≥ 100 . After ultrasound evaluation, individuals were divided into two groups according to presence or absence of atherosclerotic plaques. The presence of atherosclerotic plaques in carotid arteries is inversely associated only with waist circumference. Conclusion: In this study CRP levels were associated independently with only Apo B consistent with findings in younger people. The CAC was associated with FMD and monocytes and independently only with monocytes. The presence of atherosclerotic plaques in this sample was not able to identify the extent of coronary calcification of the individuals enrolled.

Keyword: Elderly; very elderly, coronary artery calcification, IMT, carotid plaques; endothelial function, subclinical atherosclerosis, TNF, IL10.

2.0 PREFÁCIO

Um novo perfil da doença cardiovascular se torna cada vez mais prevalente. A doença aterosclerótica no contexto dos idosos e dos muitos idosos. Para esta nova interação, doença aterosclerótica e envelhecimento, o conhecimento adquirido até então, talvez não possa ser extrapolado. E, diante do rápido processo de envelhecimento populacional que ocorre nas sociedades, um melhor entendimento deste talvez novo fenótipo da doença aterosclerótica, passa a ter importância cada vez mais relevante. Para haver uma efetiva prevenção existe a necessidade de validação na população de idosos e muito idosos dos métodos empregados em pessoas mais jovens para discriminação dos indivíduos de alto risco. É com este objetivo que foi criada a coorte **Geros** da qual este estudo faz parte.

3.0 INTRODUÇÃO AO TEMA

O ENVELHECIMENTO POPULACIONAL

Envelhecimento populacional é o processo que ocorre nas sociedades através do aumento da proporção de indivíduos com mais de 65 anos. Este processo inicialmente exclusivo de países desenvolvidos constitui atualmente também um grande desafio em nações em desenvolvimento.

Entre as causas do processo de envelhecimento populacional duas se destacam a diminuição da fecundidade da mulher, que ocorre nos primeiros estágios da transição demográfica e o declínio da mortalidade, principalmente nos mais idosos, que ocorre nos estágios mais avançados.

O declínio da taxa de fecundidade da mulher globalmente diminuiu quase 50% na última metade do século, caindo de valores de 5,0 crianças por mulher para 2,7 crianças por mulher. Em países desenvolvidos, a taxa de fecundidade atualmente é de 1,3 crianças/mulher, valor inferior aos níveis de reposição populacional de 2,1 crianças/ mulher. Ao contrário dos países desenvolvidos em que tais reduções nas taxas de fecundidade ocorreram ao longo do último século, nos países em desenvolvimento estas reduções se deram nas últimas 3 décadas. No Brasil, por exemplo, a taxa de fecundidade apresentou declínio de 5,8 crianças/mulher em 1970 para 1,8 crianças/mulher em 2008, segundo o Censo Demográfico 1940/2000 e Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2006-2008. O impacto da queda na taxa de fecundidade não é refletido apenas na pirâmide etária, mas particularmente no bem estar dos idosos, uma vez que o número potencial de familiares cuidadores

diminui. Isto se torna relevante principalmente em países menos desenvolvidos em que o suporte social dos idosos é dado exclusivamente pela família imediata.

Globalmente, nas últimas cinco décadas, a esperança de vida ao nascer teve um aumento de quase 20 anos, *i.e.* de 46,5 anos, em 1950-1955, para 66 anos em 2000-2005. ¹ No Brasil, a esperança de vida ao nascer apresentou um aumento de quase 10 anos nos últimos 20 anos, *i.e.* de 62,5 anos em 1980 para 72,1 anos em 2005, segundo o Censo Demográfico 1940/2000 e Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2004-2006. Estimativas oficiais projetam para 2050 uma população de indivíduos acima de 80 anos de 13 milhões (5 milhões de homens e 8 milhões de mulheres). Fig. 1.

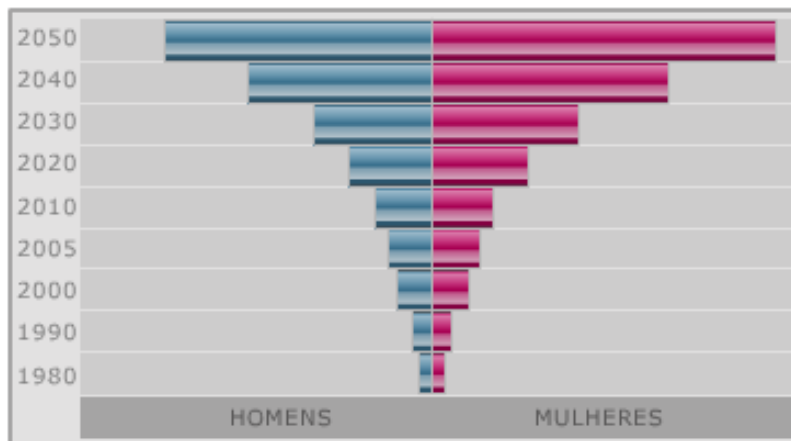


Fig. 1 – Estimativa da proporção de indivíduos acima de 80 anos em 2050

Fonte: www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projeção

A combinação de baixa fecundidade e baixa mortalidade produz como consequência não apenas mais pessoas se tornando idosas como igualmente idosos que vivem por mais tempo. Desta forma, a expectativa de sobrevida dentre os idosos tende a aumentar principalmente nas faixas etárias mais elevadas. Globalmente nos próximos 50 anos a expectativa de vida na idade de 60 anos irá aumentar de 18,8 anos em 2000-2005 para 22,2 anos em 2045-2050 (18%). Na idade de 65 anos haverá um aumento da expectativa de vida 19% e entre os octogenários um aumento dos atuais 7,2 para 8,8 anos, um aumento de 22%. Portanto, é tendência global que não apenas a proporção de idosos nas sociedades esteja aumentando, como entre os idosos, a parcela dos octogenários seja o segmento etário que mais rapidamente aumenta ².

O grande desafio com esta crescente população de idosos e suas exclusivas necessidades envolve adequações legais, previdenciárias, de infra-estrutura, *etc.* Enfim, este panorama impõe a realização de profundas mudanças na nossa sociedade atual e na maneira como lidamos com o envelhecimento. Esta desadaptação é especialmente crítica na utilização de conceitos e procedimentos médicos, que foram validados em populações mais jovens, a indivíduos com associação freqüente de comorbidades e com as particularidades da fisiologia do envelhecimento. O desenvolvimento científico para adequação da atenção a saúde a esta população é, desta forma, uma prioridade.

4.0 - MANIFESTAÇÕES DA DOENÇA CARDIOVASCULAR E ATEROSCLERÓTICA NO IDOSO E NO MUITO IDOSO

4.1 – EPIDEMIOLOGIA

Apesar da diminuição da mortalidade, a doença cardiovascular continua sendo a principal causa de morte na população geral, particularmente verdadeiro nas faixas etárias mais elevadas.

Oitenta e dois por cento das mortes cardiovasculares ocorrem em indivíduos com 65 anos ou mais, refletindo o grande aumento da incidência e prevalência das doenças cardiovasculares que ocorrem com a idade. A prevalência da doença cardiovascular incluindo Hipertensão, Doença Coronariana, Insuficiência Cardíaca e Acidente Vascular Encefálico aumentam de aproximadamente 40% em indivíduos entre 40 a 59 anos para 70 a 75% entre indivíduos de 60 a 79 anos e ultrapassa 80% de prevalência entre indivíduos acima de 80 anos.

Em 2005 na população americana a doença coronariana foi à responsável por mais da metade de todas as mortes cardiovasculares sendo que 82% das mortes de origem coronariana ocorreram em indivíduos acima de 65 anos.

A incidência de Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) entre indivíduos na faixa de 65 a 74 anos é dez vezes maior que entre indivíduos de 35 a 44 anos.

E o aumento da incidência de Infarto Agudo do miocárdio continua em idades mais avançadas de modo que a incidência de IAM em indivíduos acima de 80 anos é duas a três vezes maiores que a incidência entre indivíduos entre 65 a 79 anos. ³

No Brasil dados publicados pelo Ministério da Saúde na Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde 2004; 13(4): 217-228 demonstram que apesar da contínua queda da taxa de mortalidade por causas cardiovasculares, entre idosos, as doenças cardiovasculares continuam sendo a principal causa de morte. No ano de 2000 a taxa de mortalidade entre indivíduos de 70 a 79 anos (1833/100.000 idosos) foi mais que dobro da Taxa de mortalidade dos indivíduos entre 60 a 69 anos (849/100.000 idosos).

Entre os Octogenários a Taxa de mortalidade de causas cardiovasculares foi 4,3 vezes maior que entre indivíduos entre 60 a 69 anos.

No Brasil como no mundo, apesar das disparidades regionais, a doença cardiovascular é a principal causa de morte e sua incidência é mais significativa na população de idosos com uma expressão relativa maior nos indivíduos acima de 80 anos.

4.2 – A DOENÇA ATEROSCLERÓTICA E A IMUNOSSENESCÊNCIA

O processo de envelhecimento produz mudanças no sistema imunológico e a doença aterosclerótica, com seu caráter imuno inflamatório, pode apresentar neste novo ambiente um fenótipo diferente de como a conhecemos.

O processo de envelhecimento do sistema imunológico recebe o nome genérico de Imunossenescência que é definido como um estado de disfunção do sistema imunológico associada à idade. A imunossenescência foi demonstrada em diversas espécies incluindo nos humanos, com alterações tanto no sistema adaptativo quanto no inato. Esta disfunção associada à idade contribui para a morbidade e

mortalidade devido à grande incidência ou reativação de doenças infecciosas bem como possivelmente fenômenos auto-imunes e câncer. ⁴

4.3 – Visão geral dos mecanismos imunológicos da Aterosclerose

Didaticamente o sistema imunológico é dividido em sistema inato e sistema adaptativo. O sistema inato caracteristicamente utiliza os receptores geneticamente codificados, chamados de receptores de reconhecimento de padrões (PRR), utilizados para reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). O sistema adaptativo conta com linfócitos portadores de receptores que são gerados pelo rearranjo de segmentos de DNA. Participa do sistema inato as células fagocitárias, Macrófagos e células Dendríticas, os granulócitos como os Eosinófilos e os Neutrófilos e as células Natural Killer (NK) e o sistema Complemento.

Os Macrófagos foram as primeiras células associadas ao processo aterosclerótico produzem citocinas pró inflamatórias, participam da retenção lipídica e expressam diversos PRR sendo os mais relevantes na aterogênese os scavenger receptors (SRs) e os receptores tipo TOLL like (TLRs).

Os SRs estão envolvidos no reconhecimento e no clearance de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) entre eles os diferentes epítomos de LDL - modificados. Entre os vários SRs os subtipos SR-AI e CD36 têm sido considerados os receptores mais importantes na captação de LDL oxidado pelos macrófagos. No entanto dados conflitantes em experimentos animais fazem com que o papel dos SR no processo de aterogênese esteja ainda indefinido. ⁵

Os TLRs são receptores tipo I associados a membrana celular caracterizados por uma porção extracelular rica em leucinas uma porção transmembrana rica em cisteína e um domínio citoplasmático conhecido como receptor Toll-IL-1 (TIR). Dentre os diversos TLRs em humanos, os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são receptores de superfície celular, enquanto que outros estão localizados em membranas de organelas citoplasmáticas. Os TLRs coletivamente reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) em lipídios, carboidratos, peptídeos e ácido nucléico de microrganismos. Como exemplo os TLR4 reconhecem lipopolissacarídeos (LPS) enquanto que os TLR2 reconhecem lipopeptídeos e peptídeoglicanos microbianos.

De acordo com a natureza do ligante ao TLR este se torna ativado e através da sua porção citosólica leva a ativação de maneira diferenciada ou em conjunto as diferentes vias de transdução do sinal que induzem a expressão de uma variedade de genes envolvidos na resposta imunológica e inflamatória.⁵

O papel dos TLR na aterosclerose foi sugerido quando se demonstrou que células endoteliais de artérias normais apresentavam baixos níveis de expressão de TLR e que em artérias doentes os níveis de expressão de TLR estavam aumentados, principalmente a expressão de TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 nas células endoteliais e em macrófagos. E ainda na placa aterosclerótica os TLR2 e TLR4 são os mais expressos nos macrófagos e nas células endoteliais.

No microambiente da lesão aterosclerótica os TLR presentes em células endoteliais e macrófagos em colaboração com os receptores e SRs reconhecem uma

variedade de ligantes exógenos e ligantes endógenos e leva a síntese de mediadores inflamatórios através de uma complexa via de transdução de sinais citoplasmáticos. ⁵

Enquanto a ligação aos SRs leva a endocitose e a degradação lisossomal de partículas a ligação aos TLR leva a ativação transmembrana de sinais que ativam as vias NF κ B e a via de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) que culminam na expressão de genes produtores de mediadores inflamatórios. ⁶ De maneira esquematizada na Figura 2.

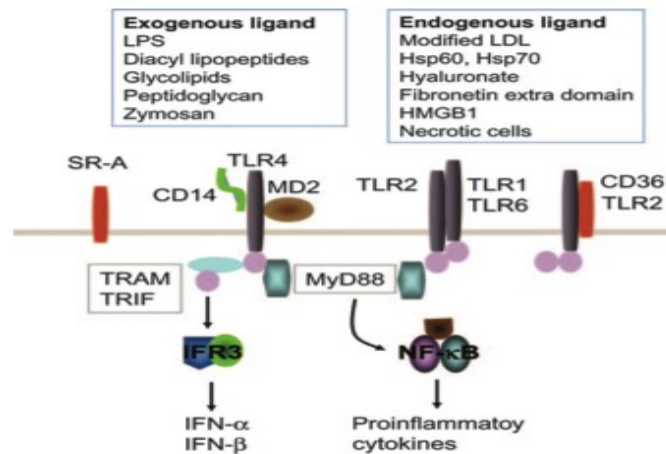


Figura 2 TRL na aterosclerose

Fonte: Immunological Reviews 2007; 219: 187–203

O sistema adaptativo reconhece estruturas moleculares específicas a partir da geração de receptores de antígenos nas células T e de imunoglobulinas que são geradas a partir do rearranjo somático do DNA. Uma vez que células T reconhecem os antígenos apresentados estes iniciam a resposta adaptativa precisamente contra estes antígenos. Esta resposta inclui a ativação de linfócitos citotóxicos contra a célula portadora do antígeno bem como a ativação de células B para produção de

anticorpos contra os antígenos e a potencialização da resposta imunológica inata através da produção de citocinas.⁶

Dados de modelos animais indicam que o processo de aterosclerose se inicia como resposta do sistema imunológico à acumulação e a modificação de lipoproteínas na íntima dos vasos. A acumulação extracelular de lipídios, em modelos animais, ocorre precocemente em resposta aos elevados níveis séricos de lipoproteínas.

