

**VALDERILIO FEIJÓ AZEVEDO**

**DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, ATEROSCLEROSE E  
ATIVIDADE DE DOENÇA NA ESPONDILITE  
ANQUILOSANTE**

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientador: Dr Roberto Pecoits-Filho**

**Curitiba**

**2012**

**VALDERILIO FEIJÓ AZEVEDO**

**ENDOTHELIAL DYSFUNCTION, ATHEROSCLEROSIS AND  
DISEASE ACTIVITY IN ANKYLOSING SPONDYLITIS**

**Orientador: Dr Roberto Pecoits-Filho**

**Curitiba**

**2012**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos pacientes com Espondilite Anquilosante que participaram dos estudos clínicos desta linha de pesquisa. A eles devo quase todo o meu aprendizado sobre esta enfermidade.

Ao amigo e Professor Dr Roberto Pecoits-Filho pelas idéias iniciais, estímulos científicos freqüentes, sugestões e orientação desta tese de doutoramento.

A todos os meus alunos da Iniciação Científica em Espondiloartrites da UFPR que ajudaram nas coletas de dados clínicos e laboratoriais e na constante revisão de literatura, mas principalmente: Pedro Grachinski Buiar, Pedro Gabriel Lorencetti, Lucio Ricardo Hyurko Felipe e Wagner Peitl Miller.

A Dra Andrea Marques Stinghen por toda a avaliação laboratorial relacionada aos marcadores de disfunção endotelial.

A Dra Márcia Olandoski Ermano, pelo tratamento estatístico dos dados clínicos e laboratoriais.

Ao Dr José Rocha Faria-Neto pelo apoio e estímulos a produção científica relacionada a associação entre espondiloartrites e doença cardiovascular.

Aos meus filhos Gianluca e Giancarlo e á minha esposa e amiga Luciane pela paciência e apoio durante todo o processo dos estudos clínicos gerados por esta linha de pesquisa.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AINH- Antiinflamatório Não Hormonal**
- ANTI-TNF – *Anti-Tumor Necrosis Factor* - Anti TNF Alfa**
- ASQoL- *Ankylosing Spondylitis Quality of Life* – Índice de Qualidade de Vida de Espondilite Anquilosante**
- ASDAS- *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score* – Escore de Atividade de Doença na Espondilite Anquilosante**
- ATS – *Atherosclerosis* - Aterosclerose**
- BASDAI- *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*- Índice de Atividade de Doença na Espondilite Anquilosante**
- BASFI- *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index* – Índice Funcional na Espondilite Anquilosante**
- BASMI- *Bath Ankylosing Spondylitis Metrologic Index* – Índice Metrológico na Espondilite Anquilosante**
- BH4- Tetrahidrobiopterina**
- ECXCL8 - *Neutrophil Chemotactic Factor 8* - Interleucina 8**
- EA- Espondilite Anquilosante**
- EIM- Espessamento Íntima-Média**
- eNOS – *Endothelial Nitric Oxide Synthase* – Sintase Endotelial do Óxido Nítrico**
- ET 1 – Endotelina 1**
- FAD – *Flavine Adenine Dinucleotide* - Dinucleotídeo de Flavina Adenina**
- HDL – *High Density Lipoprotein* - Lipoproteína de Alta Densidade**
- HLA-B27 – *Human Leukocyte Antigen B27*- Antígeno de Histocompatibilidade B27**
- I-CAM - *Intercellular Adhesion Molecule 1* – Molécula 1 de Adesão Intercelular**
- IL 8 – *Neutrophil Chemotactic Factor 8* - Interleucina 8**
- IMT- *Intima Media Thickness* – Espessura Íntima Média**
- LDL – *Low Density Lipoprotein* – Lipoproteína de Baixa Densidade**
- LDL-ox – *Oxidized Low density Lipoprotein* – Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada**
- MCP-1 - *Monocyte Chemoattractant Protein-1* – Proteína Quimioatrativa de Monócitos 1**

**NADPH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase* - Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina**

**NO- *Oxid Nitric* - Oxido Nitrico**

**NFk B - *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells* – Fator Nuclear de Ativação de Células B**

**PCR- Proteína C Reativa**

**ROS- *Reactive Oxygen Species* - Espécies Reativas de Oxigênio**

**tPA – *Tissue Plasminogen Activator*- Fator Ativador do Plasminogênio Tecidual.**

**TG- Triglicerídeos**

**TGF  $\beta$  1– *Transforming Growth Factor Beta 1* – Fator Transformador de Crescimento Beta 1**

**V-CAM 1 - *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* – Molécula 1 de Adesão Célula Vascular Celular 1**

**VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* – Fator de Crescimento Vascular Endotelial**

**VLDL - *Very-Low-Density Lipoprotein* – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade**

## TABELAS E FIGURAS

Figura 1. A.Coluna em bambú (AP e Perfil) e B. Sacroiliíte bilateral. Imagem do livro Espondilite Anquilosante : Ontem e Hoje. Cedida pelo autor.....	2
Figura 2.Resumo das Funções Regulatórias do Endotélio.....	13
Figura 3. FMD – Avaliação pela artéria braquial.....	19
Figura 4. IMT - Quantificação da espessura Intima Média por Ultrassonografia.....	21
Figura 5. Atividades Biológicas da IL 8.....	32
Figura 6. Disfunção endotelial e Inflamação( modelo na EA).....	38

.