No ambiente extracelular proteoglicans e partículas protéicas ligadoras de lipoproteínas, talvez não protegidas da ação de antioxidantes plasmáticos, passam a sofrer modificações que levam a oxidação de lipídios.

Dados laboratoriais confirmam o importante papel de várias lipoproteínas modificadas e seus constituintes na ativação dos mediadores do sistema inato. Não apenas lipoproteínas modificadas são capazes de promover a ativação do sistema inato e progressão da aterosclerose como dados provenientes de estudos sorológicos tem demonstrado que títulos de anticorpos contra estruturas bacterianas estão também relacionados com o aumento da placa aterosclerótica e progressão da doença. E a expressão de TLR em placas ateroscleróticas sugere um possível mecanismo pelo qual produtos microbianos possam ativar as células das placas ateroscleróticas.⁶

As citocinas produzidas por estes estímulos aterogênicos aumentam a expressão de genes que codificam várias moléculas de adesão aumentando a expressão destas na superfície de células endoteliais (EC) nas regiões da placa incipiente.

Uma vez aderidos às superfícies das células endoteliais os leucócitos migram para o espaço intimal subjacente em resposta a quimiocinas. Uma vez residentes no espaço subintimal Monócitos se diferenciam em Macrófagos que passam a acumular lipídios intracelulares. O processo de acúmulo de lipídios depende da expressão de SRs incluindo SRA I e II e CD36. Estes receptores reconhecem motivos estruturais compartilhados por uma grande variedade de macromoléculas microbianas bem como fragmentos de células apoptóticas e lipoproteínas modificadas. A captação de lipídios modificados pelos Macrófagos leva a formação das células espumosas, anatomicamente chamadas de estrias gordurosas, a primeira manifestação macroscópica da aterosclerose.

As fases iniciais das lesões ateroscleróticas têm a participação tanto de Monócitos quanto de células T. De fato muitas das moléculas de adesão e quimiocinas que promovem a adesão o recrutamento de Monócitos também estimulam as células T a migrarem para a região afetada. Em placas humanas avançadas as células T constituem aproximadamente 10% a 20% da população celular. Os linfócitos T após interagir com células dendríticas (DC) e ou Macrófagos especializados na apresentação de antígenos iniciam a resposta imunológica celular.

As células apresentadoras de antígenos (APCs) povoam placas ateroscleróticas e linfonodos que drenam a região afetada onde apresentam os antígenos juntamente com moléculas co estimuladoras iniciando a resposta adaptativa. Potenciais antígenos que estimulam as células T incluem proteínas de choque térmico (HPS), componentes de lipoproteínas plasmáticas e componentes

microbianos. O clone de células T que reconhecer o antígeno irá proliferar e amplificar a resposta imunológica.

As células T CD4 que representam 2/3 da população de células T após a estimulação antigênica passam a ser chamadas de células T auxiliares (Th) e podem se diferenciar em vários subtipos sendo os principais Th1 e Th2. A classe funcional Th1 geralmente amplifica a resposta inflamatória através de secreção de citocinas como IFN γ , IL2, TNF α e β levando ao agravamento da lesão aterosclerótica bem como o recente subtipo funcional Th17.⁷ Estas citocinas causam ativação de macrófagos e células vasculares, promovem inflamação e também participam da imunidade celular. No ambiente da placa muitas células produzem citocinas Th1 estimuladoras como IL12 e IL8.⁶

As células T estimuladas que se diferenciam no subtipo Th2 passam a produzir as citocinas IL4, IL5 e IL10. O papel exato da via Th2 na aterogênese permanece controverso apesar de existir evidências relacionando o predomínio desta via e formação de aneurismas.⁷

Outro subtipo de células T conhecido como reguladoras (Treg) parecem ter um papel de modulação da resposta inflamatória. Nos modelos animais que possuem disfunção das células Treg, ocorre uma exarcebação da lesão aterosclerótica. Um terço das células T possui outro marcador, o marcador CD8. As células T CD8 reconhecem peptídeos associados a moléculas classe I do complexo de histocompatibilidade (MHC). As células T CD8 quando ativadas possuem ação citotóxica e são capazes via contato celular levar a lise de células vizinhas como

células musculares lisas e macrófagos levando a maior liberação de auto antígenos e propiciando um aumento do estado inflamatório.

A imunidade humoral na aterosclerose se faz via células B que secretam anticorpos capazes de reconhecer diversas estruturas moleculares e dados experimentais demonstram que a produção de anticorpos contra estes antígenos especificamente epítomos de LDL oxidado leve a uma diminuição da lesão aterosclerótica.⁷

O papel do sistema imunológico e de seus constituintes na gênese da doença aterosclerótica está bem estabelecido, no entanto, a repercussão do envelhecimento do sistema imunológico na doença aterosclerótica está para ser desvendado.

4.4 – Aspectos biológicos da Imunossenescência

Existe um entendimento baseado em dados clínicos e epidemiológicos que o sistema imunológico apresenta uma disfunção relacionada ao envelhecimento, no entanto, a caracterização destas disfunções representa um desafio.

Diferentes critérios de seleção da amostra produzem resultados conflitantes. A alta prevalência de doenças crônicas de caráter imuno inflamatório na população idosa interfere no entendimento do mecanismo subjacente da imunossenescência. Por outro lado o estudo do sistema imunológico de amostras de indivíduos em que não apresentem doenças crônicas degenerativas e outros intervenientes do sistema imunológico podem ser representativos de apenas um subgrupo de indivíduos com excepcional perfil imunológico.⁸

4.5 – Imunossenescência e o sistema inato

Os Monócitos originam de células mielóides progenitoras e diferenciam-se em macrófagos com funções especializadas em diversos tecidos como osso, vasos, pulmões e fígado.

Os macrófagos possuem importante papel na resposta imunológica atuando não apenas na fagocitose de células e restos celulares como também atuando como APCs. A atividade bactericida está relacionada à capacidade de produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio. A produção destes intermediários é induzida pelo interferon γ (IFN- γ) de células T e Natural Killer (NK) ou por componentes da parede celular de bactérias.

A grande maioria de estudos sobre os efeitos do envelhecimento nos macrófagos foram realizados em modelos animais e avaliando apenas a função fagocítica. Nestes modelos a produção de intermediários de nitrogênio e oxigênio de macrófagos envelhecidos foi 75% menor que em macrófagos de animais mais jovens, sugerindo uma menor capacidade fagocítica.⁸

O mecanismo subjacente das alterações funcionais dos macrófagos inclui alterações na atividade de uma variedade de receptores de membrana e das suas vias de sinalização.

A alteração nos receptores tipo TOLL, oriundas do processo de envelhecimento, são de especial importância na compreensão da imunossenescência especialmente dos receptores TLR2 e TLR4 no contexto da aterosclerose.

O receptor TLR4 tem como principal ligante os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na membrana celular das bactérias gram negativas. Diversos estudos avaliando as mudanças relacionadas à idade nos monócitos e macrófagos utilizando a LPS como ligante têm demonstrado resultados conflitantes devido a diferentes metodologias e a critérios de seleção dos indivíduos. De modo que no momento não existe uma conclusão definitiva em relação à produção de citocinas induzida por LPS em monócitos no contexto do envelhecimento.⁹

Estudo avaliando as mudanças relacionadas à idade na função e expressão dos TLR de diversas linhagens celulares através de citometria de fluxo encontrou que a produção de citocinas (TNF α e IL6) em Monócitos induzida pela ativação de TLR especificamente TLR2/6, TLR4 e TLR5, permaneceram inalteradas em idosos e em jovens. No entanto quando se utilizava agonista específico de TLR1/2 a produção de TNF α e IL6 pelos Monócitos de indivíduos idosos foi 50% menor que a produção de TNF α e IL6 em indivíduos mais jovens.⁹ Dados oriundos de estudos seccionais e de coorte de idosos têm levado a concluir a existência de alterações da função dos TLR relacionado à idade.

No entanto, paradoxalmente, estes dados de estudo *in vitro*, da menor capacidade de produção de citocinas por monócitos e macrófagos de indivíduos idosos, divergem dos fortes dados observacionais que indivíduos idosos apresentam um *milieu* pró inflamatório com elevados níveis de citocinas como TNF α , IL6 e marcadores inflamatórios como Proteína C reativa (PCR).¹⁰

Tanto que o termo “*inflamm ageing*” tem sido cunhado, para descrever este estado de elevado nível de citocinas pró inflamatórias, que comumente se encontra

nos indivíduos idosos. Dentre as diversas citocinas inflamatórias a IL6 tem sido a mais investigada e evidência que sua concentração sérica aumenta com a idade. E estes elevados níveis séricos estão fortemente associados a incapacidade, quedas hospitalizações e morte em indivíduos idosos.

Uma variedade de situações contribui para este aparente paradoxo. Elevados níveis basais de citocinas poderiam resultar em um relativo estado refratário a novos estímulos resultando em uma diminuição da produção de novas citocinas. Ou ainda estudos que avaliam os níveis séricos de IL6 podem refletir a produção de outras fontes de IL6 apesar dos Monócitos/Macrófagos serem a principal fonte a IL6 é também produzida por células endoteliais, adipócitos e fibroblastos. De modo que os significativos aumentos nos níveis circulantes de citocinas inflamatórias que resultam em níveis de TNF α e IL6 duas a três vezes maiores que em indivíduos mais jovens podem refletir a cumulativa, porém pouca produção proveniente de Monócitos/Macrófagos bem como a produção proveniente de outras células.¹⁰

As células NK são linfócitos citotóxicos do sistema inato que atuam de maneira importante na defesa contra células malignas e infecções virais. Em indivíduos idosos existe um aumento do número absoluto de células NK. Apesar deste aumento do número de células a atividade citotóxica das células NK está diminuída. E ainda a produção de IFN γ induzida por IL2 está diminuída bem como outras citocinas e quimiocinas induzidas por IL2 e IL12.

As células dendríticas (DC) possuem vários subtipos com diferentes características as DC mielóides e as DC plasmocitóides. Os DC plasmocitóides são

importantes na produção de interferon (INF) tipo I e respostas antivirais enquanto os DC mielóides expressam uma grande variedade de TLR e facilitam a resposta adaptativa em parte através da produção de IL12 induzida via TLR na indução da resposta Th1. Dados atuais demonstram um aumento ou não modificação do número de DC mielóides relacionada à idade. Enquanto o número de DC plasmocitóides está diminuído ou inalterado com a idade. O impacto da imunossenescência nas DC permanece uma área de intensa investigação, DC derivadas de monócitos apresentam uma menor capacidade de micropinocitose e menor capacidade de fagocitação de células apoptóticas ¹¹, no entanto a função de apresentação de antígeno parece estar preservada no contexto do envelhecimento. ^{10, 12}

4.6 – Imunossenescência e o sistema adaptativo

A maturação das células T virgens ocorre no Timo durante este período de maturação as células T migram do córtex para medula de onde saem para periferia. O Timo que é dividido em córtex ricamente povoado por Timócitos e medula esparsamente povoada. Um dos mais relevantes aspectos da imunossenescência é a involução tímica onde o volume total do órgão diminui e ocorre a reposição do tecido funcional por tecido adiposo e aumento do espaço perivascular com a idade. Como consequência o número de células T virgens maturadas no Timo diminui e por sua vez reduz a diversidade dos receptores das células T (TCR). ¹³

Não apenas o repertório de TCR está dramaticamente diminuído como as Células T virgens de indivíduos idosos apresentam defeitos funcionais, reduzida produção de IL2 e uma diminuída expansão e diferenciação em células efetoras quando comparados com células T virgens de indivíduos jovens e ainda uma maior

proporção de células T de memória CD4 e CD8. Células T CD4 + possuem menor expressão de fatores co estimuladores como CD40 que interfere na ativação de células B. Em conjunto estas alterações podem levar a uma menor capacidade de responder efetivamente a novos antígenos ¹¹.

Tanto quanto nas células T as células B apresentam alterações relacionadas à idade e como consequência na função humoral. Apesar do número de células B no sangue periférico não diminuir com a idade a composição do pool de células B modifica com o envelhecimento o número de células B virgens diminui e o número de células B de memória aumentam. O número de células B de memória aumentado em detrimento de células B virgens diminui a diversidade do repertório imunológico. A disfunção do sistema humoral relacionado à idade é também resultado da perda da qualidade das interações das células do sistema B e T.

As células B interagindo com células T que apresentam menor expressão de fatores co estimuladores juntamente com um microambiente de citocinas alterado, contribuem para as disfunções na produção e na qualidade dos anticorpos. ¹¹

4.7 – Aspectos clínicos da Imunossenescência

As implicações clínicas da Imunossenescência incluem maior risco de infecções, doenças malignas, doenças autoimunes, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e diminuição da eficácia das vacinas ¹³.

Dados clínicos e epidemiológicos sugerem que o processo de envelhecimento do sistema imunológico favoreça ao desenvolvimento da doença aterosclerótica já que a doença cardiovascular continua sendo a principal causa de morte em idosos.

No entanto ainda existe uma grande lacuna entre, o conhecimento dos mecanismos básicos da imunossenescência e suas repercussões na aterosclerose e os dados clínicos e epidemiológicos.