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 ESPONDILITE ANQUILOSANTE.....	1
1.1.1 Quadro clínico, diagnóstico e Avaliação.....	1
1.1.2 Tratamento da Espondilite Anquilosante.....	4
1.2 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, MARCADORES, TECNICAS DE AVALIAÇÃO E ATEROSCLÉROSE .....	8
1.2.1 Endotélio - conceitos básicos.....	8
1.2.2 Funções do endotélio.....	9
1.2.3 Fatores vasodilatadores derivados do endotélio.....	10
1.2.4 Fatores vasoconstritores derivados do endotélio.....	12
1.2.5 Disfunção Endotelial.....	14
1.2.6 Avaliação clínica da função endotelial.....	16
1.2.7 Técnicas de avaliação de dano endotelial.....	20
1.2.8 Aterosclerose.....	23
1.2.8.1 Etiopatogenia e Fisiopatogenia.....	23
1.2.8.2 Lipoproteínas oxidadas e inflamação.....	23
1.2.8.3 Dislipidemia e inflamação.....	24
1.2.8.4 Hipertensão e inflamação.....	24
1.2.8.5 Diabetes e inflamação.....	25
1.2.8.6 Obesidade e inflamação.....	25
1.2.8.7 Tabagismo e inflamação.....	26
1.2.8.8 Infecção e inflamação.....	26
1.2.8.9 Marcadores de dano endotelial.....	29
1.2.8.9.1 MCP-1.....	29

1.2.8.9.2 VCAM-1 e ICAM-1.....	29
1.2.8.9.3 Fetuina-A.....	30
1.2.8.9.4 IL-8.....	31
<b>1.3 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E ATEROSCLEROSE NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE.....</b>	<b>33</b>
<b>2.HIPÓTESE.....</b>	<b>39</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
3.1OBJETIVO GERAL.....	40
3.2OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>4. RESUMOS DOS ARTIGOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 IL-8 EM ASSOCIAÇÃO COM ATIVIDADE DE DOENÇA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE SEM TRATAMENTO COM AGENTES ANTI-TNF.....	41
4.2 IL-8 IN ASSOCIATION WITH DISEASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS WITHOUT TREATMENT WITH ANTI-TNF AGENTS.....	42
4.3 AVALIAÇÃO DE ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE LDL MINIMAMENTE MODIFICADA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E SUA CORRELAÇÃO COM BASDAI.....	54
4.4 EVALUATION OF SUB-CLINICAL ATHEROSCLEROSIS AND PLASMA LEVELS OF MINIMALLY MODIFIED LDL IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS AND ITS CORRELATION WITH BASDAI.....	55

<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>86</b>
A. ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO 1. ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS.....	86
B. RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS.....	92
<b>B.1 AVALIAÇÃO DE ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE LDL MINIMAMENTE MODIFICADA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E SUA CORRELAÇÃO COM ATIVIDADE DE DOENÇA.....</b>	<b>92</b>
<b>B.2. IL 8 MAS NÃO OUTROS BIOMARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL ESTÁ ASSOCIADA COM ATIVIDADE DE DOENÇA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE SEM TRATAMENTO COM AGENTES ANTI-TNF .....</b>	<b>93</b>
C CARTA DE APROVAÇÃO CEP.....	94
D. TERMO DE CONSENTIMENTO.....	95
E. FICHA CLINICA DA AVALIAÇÃO DE PACIENTES - REGISTRO BRASILEIRO DE ESPONDILOARTRITES.....	100