A capacidade fagocítica de Macrófagos diminuída e uma menor capacidade de identificação e lise de células tumorais pelas células NK tem claras repercussões na sobrevivência de pacientes idosos por favorecer o aparecimento de quadros infecciosos e estados neoplásicos.

No entanto as repercussões dos níveis séricos aumentados de citocinas inflamatórias juntamente com as alterações *in vitro* da diminuição da expressão e função dos TLRs nos Macrófagos, da menor produção de citocinas e alterações na capacidade de ativação de células T pelas APC no desenvolvimento da Aterosclerose, ainda não foram esclarecidas.¹⁴

4.8 – Aspectos anatômicos e funcionais da Aterosclerose no idoso

O fenótipo da doença aterosclerótica no idoso apresenta características peculiares. A doença aterosclerótica é altamente prevalente e responsável pela maioria das mortes em pessoas idosas. Embora o mecanismo através do qual o aumento da idade contribui para a alta mortalidade seja desconhecido acredita-se que a alta prevalência de co morbidades e a maior extensão da doença aterosclerótica sejam os principais fatores envolvidos na alta mortalidade.

Estudo realizado com 1009 pacientes que foram submetidos à Ultrasonografia intravascular (IVUS) e foram divididos de acordo com a idade em cinco grupos a partir de 40 anos com incremento de 10 anos na idade em cada grupo. Neste estudo, os pacientes com mais de 80 anos, apresentavam placas com maior grau de calcificação e a idade do paciente foi preditor independente do remodelamento negativo e da extensão da doença aterosclerótica. Enquanto os pacientes mais jovens apresentavam morfologia de placas instáveis, com maior remodelamento positivo e maior presença de placas rotas e trombos.¹⁵ Em outro estudo avaliando a histologia das placas ateroscleróticas em indivíduos com idade superior e inferior a 70 anos pela IVUS demonstrou que as placas ateroscleróticas do grupo mais idoso apresentavam maior densidade de cálcio e maior proporção de tecido necrótico.¹⁶ E estudos de anatomia patológica indicam que a presença de grandes componentes necróticos em placas ateroscleróticas estão associados a maior vulnerabilidade da placa e infarto agudo do miocárdio.¹⁷ Portanto os achados anatômicos refletem os dados epidemiológicos, a doença aterosclerótica com lesões mais complexas e de maior

extensão e com maior potencial de eventos apresenta maior incidência com aumento da idade.

4.9 - O desafio da estratificação de risco na prevenção primária do muito idoso

A mortalidade por doença aterosclerótica tem apresentado diminuição em indivíduos com idade menor que 60 anos, porém sem alteração na sua incidência em indivíduos acima de 60 anos ¹⁸. Portanto devido ao envelhecimento populacional e a mudança do perfil etário da incidência da doença, a prevenção primária da doença aterosclerótica ocorrerá em faixas etárias cada vez mais elevadas.

No entanto a avaliação de risco cardiovascular na população idosa carece de ferramentas apropriadas uma vez que nos grandes estudos de prevenção primária esta população está sub representada. ¹⁹ Os benefícios e segurança oriundos do uso de estatinas na prevenção primária nos idosos, têm sido apoiados em análises de subgrupos e em poucos estudos voltados para a população mais velha. O estudo AFCAPS/TexCAPS dos 6605 indivíduos arrolados apenas 1416 apresentavam idade superior a 65 anos e o maior estudo em prevenção primária na população idosa *The Cardiovascular health study* (CHS) com 5201 participantes apresentou idade média de apenas 71 anos, bem abaixo da faixa etária que mais cresce com o envelhecimento populacional, os indivíduos acima de 80 anos. ²⁰

Até mesmo as ferramentas de estratificação de risco usuais como o Escore de Framingham não contemplam faixas etárias além dos 79 anos e ainda assim tem sido usada na ausência de alternativa disponível. E estudos observacionais em indivíduos

com mais de 85 anos tem demonstrado que alguns destes fatores de risco se tornam nebulosos com a idade ou mesmo agem em direção oposta nesta idade. Como exemplo, os dados oriundos de estudos que avaliaram a associação entre níveis de hipertensão arterial e mortalidade cardiovascular em indivíduos acima de 85 anos demonstrou que aqueles com menores níveis pressóricos apresentaram maiores taxas de mortalidade.^{21, 22} Dados como estes tem levado a se questionar a eficácia de intervenções direcionadas aos fatores de risco clássicos objetivando a prevenção primária nesta faixa etária.²³ Estudo em indivíduos na cidade de Leiden Holanda que atingiram 85 anos de idade sem história prévia de doença cardiovascular e que foram acompanhados por 5 anos demonstrou que o uso do Escore de Framingham (EF) não foi útil em predizer o risco cardiovascular. Durante o período de acompanhamento de 5 anos, 35 indivíduos vieram a falecer de doença cardiovascular e apenas 12 dos 35 indivíduos foram classificados como alto risco pelo EF.²³

Como complicador o poder preditivo dos fatores de risco diminui com a idade, em parte devido à sobrevivência seletiva e em parte devido à influência das comorbidades associadas. E ainda as ferramentas atuais de avaliação de risco cardiovascular incorporam a idade como marcador substituto de aterosclerose sem levar em consideração a heterogeneidade dos indivíduos idosos.²⁴

Portanto estamos diante de uma parcela da população cada vez mais significativa que apresenta alta mortalidade cardiovascular e que as ferramentas utilizadas até então para estratificação de risco parece não serem úteis.

4.10 – A calcificação coronariana como estratificador de risco no muito idoso.

O cálcio coronariano é atualmente reconhecido como um fator preditivo independente e é capaz de melhor estratificar os indivíduos classificados como risco intermediário para doença coronariana. E a avaliação seletiva destes indivíduos através do Escore de Cálcio Coronariano (CAC) é recomendação dos Consensos Europeus e Americanos para prevenção primária de doença coronariana.^{25 26}

Diversos estudos têm demonstrado a utilidade deste marcador em populações idosas adicionando poder preditor à avaliação usual. Vliegenthart *et al.*²⁴ avaliando 1795 indivíduos prospectivamente com idades entre 62 a 85 anos (média de 71 anos) demonstrou que a calcificação coronariana foi um potente e independente fator preditor de risco cardiovascular nesta amostra populacional. Raggi *et al.*²⁷ avaliou 3570 indivíduos assintomáticos sem passado de doença coronariana com idade acima de 70 anos, que foram referenciados a médicos de atendimento primário para serem submetidos a avaliação de calcificação coronariana através de Tomografia Computadorizada. O uso do EC permitiu reclassificar o risco de 43% das mulheres e 45% dos homens acima de 80 anos o que permitiu um melhor capacidade de discriminação do risco nesta população..

A quantificação de cálcio coronariano pode ser entendida como uma medida cumulativa da exposição do indivíduo ao longo da vida aos fatores de risco cardiovasculares e desta forma parece ser de utilidade o uso deste marcador na avaliação de risco de indivíduos idosos.

5.0 – Justificativa do estudo.

No contexto do envelhecimento populacional um grande esforço tem sido feito no entendimento do processo do envelhecimento humano e das doenças associadas à idade. Desta forma a procura de modelos que possam melhor identificar os indivíduos sob risco cardiovascular e direcionar esforços na prevenção tem se tornado uma prioridade. Apesar da mortalidade por doença cardiovascular apresentar sinais de remissão em indivíduos mais jovens continua sendo a principal causa de morte em indivíduos idosos principalmente nas faixas etárias mais elevadas. Aspectos epidemiológicos e dados de estudos anátomo patológicos tem demonstrado que o fenótipo da doença aterosclerótica nos idosos difere dos indivíduos mais jovens. A maior incidência de comorbidades, as alterações no sistema imunológico e o viés da sobrevivência seletiva fazem com que o conhecimento adquirido dos grandes estudos talvez não possa ser extrapolado para esta parcela da população.

Da mesma forma a capacidade de predição de eventos baseado nos fatores de risco parece não ser tão útil nesta população. E para a efetiva prevenção a escolha de marcadores subclínicos de aterosclerose que possam realmente discriminar os indivíduos de alto risco necessita de ser validada nesta população.

6.0 OBJETIVOS

Avaliar na população de indivíduos com mais de 80 anos e sem doença cardiovascular manifesta:

1 - Quais os parâmetros clínicos e laboratoriais que influenciam a atividade inflamatória sistêmica estimada por PCR.

2 – O grau de CAC e a associação de sua intensidade com as características clínicas e laboratoriais, particularmente a atividade inflamatória sistêmica.

3 – A frequência de placas carotídeas e o IMT e suas associações com DAC, estimada pela CAC, bem como com as características clínicas e laboratoriais.

7.0 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Delineamentos do estudo

Todos os pacientes que tiveram os critérios de seleção foram arrolados neste estudo indistintamente e sua análise inicial foi realizada em corte transversal, sem definição de grupos, com a finalidade descritiva geral. Não houve busca ativa por casos ou controles para evitar vieses de seleção relacionados a origem ou método de seleção de participantes. Em seguida, a observação de aterosclerose subclínica, variável dependente pré-estabelecida, permitiu a análise do estudo no formato caso-controle.

7.2 Amostra da pesquisa

7.3 População alvo

Homens e mulheres com idade igual ou superior a 80 anos não institucionalizados e sem manifestação clínica de doença aterosclerótica.

7.4 Critérios de inclusão

Pacientes com idade igual ou superior a 80 anos, não institucionalizados, que procuraram espontaneamente atendimento para cuidados de prevenção e que nunca tenha manifestado clinicamente IAM, AVC ou doença arterial periférica obstrutiva.

7.5 Critérios de exclusão

- Doença auto-imune
- Neoplasias de qualquer tipo atuais ou passadas
- Doença pulmonar obstrutiva sintomática ou assintomática grave

- Uso de corticóides ou anti-inflamatórios não hormonais de maneira contínua
- Doença renal crônica grave (clearance de creatinina menor que 25 mL/min / 1.73m²)
- Infecções crônicas ou recorrentes
- Hepatopatias definidas por alterações de provas bioquímicas e ou funcionais hepáticas ou exames de imagem compatíveis com hepatopatia grave
- Insuficiência cardíaca (fração de ejeção < 50%)

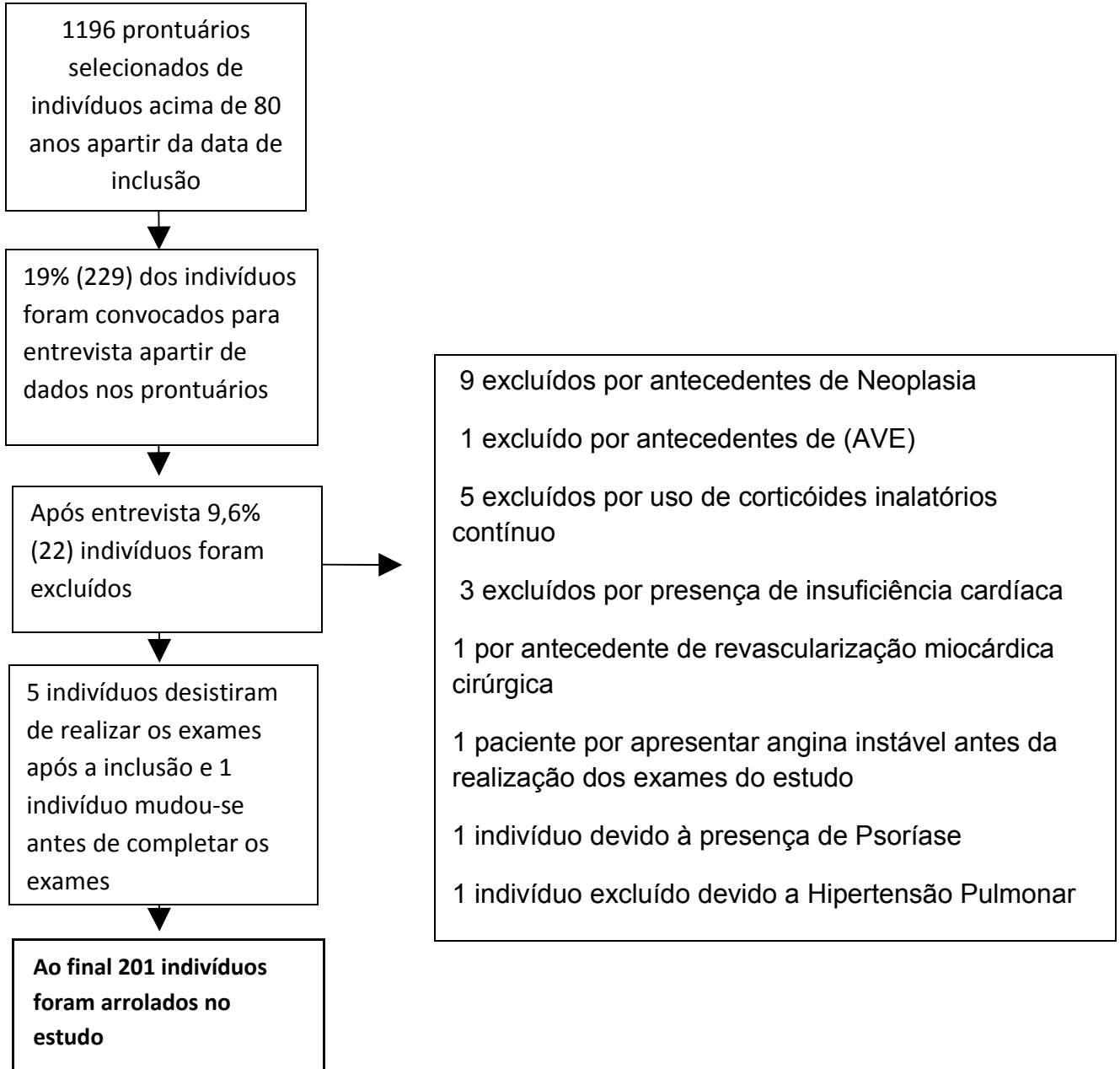
7.6 Captação dos participantes

A captação dos participantes foi realizada exclusivamente em clínica privada, Clínica Biocárdios, que atende pacientes com acesso a saúde complementar de variadas classes sócio-econômicas. Todos os pacientes tiveram demanda espontânea para avaliação médica do estado de saúde.

Os pacientes com essas características foram selecionados a partir do prontuário tendo como referência a data de nascimento no momento da convocação. Foram selecionados pela data de nascimento 1198 prontuários. Desta primeira amostra, 229 indivíduos foram selecionados pelos critérios supracitados e convocados para entrevista médica quando mais 28 indivíduos foram excluídos. Nove indivíduos foram excluídos por neoplasia em período inferior a seis meses da inclusão, 1 indivíduo por antecedente de AVC, 5 por uso contínuo de corticóide inalatório, 3 por insuficiência cardíaca, 1 por antecedente de revascularização

miocárdica cirúrgica, 1 paciente por apresentar angina instável antes da realização dos exames do estudo, 1 indivíduo devido a presença de Psoríase e outro devido a presença de hipertensão pulmonar grave. Ainda houve 6 desistências. Após o processo de seleção 201 indivíduos foram efetivamente arrolados no estudo (Figura 3).

Figura 3 – Processo de seleção dos indivíduos



7.7 Método de coletas de dados

Após consentimento livre e esclarecido os pacientes foram submetidos a questionário médico, realizaram eletrocardiograma, ecodopplercardiograma colorido cardíaco e de carótidas, avaliaram função endotelial por hiperemia reativa da artéria radial, densitometria óssea e coleta de sangue e DNA para congelamento e dosagens bioquímicas detalhadas abaixo. Num intervalo máximo de um mês, os pacientes foram submetidos a tomografia de computadorizada de tórax para avaliação do escore de cálcio.

7.8 Padronização das técnicas

7.9 Análises bioquímicas

Após coleta, o sangue foi centrifugado em EDTA a 5° C, 4500 rpm por 15 minutos para separação do plasma e creme leucocitário. Amostras de plasma do e do creme leucocitário foram congeladas a -80° C para posterior investigação. Outras alíquotas foram encaminhadas para dosagem imediata em laboratório especificamente contratado para realizá-las nas condições descritas abaixo. O laboratório contratado é certificado pelo Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica.

Foram dosados por testes enzimáticos, glicose (Glucose GOD-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, EUA), colesterol total (CHOD-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, EUA), triglicérides (GPO-PAP, Roche Diagnostics, Mannheim, EUA), HDL colesterol (HDL colesterol sem pré-tratamento, Roche Diagnostics, Mannheim, EUA). A proteína C reativa de alta sensibilidade foi determinada por imunonefelometria

(Cardiophase, Dade Behring, Marburg, EUA). A hemoglobina glicada foi determinada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), por método comercialmente disponível (Variant II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O ácido úrico foi determinado por método Uricase (Hitachi, Tokyo Japan), Transaminases Glutâmico Pirúvicas e Transaminases Glutâmico Oxalacética Cinético/UV 37°C (Hitachi, Tóquio Japão). A Gama Glutamil Transferase e a Fosfatase Alcalina foi determinadas pelo método cinético PNP (IFCC) (Hitachi, Tóquio Japão). Sódio e Potássio séricos foram determinados pelo método Eletrodo Íon seletivo – Indireto (Hitachi, Tóquio Japão). Magnésio sérico foi determinado pelo método Azul de Xilidil (Hitachi, Tóquio Japão). Uréia sérica foi determinado pelo método Cinético/UV GLDH 37°C (Hitachi, Tóquio Japão). Creatinina sérica foi determinado pelo método Picrato Cinético (Hitachi, Tóquio Japão). A Velocidade de Hemossedimentação (VHS) foi avaliada pelo método Sedimentação de Eritrócitos (Alifax S.p.A-PD, Itália). A dosagem das proteínas totais e frações foram determinadas pelo método Biureto (Hitachi, Tóquio Japão). A dosagem de Calcitonina e PTH foram determinadas pelo método de quimioluminescência (Immulite 2000E-Siemens, Alemanha). O Hemograma com contagem de plaquetas foi determinado de forma automatizada (Sysmex XE2100 Siemens, Alemanha). A dosagem do Fibrinogênio foi determinado de forma automatizada (Sysmex CA1500, Siemens Alemanha). A citocinas interleucina (IL) 10 e o fator de Necrose Tumoral tipo alfa (TNF- α) foram dosados por ELISA (eBioscience, San Diego, CA, USA).

7.10 Avaliação da Função Endotelial pelo Teste de Reatividade da Artéria Braquial

A função endotelial foi estudada através da avaliação da dilatação fluxo mediado (DFM) e da dilatação Nitrito mediada (DNN) na artéria braquial esquerda por ultra-sonografia de alta resolução não invasiva. Os exames foram realizados sempre no início da manhã (entre 7:30 e 9:00), em sala com controle de luminosidade e temperatura, em equipamento da marca Philips, modelo IE 33 e transdutor linear de 3-9 MHz. Os pacientes permaneceram em jejum de doze horas, sem medicações vasoativas por 24 horas, fora do período menstrual para as mulheres, e sem realizar exercícios físicos, fumar ou ingerir alimentos com cafeína, alto teor de gordura ou vitamina C nas 24 horas anteriores ao exame.

O paciente permanecia em repouso (em posição supina) por 10 minutos até o início do exame. Os ciclos cardíacos foram monitorizados simultaneamente por eletrocardiografia acoplada ao equipamento. Foram então obtidas imagens bidimensionais da artéria braquial, em eixo longitudinal, aproximadamente dois centímetros acima da fossa antecubital. Quando as primeiras imagens em repouso eram adquiridas, a pele do paciente era marcada para que todas as obtenções a partir daí fossem feitas no mesmo local. Antes de qualquer registro definitivo, os parâmetros do equipamento eram ajustados para melhor definição das imagens, sem mais alterações no curso do exame. O fluxo sanguíneo foi analisado colocando-se a amostra-volume do Doppler pulsado no centro da artéria braquial, com angulação corrigida e apropriada (ângulo $\leq 60^\circ$). A hiperemia reativa (DFM) foi induzida pela insuflação de manguito acoplado a manômetro de mercúrio no antebraço esquerdo, 50mmHg acima da pressão arterial sistólica do paciente. Após cinco minutos, a

pressão do manguito era liberada, sendo registrada, nos primeiros 15 segundos seguintes, a variação do fluxo local da hiperemia reativa. As imagens bidimensionais foram adquiridas durante os dois minutos seguintes.

Todos os exames foram gravados e arquivados em DVD e analisados posteriormente por dois observadores independentes. Os diâmetros luminais da artéria braquial foram medidos no momento do pico da onda R do ciclo cardíaco (final da diástole), correspondendo a distância entre a superfície médio-intimal da parede anterior e a superfície lúmen-intimal da parede posterior da artéria, numa linha perpendicular as paredes do vaso. Foram obtidas 3 medidas de diâmetros da artéria braquial na fase basal (em repouso, antes da interrupção do fluxo – D1) e 3 medidas durante a hiperemia reativa (D2). Calculou-se a média dos diâmetros de cada fase (D1 e D2) e a DFM foi obtida pela formula: $DFM = \frac{D2-D1}{D1}$, expressa em percentual.

O paciente permaneceu em repouso por mais 10 minutos após a liberação do manguito, com o intuito de permitir a artéria uma nova acomodação de diâmetros basais em repouso. Após este período foi administrado ao paciente 5mg de dinitrato de isossorbida, por via sublingual (SL). Foram obtidas 3 medidas de diâmetros da artéria braquial na nova fase basal (após 10 minutos de repouso – D3) e 3 medidas 5 minutos após a administração do nitrato SL (D4) . Calculou-se a média dos diâmetros de cada fase (D3 e D4) e a DNM foi obtida pela formula: $DNM = \frac{D4-D3}{D3}$, expressa em percentual.

7.11 Avaliação da espessura média - intimal, da presença de placas em artérias carótidas e do escore de cálcio como marcadores de aterosclerose subclínica e da densidade mineral óssea

A avaliação da espessura média - intimal e a presença de placas carotídeas foram avaliadas utilizando ultrassonografia modo B de alta resolução (Philips, modelo IE 33, 3-9 MHz transdutor linear, Philips Medical Systems, Andover, Massachusetts, USA) de acordo com os protocolos da Associação Americana de Ecocardiografia ²⁸. As medidas foram realizadas bilateralmente na parede posterior do bulbo da carótida comum e na carótida interna através de um programa de detecção automática de borda (QLAB versão 6.0 software). Placa carotídea foi definida como a presença de espessamento focal pelo menos 50% maior que áreas adjacentes ou como região focal com IMT maior que 1,5 mm que causa protuberância para a luz do vaso e distintas das bordas adjacentes.

Para avaliação da calcificação coronariana foi utilizado Tomografia Computadorizada com multidetectores de 64 canais (Brilliance CT, Philips Healthcare, Cleveland, OH, USA). A avaliação da densidade mineral óssea foi realizada com os indivíduos em decúbito horizontal com Aparelho de Absortometria de raio X de dupla energia (Delphi, Holgic, MA, Estados Unidos da América)

7.12 Métodos Estatísticos

Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão para dados normalmente distribuídos ou mediana (intervalo interquartil) para dados não paramétricos. As variáveis categóricas foram comparadas por meio do teste qui-quadrado. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de Pearson, variáveis paramétricas, ou Spearman, variáveis não paramétricas. A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para avaliar as diferenças entre as variáveis mensuradas ajustando para idade e gênero. Pré-requisitos para os modelos ANCOVA

(linearidade, normalidade da distribuição e igualdade de variância) foram verificados, utilizando-se histogramas, gráficos de probabilidade e de resíduos. Análise multivariada pela técnica de regressão logística foi realizada para verificar a presença de associações independentes. O efeito da variável independente, medido pela razão de chances e 95% do intervalo de confiança (IC), foi apresentado seguido da significância estatística. Foram selecionadas para cada modelo as variáveis com $p < 0,1$ na análise univariada. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. As análises estatísticas foram realizadas usando-se SPSS para Windows versão 16.0.

8.0 RESULTADOS

8.1 Características gerais dos participantes

Conforme delineamento, a população arrolada foi composta exclusivamente de muito idosos não institucionalizados e independentes para as atividades diárias. A qualidade de vida por eles apontada foi ruim 1,5%, nem ruim e nem boa 11,7%, boa 52,6% e muito boa 34,3%. A mediana da escolaridade foi de 8 (4-13) e o “mini mental score” (MMS) foi de 26 (22-28).

Nas Tabelas 1 e 2 estão demonstradas as características clínicas e metabólicas dos indivíduos estudados. A idade média foi de 85 anos (intervalo de 80 a 102), houve um predomínio de mulheres (78%) em concordância com a maior longevidade feminina e uma maior frequência de Diabetes Melitus (19,5%) quando comparados à população em geral de (5% a 10%)²⁹. Da mesma forma, a frequência do diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica (76%) foi maior que a esperada na população geral (15%)²⁹. O nível médio do colesterol total da população estudada foi de 198 ± 41 mg/dL, não diferindo do nível médio da população Brasileira de (199 ± 35 mg/dL)³⁰.

Em contraste, observamos pouco tabagismo apenas 3% quando comparado à população em geral (35 a 40%) e pouco sedentarismo. Utilizando os critérios de indivíduos ativos fisicamente segundo a Pesquisa Nacional por Amostras de Domicílios (PNAD) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2008, a prevalência na amostra estudada foi de 40%, maior que os 16% esperados para brasileiros com mais de 65 anos. Mesmo por critérios mais rígidos, como os da

Organização Mundial de Saúde (OMS), que classifica como fisicamente ativos aqueles que praticam pelo menos 30 minutos de atividade física leve a moderada em 5 dias da semana, 26% da amostra se enquadra como fisicamente ativos. Os indivíduos com atividade física são mais jovens (83 ± 3 versus 85 ± 5 anos, $p < 0,001$), apresenta menor circunferência abdominal (91 ± 10 versus 96 ± 12 cm, $p = 0,01$) e uma tendência a maior renda familiar (R\$ 7.839 ± 9.698 versus 5.139 ± 10.028 , $p = 0,1$). Como houve perfeita superposição entre as taxas de filtração glomerular calculadas pelas versões simplificadas e estendidas do MDRD, optamos em utilizar a versão estendida para todas as demais análises (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Características clínicas dos indivíduos arrolados

<i>Número de Indivíduos</i>	201
Gênero Masculino, %	44 (22)
Idade, anos	85 ± 4
IMC, Kg/m²	26 ± 5
Circunferência Abdominal, cm	94 ± 12
Gordura Corporal, %	17 ± 4
Pressão arterial sistólica, mmhg	145 ± 20
Pressão arterial diastólica, mmhg	75 ± 10
Frequência cardíaca, bpm	73 ± 11
Diabéticos tipo 2, %	23
Duração do Diabetes Mellitus, anos	9(4; 22)
Hipertensos, %	76
Duração da Hipertensão Arterial Sistêmica, anos	21(11; 31)
Tabagistas, %	3
Ativos fisicamente segundo OMS, %	26
Praticantes de qualquer atividade física,%	40
Renda Familiar, R\$	3.200 (1.400-8.000)
Anos de Menopausa	38 ± 8

Tabela 2. Características laboratoriais

<i>Variável</i>	
Hemoglobina, g/dL	13,6 ± 1,6
Albumina, g/dL	7,4 ± 0,4
Apolipoproteína A, mg/dL	151 ± 28
Apolipoproteína B, mg/dL	86 ± 25
Triglicerídeos, mg/dL	126 ± 56
HDL – Colesterol, mg/dL	54 ± 13
LDL – Colesterol, mg/dL	114 ± 36
HbA1c, %	6,4 (5,8; 7,1)
Glicemia, mg/dL	112 (98; 124)
Leucócitos, células/ μ L	6304 ± 1565
Fibrinogênio, mg/dL	352 ± 71
PCR, mg/L	1,6(1,0; 3,5)
Paratormônio, pg/mL	56 ± 23
Fosfatase Alcalina óssea, %	42 ± 12
Fósforo, mg/dL	3,4 ± 0,4
Cálcio, mg/dL	9,4 ± 0,5
Densidade mineral óssea lombar, Z-score	0,3 ± 1,1
Densidade mineral óssea Colo do Fêmur, Z-score	0,9 ± 0,9
Densidade mineral óssea Fêmur proximal, Z-score	0,4 ± 0,8
MDRD simplificada, mL/min /1.73m ²	71 ± 19
MDRD estendido, mL/min /1.73m ²	70 ± 19

8.2 Associação entre a atividade inflamatória sistêmica medida por PCR e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas

Na Figura 4 está demonstrada o histograma de distribuição da PCR em mg/L e seus percentis na população estudada. Os níveis de PCR mg/L apresentaram leves correlações com o número de Leucócitos/ μL ($r=0,2$; $p=0,003$), Monócitos/ μL ($r=0,2$; $p=0,001$), Linfócitos/ μL ($r=0,2$; $p=0,007$) e com a idade em anos ($r=0,17$; $p=0,048$).

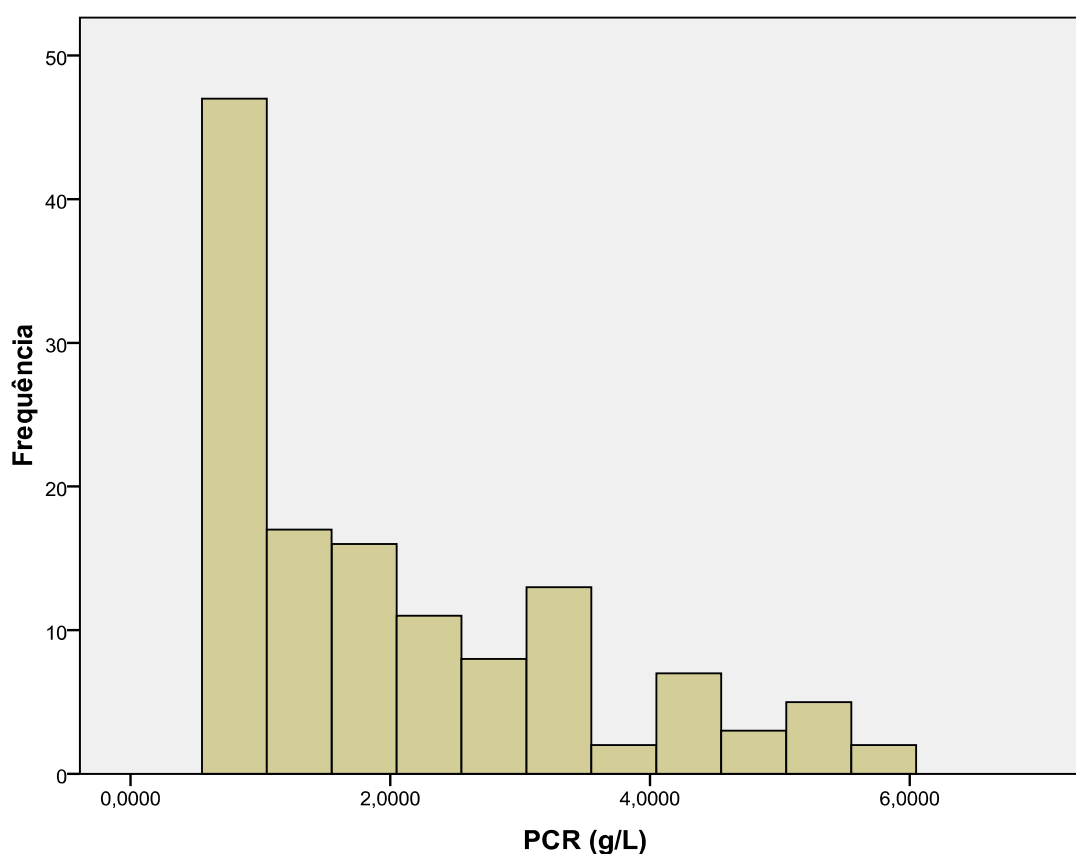


Figura 4. Distribuição da PCR na amostra

Distribuição dos Percentis no grupo total							
Percentil	5	10	25	50	75	90	95
PCR, mg/dL	1,0	1,0	1,0	1,6	3,0	4,2	5,1

Para avaliação da associação entre PCR e as variáveis independentes separamos dois grupos segundo a mediana da PCR em $PCR \geq 1,6$ e $PCR < 1,6$. Na Tabela 3 estão demonstradas as características dos dois grupos. A idade no grupo com $PCR \geq 1,6$ foi 2% maior que no grupo com $PCR < 1,6$. A média do LDL-colesterol foi 20% maior, triglicerídeos 20%, apo B 20%, Fibrinogênio 7%, Leucócitos 8% e pressão arterial diastólica 5% maiores que os valores do grupo remanescente. Não identificamos diferenças entre os grupos com relação às demais características clínicas ou laboratoriais.

Avaliamos por regressão linear a existência de colinearidade entre as variáveis supracitadas identificadas como distintas entre os grupos e nenhuma destas demonstrou colinearidade entre si. Desta forma, procedemos a regressão logística binomial tomando como variável dependente a presença de $PCR \geq 1,6$ e como variáveis independentes estas acima referidas com a adição de gênero. Conforme Tabela 4, somente as variáveis apo B e leucócitos apresentaram associação independente com a PCR maior que a mediana.

Tabela 3. Comparação entre os grupos segundo a mediana da PCR

	PCR ≥ 1,6	PCR < 1,6	p	I.C. 95% da Diferença
PCR, mg/L	2,8 (2,1-4,1)	1,0 (1,0-1,1)		
Idade, anos	85 ± 4	84 ± 4	0,04	0,01 a 2,8
Gênero, masculino	25%	27%	1,0	-
IMC, Kg/m²	26 ± 5	25 ± 4	0,2	-0,5 a 2,3
Circ. Abdominal, cm	94 ± 12	93 ± 11	0,3	-2,2 a 5,7
Gordura Corporal, %	17,2 ± 4,5	16,4 ± 3,7	0,2	-0,6 a 2,2
PAS, mmhg	146 ± 22	144 ± 21	0,6	-5,5 a 9,1
PAD, mmhg	77 ± 11	73 ± 10	0,02	0,5 a 7,8
FC, bpm	74 ± 11	72 ± 13	0,4	-2,5 a 5,9
Apo A, mg/dL	151 ± 24	155 ± 33	0,4	-13,6 a 6,3
Apo B, mg/dL	93 ± 26	75 ± 21	0,0001	10,2 a 26,8
Triglicerídeo, mg/dL	138 ± 52	111 ± 51	0,004	8,4 a 44,2
HDL-colesterol, mg/dL	54 ± 12	57 ± 13	0,1	-7,7 a 1,1
LDL-colesterol, mg/dL	125 ± 40	99 ± 33	0,0001	12,8 a 38,1
Leucócitos, células/μL	6337 ± 1576	5815 ± 1332	0,04	15,5 a 1026
Monócitos, células/μL	581,3 ± 280	509 ± 150	0,07	-5,9 a 150,5
Linfócito, células/μL	1832 ± 617	1664 ± 549	0,1	-33,9 A 370
Fibrinogênio, mg/dL	352 ± 74	327 ± 55	0,03	2,4 a 47,7
TNF-α, pg/mL	4,1 ± 2,6	5,0 ± 3,5	0,8	-1,9 a 5,2
IL-10, pg/mL	3,8 ± 3,9	3,1 ± 3,2	0,14	-0,5 a 1,8
MDRD, mL/min /1.73m²	68 ± 18	72 ± 18	0,2	-9,8 a 2,4

Tabela 3. Comparação entre os grupos segundo a mediana da PCR

	PCR > 1,6	PCR < 1,6	<i>p</i>	I.C. 95% da Diferença
F.A. Fração Óssea, %	42 ± 13	41 ± 13	0,9	- 4,4 a 4,7
Uso de Estatina,%	27	55	0, 001	-
Meses em uso de Estatina	4,4 ± 2,3	4,8 ± 2,5	0,7	-2,6 a 1,8
Anos de Menopausa	39 ± 9,0	39,5 ± 10,7	0,8	-7,3 a 6,1
DMO Lombar, g/cm ²	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,09	-0,1 a 0, 008
DMO colo Fêmur, g/cm ²	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4	-0, 005 a 0,02
Tabagismo,%	0	3%	0,5	-
Diabetes tipo 2,%	23	22	0,8	-
HbA1,%	6,0 (5,7; 6,3)	6,1(5,7; 6,4)	0,5	-
Glicemia, mg/dL	97 (88; 112)	94(89; 102)	0,6	-
Tempo de DM, anos	20,5 (3,5; 31)	21(4; 22)	0,7	-
HAS, %	76	73	0,8	-
Tempo de HAS, anos	20 (10,7; 31)	21(11; 41)	0,9	-
P.T.H. pg/mL	58,9 ± 25,1	56,5 ± 23,6	0,5	-6,0 a 10,8
Cálcio mg/dL	9,4 ± 0,4	9,4 ± 0,4	0,9	-0,1 a 0,1
Ex tabagistas, %	27	23	0,7	-
Atividade física, %	26	38	0,18	-
Bloq. canais de cálcio, %	34	31	0,18	-
Diuréticos, %	45	45	0,7	-

**Tabela 3. Comparação entre os grupos segundo a mediana da PCR-
Continuação**

	PCR > 1,6	PCR < 1,6	<i>p</i>
Anti agregante plaquetário	30	39	0,28
Ezetimiba	6	11	0,3
Fibrato	1,5	0	1,0
Bifosfonato	21	25	0,68
Beta Bloqueador	22	20	0,8

Tabela 4. Regressão logística binomial com a variável dependente PCR ≥1,6

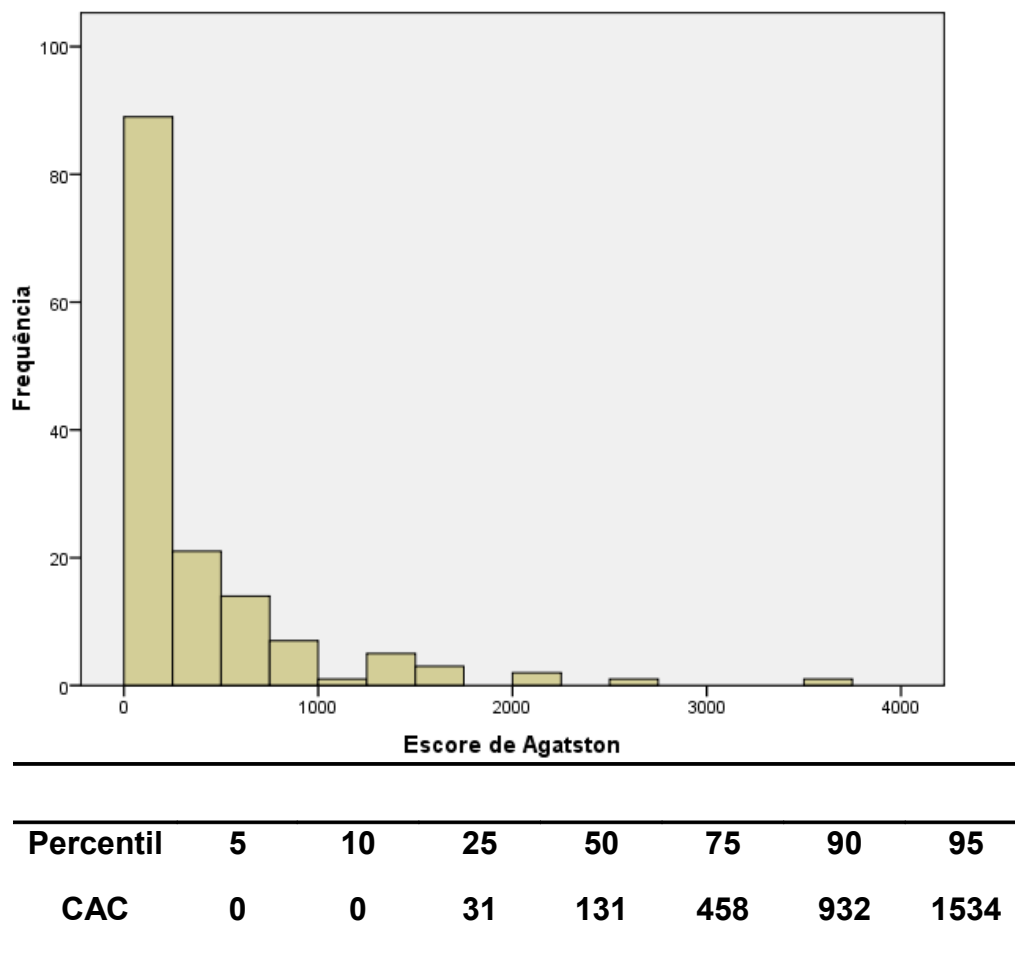
	Wald	<i>p</i>	RC	95% I.C. para RC
Apo. B, mg/dL	15,611	<0,0001	1,036	1,018 a 1,055
Leucócitos	4,527	0,033	1,000	1,000 a 1,001
Constante	15,338	0,000	0,009	

RC= Razão de chances

8.3 Associação entre a calcificação coronária e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas

A magnitude da calcificação das artérias coronárias variou amplamente (0 a 3586) e 20 participantes apresentaram escore de cálcio igual à zero. Na Figura 5 está disposto o histograma de distribuição do CAC e os percentis. Para avaliação da associação entre calcificação coronariana e as variáveis independentes, separamos dois grupos com escore de Agatston \geq ou $<$ 100, ponto de corte identificado em estudos populacionais e indicado pela IV Diretriz Brasileira de Prevenção da Aterosclerose como indicador de risco cardiovascular ²⁹.

Figura 5. Histograma e percentis do Escore de Cálcio de Agatston



Nas Tabelas 5 e 6 estão dispostas as características dos dois grupos conforme o CAC. A presença de $CAC \geq 100$ tendeu a se associar com a contagem sanguínea de leucócitos e monócitos. Além disso, apesar da frequência de *Diabetes Mellitus* ser equivalente entre os grupos, o tempo de diagnóstico desta enfermidade foi duas vezes maior no grupo com $CAC \geq 100$ (Tabela 5). Não identificamos diferenças entre os grupos com relação às demais características clínicas ou laboratoriais. Também não encontramos diferenças significativas entre os grupos com relação às variáveis bioquímicas relacionadas ao metabolismo do cálcio, como PTH, fração óssea da fosfatase alcalina, cálcio plasmático ou medidas da densidade mineral óssea no colo de Fêmur, Fêmur proximal ou coluna lombar. Não houve diferença entre os grupos em relação à atividade inflamatória sistêmica medida por PCR, IL10 e TNF- α .

Na avaliação da função endotelial, a média da DFM dos pacientes com $CAC \geq 100$ foi 45% menor que a dos pacientes com $CAC < 100$ ($p=0,005$) (Figura 6A). Não houve diferença na DNM entre os grupos (Figura 6B). Também não houve diferença entre as médias do IMT médio (Figura 7A) ou do IMT máximo médio de ambas as carótidas (Figura 7B), entre os grupos com $CAC \geq 100$ e < 100 .

Figura 6. Diferenças na DFM (A) e DNM (B) entre os grupos com CAC < ou \geq 100. A linha representa os valores máximos e mínimos. A barra representa o intervalo interquartil e a mediana.

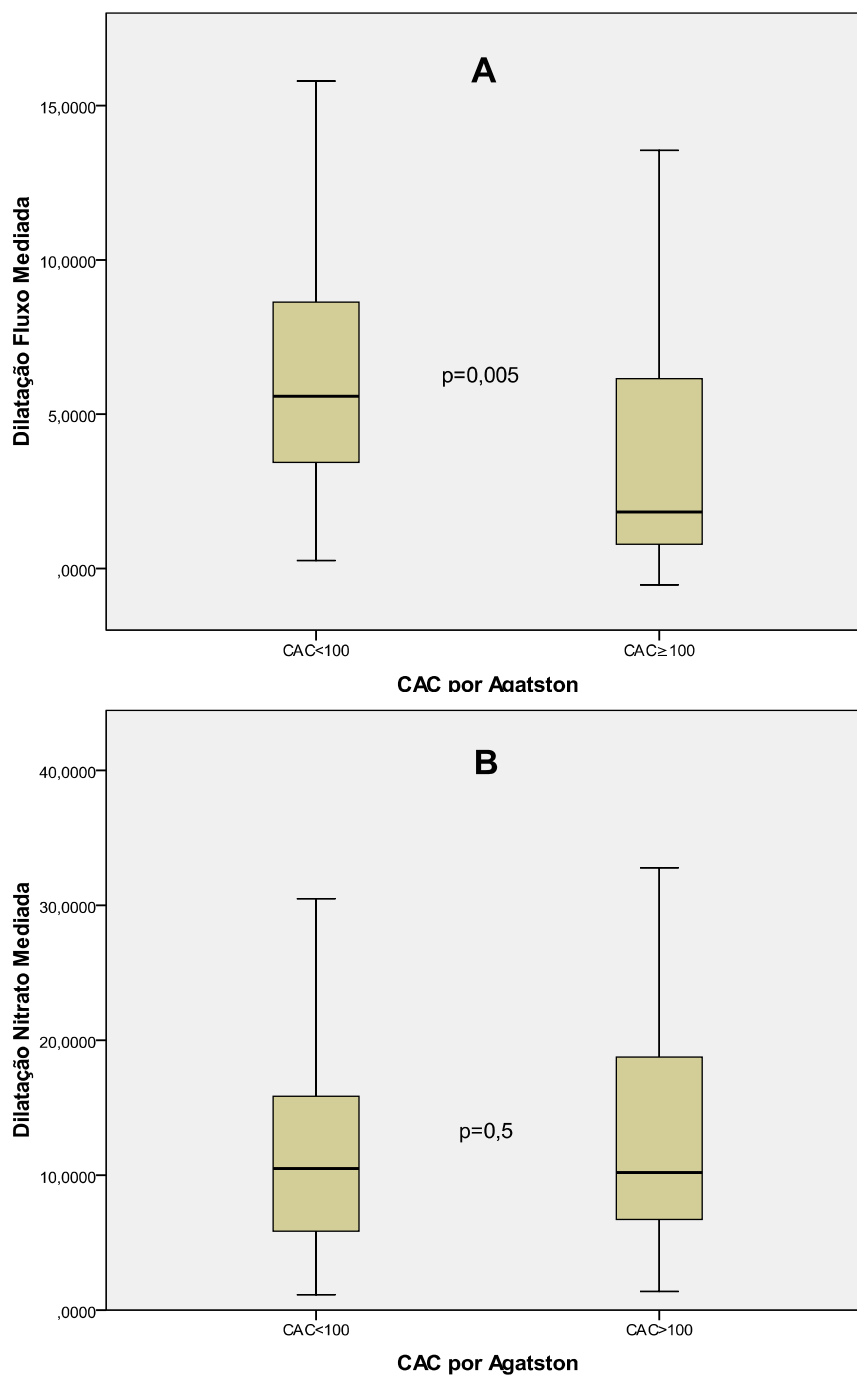


Figura 7 . Diferenças no IMT médio (A) e máximo (B) entre os grupos com CAC < ou ≥ 100 . A linha representa os valores máximos e mínimos. A barra representa o intervalo interquartil e a mediana.

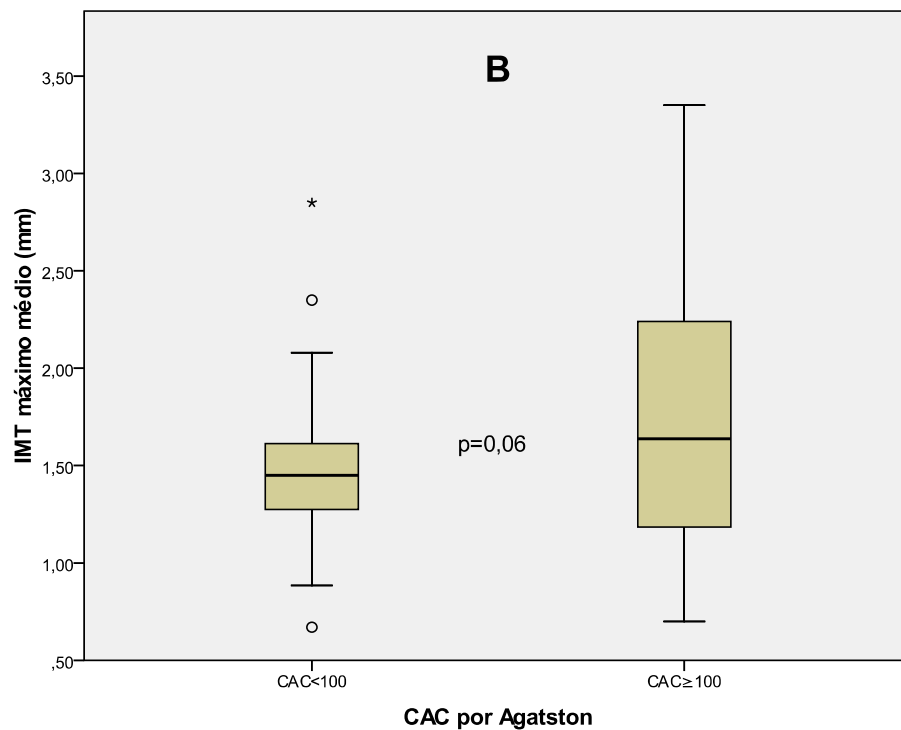
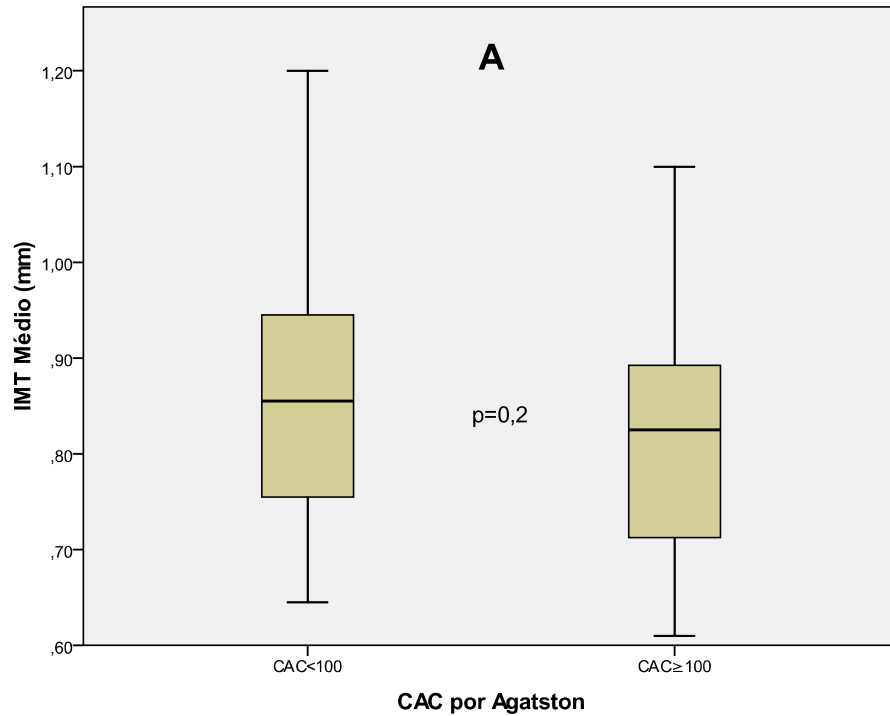


Tabela 5. Características dos indivíduos com CAC maior ou menor que 100

	CAC<100	CAC≥100	p	95% I.C. da diferença
n	80	98		
Idade, anos	84 ± 4	85 ± 4	0,2	-2,2 a 0,5
Gênero Masculino, %	18	31	0,08	
IMC, Kg/m²	25,2 ± 4,0	26,2 ± 4	0,1	-2,3 a 0,4
Cir. Abd, cm	92,3 ± 11,2	94 ± 11	0,2	-6 a 2
Gordura corporal, %	16,3 ± 3,8	17 ± 4	0,2	-2,2 a 0,5
DM tipo 2	20	26	0,5	
Duração do DM, anos	9(5;19)	11(4;25)	0,2	
HbA1c, %	6,0(5,7; 6,3)	6,0(5,7; 6,4)	0,8	-0,3 a 0,3
PAS, mmhg	147 ± 23	142 ± 18	0,1	-2 a 12
PAD, mmhg	75 ±12	76 ± 9	0,5	-5 a 3
FC, bpm	72 ± 13	73 ± 10	0,5	-5 a 3
HAS, %	80	72	0,3	
Duração da HAS,anos	14(9; 28)	30(15; 40)	0,3	-8,0 a 3,1
Anos de Menopausa	38 ± 8	40 ± 10	0,4	-7,0 a 3,9
MDRD estendida mL/min	69 ± 17,2	71 ± 19	0,5	-7,7 a 4,2
Apo. A, mg/dL	151 ± 26	151 ± 31	0,9	-9 a 9
Apo. B, mg/dL	81 ± 23,5	88 ± 28	0,1	-15,2 a 2,0
Triglicerídeo, mg/dL	122 ± 50	130 ± 55	0,3	-26 a 10
HDL Colesterol mg/dL	56 ± 14,7	53 ± 11	0,1	-1,2 a 7,3
LDL Colesterol mg/dL	110 ± 35,8	117 ± 40	0,2	-19 a 5,9
Uso de Estatina (%)	35	40	0,6	-
Meses de uso de Estatina	5 ± 3	4 ± 2	0,5	-1,4 a 2,5

Tabela 6. Metabolismo do cálcio, função arterial, espessamento médio intimal e atividade inflamatória dos indivíduos com CAC maior ou menor que 100

	CAC < 100	CAC ≥ 100	p	I.C. 95% da Diferença
DMO colo Fêmur, g/cm²	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,1	-0,6 a 0,008
DMO Lombar, g/cm²	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,1	-0,9 a 0,01
P.T.H., pg/mL	58 ± 23	57 ± 25	0,7	-6,9 a 9,0
F.A. Fração Óssea, %	30 ± 13,8	32 ± 15	0,9	-4,4 a 4,1
Cálcio, mg/dL	9 ± 0,4	9 ± 0,4	0,3	-2,4 a 0,7
Uso de bifosfonatos, %	24	17	0,3	
DFM, %	6,4 ± 4,1	3,5 ± 3,4	0,005	0,8 a 4,8
DNM, %	11,6 ± 7,5	12,8 ± 8,0	0,5	-5,2 a 2,9
IMT Máximo Médio, mm	1,4 ± 0,4	1,7 ± 0,6	0,06	-0,6 a 0,01
IMT Médio, mm	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,2	-0,03 a 0,1
Leucócitos/μL	6100 ± 1460	6373 ± 1621	0,064	-1007 a -2,2
Linfócitos/μL	1702 ± 535	1844 ± 636	0,1	-339 a 56
Monócitos/μL	516 ± 148	569 ± 166	0,04	-176 a -30
PCR, mg/dL	1,6(1,0; 2,6)	1,9(1,0; 4,0)	0,1	-0,9 a -0,03
Fibrinogênio, mg/dL	343 (300;404)	325 (302; 397)	0,9	-21 a 22
IL-10, pg/mL	2,3 (1,4; 3,9)	2,6 (2,2; 4,4)	0,2	-1,3 a 1,2
TNF-α, pg/mL	4,3 (1,6; 6,9)	5,4 (1,8; 7,6)	0,9	-2,9 a 3,8

8.4 Associação entre a presença de placas ateroscleróticas em carótidas e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas

Os indivíduos foram submetidos à avaliação ultrassonográfica de carótidas e foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de placas ateroscleróticas, definidas, conforme em Métodos. As características dos dois grupos estão apresentadas nas Tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7. Características clínicas na presença ou ausência de placas em carótidas.

	Presença de Placas	Ausência de Placas	P	I.C. 95% da Diferença
n				
Idade, anos	84 ± 4	83 ± 3	0,3	-1,05 a 3,07
Gênero Masculino,%	77	23	0,8	-
PAS, mmhg	146 ± 21	143 ± 18	0,5	-8,3 a 15
PAD, mmhg	76 ± 10	75 ± 11	0,8	-5,2 a 6,4
HAS, %	80	20	0,08	-
Duração HAS, anos	20 ± 17	21 ± 16	0,7	-13,3 a 10,3
MDRD estendida, mL/min	70 ± 22	72 ± 17	0,6	-14,5 a 9,3
Diabetes Mellitus, %	79	21	0,6	-
Duração DM, anos	14 ± 18	12 ± 9	0,8	-21,2 a 26,7
Glicemia, mg/dL	105 ± 51	117 ± 69	0,4	-44,4 a 21
HbA1c, %	6,1 ± 1	6,5 ± 2	0,3	-1,1 a 0,3
Circ. Abd, cm	91 ± 11	97 ± 12	0,04	-13,2 a -0,1
Gordura corporal, %	16,6 ± 4,5	18,2 ± 3,6	0,2	-4,1 a 0,8
Ex Tabagismo,%	87	13	0,2	-

Tabela 8. Características laboratoriais na presença ou ausência de placas em carótidas

	Presença de Placas	Ausência de Placas	<i>P</i>	I.C. 95% da Diferença
Apo. B, mg/dL	82 ± 24	85 ± 25	0,6	-17,2 a 11,3
Apo. A, mg/dL	148 ± 22	147 ± 29	0,9	-13,5 a 14,1
Triglicerídeo, mg/dL	131 ± 66	114 ± 49	0,3	-19,5 a 52,7
HDL Colesterol, mg/dL	54 ± 11	54 ± 15	0,9	-7,3 a 7,1
LDL Colesterol, mg/dL	112 ± 36	110 ± 42	0,8	-20 a 24
Uso de Estatina,%	48	39	0,6	-
Meses de estatina	5 ± 3	5 ± 3	0,9	-1,6 a 2,6
Leucócitos/μL	6192 ± 1551	5617 ± 1091	0,1	-266 a 1417
Linfócitos/μL	1811 ± 698	1546 ± 435	0,1	-108 a 637
Monócitos/μL	533 ± 122	476 ± 131	0,1	-15 a 129
TNF-α, pg/mL	5,0 (3,5; 9,1)	4,4 (1,6; 7,8)	0,8	-2,6 a 3,4
IL-10, pg/mL	2,4 (1,4; 4,8)	2,2 (0,6; 4,2)	0,2	-1,4 a 3,1
Fibrinogênio, mg/dL	330 (300; 390)	325 (302; 366)	0,9	-36,9 a 34,6
PCR, mg/dL	2,0 (1,0; 3,3)	2,0 (1,2; 2,7)	0,4	-5,1 a 1,0

Tabela 9. Presença de CAC e função arterial conforme a presença de placas em carótidas.

	Presença de Placas	Ausência de Placas	P	95% I.C da Diferença
CAC	302 ± 457	325 ± 514	0,8	-333 a 286
IMT Médio,mm	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7	-0,09 a 0,06
IMT máximo médio, mm	2,1 ± 0,8	1,3 ± 0,3	0,0001	0,4 a 1,1
DFM,%	5 ± 4	5 ± 6	0,9	-3 a 2,7
DNM,%	11 ± 7	12 ± 9	0,7	-5,2 a 3,9

A presença de placas ateroscleróticas em carótidas se associou dentre os parâmetros avaliados, apenas com a circunferência abdominal. Os indivíduos com presença de placas ateroscleróticas em carótidas apresentavam circunferência abdominal 7% menor que aqueles com ausência de placas ateroscleróticas. Não houve associação entre a presença de placas ateroscleróticas e DFM ou DNM, tão pouco entre a presença de placas ateroscleróticas e o IMT. Como também não houve associação entre a presença ou ausência de placas de aterosclerose e a extensão da calcificação coronariana e com a atividade inflamatória sistêmica medido pela PCR, IL10 e TNF α .

9.0 DISCUSSÃO

Os indivíduos estudados

A amostra estudada se caracterizou de indivíduos não institucionalizados, independentes para as atividades diárias, com atividade física acima da média nacional para indivíduos com mais de 65 anos, com a mediana da renda familiar elevada (R\$ 4000,00) e com média etária de $85 \pm 4,2$ anos, bem acima da expectativa média de vida do brasileiro que é de 78 anos. Os critérios de seleção determinaram uma amostra de indivíduos que não apresentavam desnutrição $IMC = 26,21 \pm 4,66$ kg/m², com níveis de colesterol total de 198 ± 41 mg/dL não diferindo dos níveis médios da população brasileira. Oitenta e sete por cento da amostra descreveu sua qualidade de vida como boa e muito boa. Na amostra a mediana do “mini mental score” (MMS) de 26 (22-28) demonstra preservada função cognitiva em um grupo com mediana de escolaridade de 8 (4-13) anos. Portanto a amostra selecionou indivíduos assintomáticos para doença cardiovascular, ativos fisicamente, com preservada função cognitiva, satisfeitos com sua qualidade de vida e de elevada renda familiar. Esse primeiro resultado garantiu a análise primária deste estudo que se baseia na seguinte questão: quais os parâmetros relevantes para prevenção primária no muito idoso?

9.1 Da associação entre os níveis de PCR e as demais características clínicas e laboratoriais estudadas

A avaliação da atividade inflamatória sistêmica estimada pela PCR plasmática mostrou associação independente dentre as diversas variáveis avaliadas apenas com Apo B e Leucócitos totais. Do ponto de vista biológico, sendo a Apo B a proteína constitutiva das lipoproteínas aterogênicas e inflamatórias como VLDL (Lipoproteínas de densidade muito baixas), IDL (Lipoproteínas de densidade intermediária) e LDL, é plenamente justificável a existência da associação. No entanto, o processo biológico que leva a lipoproteína carreadora de Apo B a aumentar a atividade inflamatória envolve uma série de etapas, numa cascata de eventos com diversos moduladores externos que fazem dessa uma associação freqüentemente não linear. Por exemplo, a LDL nativa necessita do estímulo de um *milieu* arterial pró-inflamatório para que se torne uma LDL modificada e assim ser capaz de promover inflamação. Os fatores de risco cardiovasculares como tabagismo, diabetes, hipertensão arterial sistêmica, síndrome metabólica e outros são os agentes modificadores da parede arterial que propiciam a geração de espécies reativas de oxigênio e outros modificadores essenciais à transformação do substrato, a LDL, em produto pró-inflamatório, a LDL modificada. Após o estímulo pró-inflamatório desta nova partícula modificada físico-quimicamente, a geração da atividade inflamatória local no interior da parede arterial levará a formação de mediadores, entre eles a IL-6 e o TNF, que por sua vez ativarão a resposta inflamatória sistêmica em seus múltiplos aspectos como leucocitose, monocitose e produção de proteínas de fase aguda como a PCR. Portanto, a tradução matemática deste modelo biológico é certamente não linear e provavelmente

não restrito a uma única curva de associação, mas sim um modelo complexo. A ausência de correlação entre o volume de lipoproteínas ricas em colesterol e a atividade inflamatória não é portanto, antagônica ao nosso presente achado. Em ambos, o elemento chance deve ser considerado pela dissociação entre a natureza biológica complexa deste fenômeno e seu tratamento matemático simplificado.

9.2 Da associação entre a calcificação coronariana e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas

A CAC na amostra estudada variou amplamente (0 a 3586) sendo 26 indivíduos com escore igual a zero. Este subgrupo de 13% da amostra representa indivíduos de excepcional fenótipo protetor para aterosclerose. Janowitz *et al* ³¹ encontraram 100% de prevalência de cálcio coronariano em indivíduos assintomáticos acima de 80 anos na sua amostra de 1898 indivíduos. A variável CAC foi expressa de maneira categórica em dois grupos \geq ou $<$ 100 do valor do escore de Agatston, ponto de corte identificado em estudos populacionais e indicado pela IV Diretriz Brasileira de Prevenção da Aterosclerose como indicador de risco cardiovascular ²⁹. A presença de CAC não se associou aos níveis de colesterol total e suas frações bem como as Apolipoproteínas. Este achado pode ser explicado pela freqüente perda da força de associação dos fatores de risco clássicos com a doença cardiovascular nos indivíduos idosos. Paramsothy *et.al* ³² demonstraram que de forma geral os níveis plasmáticos das lipoproteínas ricas em colesterol se associa a CAC. No entanto, eles também observaram que esta associação é menor nos indivíduos entre 75 a 84 anos que entre os indivíduos de 45 a 54 anos.

No presente estudo não encontramos diferenças significativas entre os grupos com CAC \geq ou $<$ 100 com relação às variáveis da DMO no colo de Fêmur ou coluna lombar. A osteoporose, representada pela DMO, e a CAC tem sido consideradas entidades distintas relacionadas ao processo de envelhecimento. No entanto, compartilham fatores de risco comuns como idade, *Diabetes Mellitus*, tabagismo, sedentarismo, insuficiência renal crônica, deficiência de Estrogênio e o volume plasmático de lipoproteínas modificadas. Muitos estudos, mas não todos, referem uma relação entre esses parâmetros dependente da idade. Grandes estudos de coorte como Framingham ³³, Rancho Bernardo ³⁴, Tomsø ³⁵ sugerem associação independente entre osteoporose e aterosclerose. No mais recente estudo ³⁶, um sub estudo da coorte multi étnico de Aterosclerose (MESA), 946 mulheres com idade média de 65 anos e 963 homens com idade média de 64 anos, livres de doença aterosclerótica manifesta, tiveram a DMO e a CAC avaliados por Tomografia Computadorizada. Mesmo após a aplicação do modelo de regressão logística incluindo idade, gênero, etnia, IMC, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, *diabetes mellitus*, tabagismo, consumo de álcool, atividade física, IL-6, PCR, homocisteína e hormônios sexuais, a DMO volumétrica se associou inversamente e independentemente à CAC em mulheres e à calcificação aórtica em homens. ³⁶. É possível, portanto, que haja entre a DMO e a CAC uma relação direta ou indireta por meio de novos fatores não conhecidos ou não testados neste modelo. No nosso estudo, é possível que a ausência de associação observada decorra da natureza hígida dos participantes. Nesta hipótese, entendemos que a calcificação dos tecidos não ósseos induz uma demanda das reservas de cálcio proporcional à sua

intensidade. A análise na fase ativa deste processo pode então flagrar o aumento de cálcio nestes tecidos e a redução do mesmo nos ossos. No entanto, a avaliação tardia pode simplesmente demonstrar a presença de calcificações em concomitância a um tecido ósseo restabelecido. Em consistência com esta hipótese, 13% da nossa amostra apresentou CAC igual a zero, 30% tiveram PCR menor ou igual a 1 g/L e 25% não tinham placas carotídeas.

Não encontramos associação entre CAC e os marcadores inflamatórios PCR, fibrinogênio, TNF- α e IL-10. No entanto, encontramos uma tendência a associação com o número de leucócitos e monócitos circulantes. A associação entre marcadores inflamatórios com a CAC permanece não bem estabelecida. Estudos prévios têm demonstrado desde nenhuma a apenas uma fraca associação.³⁷⁻³⁹

Wang *et al*³⁷ encontraram correlação positiva entre os níveis de PCR e a CAC em 321 indivíduos com idade média de 60 anos e livres de doença cardiovascular clinicamente aparente. No entanto dados do maior estudo até o presente que avaliou esta associação, o estudo MESA⁴⁰, numa amostra de 3.386 indivíduos com CAC>0 e com idade média de 66 \pm 10 anos, os níveis de PCR ou de fibrinogênio mesmo quando ajustados para os fatores de risco não apresentaram associação com CAC. Os autores concluem que a CAC e a presença de marcadores inflamatórios representam diferentes estados da aterosclerose. Em uma revisão sistemática da literatura, Hamirani *et al*⁴¹ não encontraram na maioria dos estudos associação entre a CAC e marcadores inflamatórios como PCR, fibrinogênio, IL-6, TNF- α , proteína quimiotática de Monócitos 1 (MCP-1) e naqueles em que a associação foi encontrada, não

observaram a utilização de modelos ajustados para fatores de risco como IMC e obesidade.

As razões desta ausência de associação não estão bem esclarecidas ainda que consistentes evidências relacionem PCR a eventos cardiovasculares. No entanto uma possibilidade é que a inflamação esteja mais fortemente relacionada à ruptura e trombose da placa do que o volume de placas ateroscleróticas ^{40, 41}. Apesar de não haver um consenso sobre se os aumentos nos níveis de marcadores inflamatórios se relacionam a presença e extensão da aterosclerose existe uma tendência a interpretar que as elevações dos marcadores inflamatórios estejam mais associadas a aumento da instabilidade da placa que a ao volume total de placas ateroscleróticas.

A avaliação da disfunção endotelial que esta relacionada aos fatores de risco como dislipidemia, tabagismo, diabetes, hipertensão arterial sistêmica é reconhecida como um dos marcadores mais precoces da doença aterosclerótica de modo que as anormalidades funcionais do endotélio precedem o desenvolvimento da placa aterosclerótica. No entanto poucos estudos avaliaram a associação entre disfunção endotelial e CAC. No nosso conhecimento, não existe trabalho avaliando esta associação em uma população de indivíduos muito idosos.

Na literatura médica os poucos estudos que avaliaram a associação entre a disfunção endotelial e calcificação coronariana apresentam resultados conflitantes ⁴²⁻⁴⁴. No nosso estudo, na avaliação da função endotelial, a média da DFM dos pacientes com CAC ≥ 100 foi 45% menor que a dos pacientes com CAC <100 ($p=0,005$). Isto demonstra que os indivíduos com maior carga aterosclerótica também

apresentam maior comprometimento sistêmico da função endotelial, achado consistente com alguns estudos prévios ^{42, 44}. Associação entre um fenômeno precoce, a disfunção endotelial, e outro tardio, a CAC, na aterogênese dificilmente pode ser feita por mecanismos diretos. A hiperemia reativa, técnica utilizada no nosso estudo para avaliar a vasodilatação endotélio-dependente, mede a dilatação máxima na artéria radial induzida por um estímulo isquêmico. Desta forma, além da produção de óxido nítrico pelo endotélio, contribuirão para o resultado a atividade simpática vascular ⁴⁵ e a rigidez da parede arterial. Assim, é possível que a redução da vasodilatação máxima encontrada nos nossos pacientes decorra da rigidez arterial e que esta seja então associada à CAC. Novos estudos estão sendo feitos para averiguar esta hipótese. Alternativamente, mediadores como a osteopontina e a osteoprotegerina envolvidos simultaneamente na calcificação vascular e na ativação inflamatória possam servir de mecanismo de associação deste achado. No presente, ambos os marcadores estão sendo mensurados no plasma congelado a -80°C dos pacientes desta coorte.

9.3 Da associação entre placas ateroscleróticas carotídeas e as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas.

A presença de placas ateroscleróticas carotídeas e a CAC têm sido usadas como indicadores subclínicos da presença de doença aterosclerótica coronariana e conforme mencionado acima, a reatividade braquial tem sido usada como o marcador das fases iniciais da doença aterosclerótica sistêmica. Ao nosso conhecimento,

nenhum estudo avaliou a correlação entre estes diversos métodos não invasivos em uma população de indivíduos com 80 ou mais anos.

No nosso estudo os indivíduos foram submetidos à avaliação ultrassonográfica de carótidas e foram divididos em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de placas ateroscleróticas e se avaliou a correlação entre as demais variáveis clínicas e laboratoriais estudadas. Não houve diferença entre os grupos em relação função endotelial fluxo mediado ou nitrato mediado. Estudos anteriores com as mesmas características corroboram estes achados. Yeboah *et al.*⁴⁶ avaliaram 2338 adultos com idade variando entre 72 a 98 anos o espessamento médio intimal e a dilatação fluxo mediada e após ajustes para as demais variáveis e fatores de risco os parâmetros avaliados de IMT e DFM não apresentaram correlação ($p=0,22$). Mesmo em populações mais jovens não houve correlação entre a DFM e IMT de carótidas como demonstrado por Yan *et al.*⁴⁷ após avaliarem 1.578 indivíduos sem antecedentes de doença aterosclerótica manifesta. No nosso estudo, também não observamos associação entre DFM e IMT.

No nosso estudo não houve correlação entre a presença de placa em carótida e os marcadores inflamatórios. Quando separamos, no entanto, os indivíduos pela mediana da PCR verificamos uma tendência a associação entre o IMT máximo e a PCR. A aterogênese sem sombra de dúvida está intimamente relacionada a um processo inflamatório local que por vezes é perceptível pela dosagem de marcadores inflamatórios sistêmicos. No entanto, a atividade inflamatória local ou sistêmica têm natureza dinâmica com intensificações e atenuações em curtos períodos de tempo e o mesmo não se verifica com as alterações estruturais ateroscleróticas na parede

arterial. Assim, é possível que em uma análise de corte transversal não se encontre essa associação pela interferência da variável tempo. Este aspecto deve ser considerado igualmente na prática clínica quando o processo decisório se debruça nos valores destas medidas. Um exemplo consistente com este argumento foi observado na Coorte Brasília que arrolou 370 pacientes com IAM com supradesnivelamento do segmento ST e somente em 30% destes casos a PCR de admissão foi superior a 1 g/L.

A CAC e IMT são marcadores não invasivos de doença vascular subclínica e ambos estão associados a eventos futuros. No entanto o uso do IMT como indicador de DAC tem merecido críticas, primordialmente pela freqüente demonstração da existência de uma fraca ou ausente associação entre IMT e DAC podendo apenas refletir apenas a dissociação temporal entre uma doença de manifestação sistêmica não uniforme.

10.0 CRÍTICAS

Pela característica transversal do nosso estudo não é possível estabelecer causalidade entre as associações encontradas. Apesar de ser nossa intenção avaliar quais os parâmetros relevantes para prevenção primária e as associações entre os diversos marcadores de doença aterosclerótica nos muito idosos. Uma possível crítica se deve ao viés de sobrevivência da população estudada. Como exemplo, o percentual de 12% da amostra não apresentar cálcio coronariano, indicando que a população estudada provavelmente pertence a um extremo do espectro de manifestação da doença cardiovascular. Contando ainda que variáveis não conhecidas ou não estudadas possam ter influenciado os resultados do presente estudo.

11.0 CONCLUSÃO

1-Na amostra estudada apenas Apo B e Leucócitos totais, dentre todos os parâmetros avaliados, mostraram de maneira independente influenciar a atividade inflamatória sistêmica estimada por PCR.

2- Na amostra estudada apenas a DFM e os monócitos apresentaram associação com a intensidade da CAC. Não apresentaram associação com a intensidade da CAC os valores da DMO e a atividade inflamatória sistêmica avaliada pelos marcadores PCR, IL10 e TNF α . Enquanto o IMT máximo apresentou apenas uma tendência de associação $p=0,06$ com a intensidade da CAC.

3- A presença de placas ateroscleróticas em carótidas se associou dentre os parâmetros avaliados, apenas com a circunferência abdominal. Os indivíduos com presença de placas ateroscleróticas em carótidas apresentavam circunferência abdominal 7% menor que aqueles com ausência de placas ateroscleróticas. Não houve associação entre a presença de placas ateroscleróticas e DFM ou DNM, não houve associação entre a presença de placas ateroscleróticas e CAC tão pouco entre a presença de placas ateroscleróticas e marcadores de inflamação estimados por PCR, fibrinogênio, IL10 e TNF α e entre o IMT.

12.0 REFERÊNCIAS

1. Kalache A, Keller I. The greying world: a challenge for the twenty-first century. *Sci Prog.* 2000;83 (Pt 1):33-54.
2. Iliescu ML, Zanoschi G. [Population aging and public health. The active aging concept]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* Jan-Mar 2005;109(1):120-123.
3. Yazdanyar A, Newman AB. The burden of cardiovascular disease in the elderly: morbidity, mortality, and costs. *Clin Geriatr Med.* Nov 2009;25(4):563-577, vii.
4. DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, et al. Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology.* Oct-Dec 2006;7(5-6):471-481.
5. Yan ZQ, Hansson GK. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev.* Oct 2007;219:187-203.
6. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* Aug 23 2002;91(4):281-291.
7. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol.* Dec 1 2009;54(23):2129-2138.

8. Plackett TP, Boehmer ED, Faunce DE, et al. Aging and innate immune cells. *J Leukoc Biol.* Aug 2004;76(2):291-299.
9. van Duin D, Shaw AC. Toll-like receptors in older adults. *J Am Geriatr Soc.* Sep 2007;55(9):1438-1444.
10. Panda A, Arjona A, Sapey E, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* Jul 2009;30(7):325-333.
11. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transpl Int.* Nov 2009;22(11):1041-1050.
12. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology.* Apr 2007;120(4):435-446.
13. Agarwal S, Busse PJ. Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol.* Mar;104(3):183-190; quiz 190-182, 210.
14. Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, et al. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell.* Aug 2004;3(4):161-167.
15. Hong YJ, Jeong MH, Ahn Y, et al. Age-related differences in intravascular ultrasound findings in 1,009 coronary artery disease patients. *Circ J.* Aug 2008;72(8):1270-1275.

16. Hong YJ, Jeong MH, Choi YH, et al. Age-related differences in virtual histology-intravascular ultrasound findings in patients with coronary artery disease. *J Cardiol.* Mar;55(2):224-231.
17. Qian J, Maehara A, Mintz GS, et al. Impact of gender and age on in vivo virtual histology-intravascular ultrasound imaging plaque characterization (from the global Virtual Histology Intravascular Ultrasound [VH-IVUS] registry). *Am J Cardiol.* May 1 2009;103(9):1210-1214.
18. Roger VL, Weston SA, Killian JM, et al. Time trends in the prevalence of atherosclerosis: a population-based autopsy study. *Am J Med.* Mar 2001;110(4):267-273.
19. Bandyopadhyay S, Bayer AJ, O'Mahony MS. Age and gender bias in statin trials. *Qjm.* Mar 2001;94(3):127-132.
20. Nair AP, Darrow B. Lipid management in the geriatric patient. *Endocrinol Metab Clin North Am.* Mar 2009;38(1):185-206.
21. van Bommel T, Gussekloo J, Westendorp RG, et al. In a population-based prospective study, no association between high blood pressure and mortality after age 85 years. *J Hypertens.* Feb 2006;24(2):287-292.
22. Rastas S, Pirttila T, Viramo P, et al. Association between blood pressure and survival over 9 years in a general

- population aged 85 and older. *J Am Geriatr Soc.* Jun 2006;54(6):912-918.
23. de Ruijter W, Westendorp RG, Assendelft WJ, et al. Use of Framingham risk score and new biomarkers to predict cardiovascular mortality in older people: population based observational cohort study. *Bmj.* 2009;338:a3083.
 24. Vliegenthart R, Oudkerk M, Hofman A, et al. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation.* Jul 26 2005;112(4):572-577.
 25. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* Sep 2007;14 Suppl 2:S1-113.
 26. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, et al. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert

- Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography). *Circulation*. Jan 23 2007;115(3):402-426.
27. Raggi P, Gongora MC, Gopal A, et al. Coronary artery calcium to predict all-cause mortality in elderly men and women. *J Am Coll Cardiol*. Jul 1 2008;52(1):17-23.
 28. Gottdiener JS, Bednarz J, Devereux R, et al. American Society of Echocardiography recommendations for use of echocardiography in clinical trials. *J Am Soc Echocardiogr*. Oct 2004;17(10):1086-1119.
 29. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, et al. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. *Arq Bras Cardiol*. Apr 2007;88 Suppl 1:2-19.
 30. Martinez TL, Santos RD, Armaganijan D, et al. National alert campaign about increased cholesterol: determination of cholesterol levels in 81,262 Brazilians. *Arq Bras Cardiol*. Jun 2003;80(6):635-638, 631-634.
 31. Janowitz WR, Agatston AS, Kaplan G, et al. Differences in prevalence and extent of coronary artery calcium detected by ultrafast computed tomography in asymptomatic men and women. *Am J Cardiol*. Aug 1 1993;72(3):247-254.
 32. Paramsothy P, Katz R, Owens DS, et al. Age-modification of lipoprotein, lipid, and lipoprotein ratio-associated risk for

- coronary artery calcium (from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis [MESA]). *Am J Cardiol.* Feb 1;105(3):352-358.
33. Kiel DP, Kauppila LI, Cupples LA, et al. Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcif Tissue Int.* May 2001;68(5):271-276.
 34. Bakhireva LN, Barrett-Connor EL, Laughlin GA, et al. Differences in association of bone mineral density with coronary artery calcification in men and women: the Rancho Bernardo Study. *Menopause.* Nov-Dec 2005;12(6):691-698.
 35. Jorgensen L, Joakimsen O, Rosvold Berntsen GK, et al. Low bone mineral density is related to echogenic carotid artery plaques: a population-based study. *Am J Epidemiol.* Sep 15 2004;160(6):549-556.
 36. Hyder JA, Allison MA, Wong N, et al. Association of coronary artery and aortic calcium with lumbar bone density: the MESA Abdominal Aortic Calcium Study. *Am J Epidemiol.* Jan 15 2009;169(2):186-194.
 37. Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. C-reactive protein is associated with subclinical epicardial coronary calcification in men and women: the Framingham Heart Study. *Circulation.* Sep 3 2002;106(10):1189-1191.

38. Reilly MP, Wolfe ML, Localio AR, et al. C-reactive protein and coronary artery calcification: The Study of Inherited Risk of Coronary Atherosclerosis (SIRCA). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 1 2003;23(10):1851-1856.
39. Hunt ME, O'Malley PG, Vernalis MN, et al. C-reactive protein is not associated with the presence or extent of calcified subclinical atherosclerosis. *Am Heart J.* Feb 2001;141(2):206-210.
40. Jenny NS, Brown ER, Detrano R, et al. Associations of inflammatory markers with coronary artery calcification: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* Mar;209(1):226-229.
41. Hamirani YS, Pandey S, Rivera JJ, et al. Markers of inflammation and coronary artery calcification: a systematic review. *Atherosclerosis.* Nov 2008;201(1):1-7.
42. Huang PH, Chen LC, Leu HB, et al. Enhanced coronary calcification determined by electron beam CT is strongly related to endothelial dysfunction in patients with suspected coronary artery disease. *Chest.* Aug 2005;128(2):810-815.
43. Kullo IJ, Malik AR, Bielak LF, et al. Brachial artery diameter and vasodilator response to nitroglycerine, but not flow-mediated dilatation, are associated with the presence and

- quantity of coronary artery calcium in asymptomatic adults. *Clin Sci (Lond)*. Feb 2007;112(3):175-182.
44. Ramadan MM, Mahfouz EM, Gomaa GF, et al. Evaluation of coronary calcium score by multidetector computed tomography in relation to endothelial function and inflammatory markers in asymptomatic individuals. *Circ J*. May 2008;72(5):778-785.
 45. Negrao CE, Hamilton MA, Fonarow GC, et al. Impaired endothelium-mediated vasodilation is not the principal cause of vasoconstriction in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jan 2000;278(1):H168-174.
 46. Yeboah J, Burke GL, Crouse JR, et al. Relationship between brachial flow-mediated dilation and carotid intima-media thickness in an elderly cohort: the Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. Apr 2008;197(2):840-845.
 47. Yan RT, Anderson TJ, Charbonneau F, et al. Relationship between carotid artery intima-media thickness and brachial artery flow-mediated dilation in middle-aged healthy men. *J Am Coll Cardiol*. Jun 21 2005;45(12):1980-1986.