## 1. INTRODUÇÃO

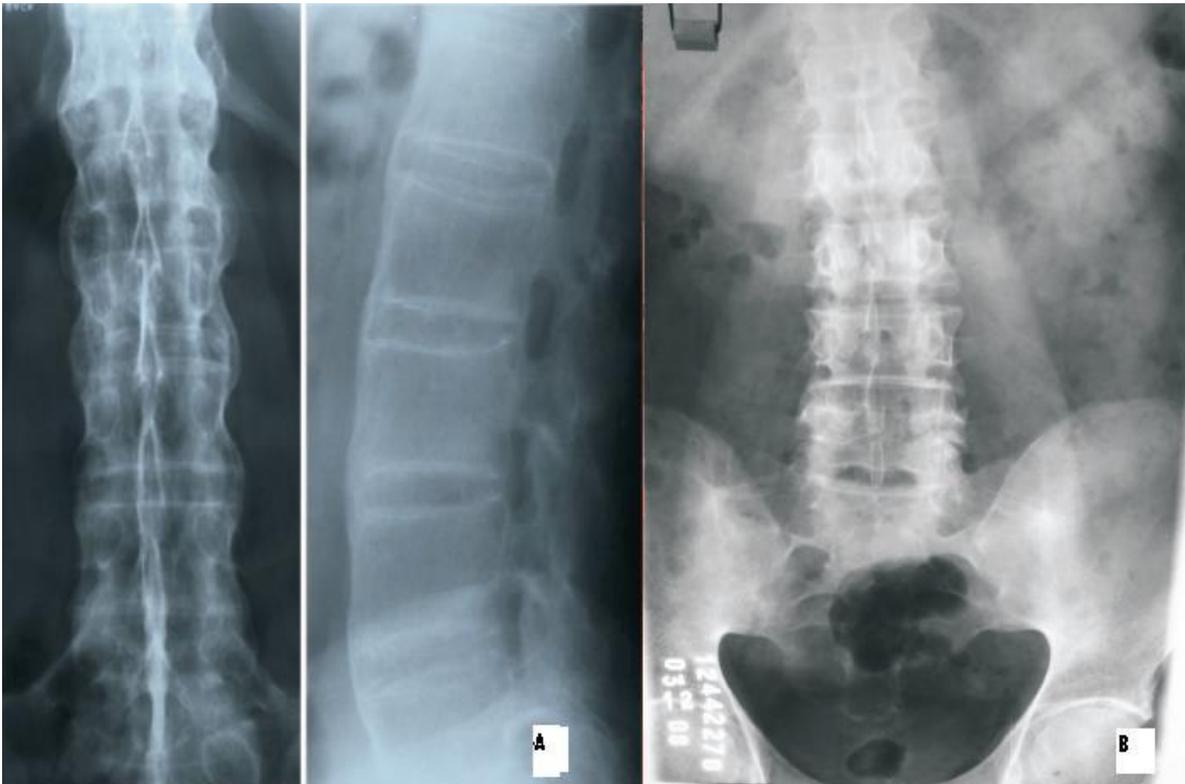
### 1.1 ESPONDILITE ANQUILOSANTE

#### 1.1.1 Quadro Clínico, diagnóstico e avaliação

A etimologia do termo espondilite anquilosante (“espondilo” = vértebra e “anquiose” = fusão) traduz a marcante característica da Espondilite Anquilosante (EA), uma doença inflamatória crônica de etiologia autoimune que acomete preferencialmente a coluna vertebral, podendo evoluir com rigidez e limitação funcional progressiva do esqueleto axial <sup>(1,2)</sup>. É uma enfermidade mais freqüente em adultos jovens, com idade de início geralmente entre a 20 e 40 anos. Há uma prevalência maior em indivíduos do sexo masculino (3:1), caucasianos e HLA-B27 positivos <sup>(2,3)</sup>. O HLA-B27 está fortemente correlacionado ao aparecimento da doença e sua positividade é encontrada em 80% a 98% dos casos<sup>(4)</sup>. A EA faz parte do complexo das Espondiloartrites, sendo o seu protótipo.

O quadro clínico inicial mais comum é uma lombalgia de ritmo inflamatório associada a rigidez matinal <sup>(1,2)</sup>. As articulações mais precocemente envolvidas na EA são as sacroilíacas. A doença articular evolui geralmente de forma progressiva e ascendente em direção à coluna torácica e cervical, podendo também afetar as articulações periféricas. No esqueleto axial promove ossificações ligamentares, fusão de vértebras (coluna em bambú) e osteoporose, resultando em uma coluna vertebral enfraquecida, remodelada, com forte tendência a fraturas e deformações <sup>(1,5)</sup>. Fig 1.

**Figura 1. A.Coluna em bambu(AP e Perfil) e B. Sacroiliíte bilateral**



A EA pode cursar com diversas manifestações extraarticulares como uveítes, entesites, manifestações cardiovasculares, pulmonares, renais, gastrointestinais e neurológicas. A mais freqüente é a uveíte anterior aguda, unilateral, recorrente, que se pode observar em até 40% dos pacientes num seguimento prolongado. Geralmente está associada á presença do HLA-B27 e raramente deixa seqüelas<sup>(6)</sup>.

As entesites são caracterizadas por inflamações nas inserções dos tendões e/ou ligamentos nos ossos e acometem preferencialmente a inserção de tendão de Aquiles e a fáschia plantar <sup>(1)</sup>.

Os pulmões podem sofrer alterações fibróticas infiltrativas em lobos superiores, que simulam muitas vezes a tuberculose. A fibrose nos ápices pulmonares ocorre em até 30 por cento dos casos e as formações císticas são menos freqüentes e observadas em casos avançados. A colonização dessas cavidades é uma complicação rara<sup>(7)</sup>.

A associação entre nefropatias e EA está bem documentada. Sua incidência variava entre 10-18% nos primeiros estudos<sup>(8,9)</sup>, sendo a amiloidose secundária a causa mais comum (62%), seguida pela nefropatia por IgA (30%), glomerulonefrite mesangioproliferativa (5%), nefropatia membranosa (1%) e glomerulonefrite proliferativa focal (1%)<sup>(10, 11)</sup>. A amiloidose tipo AA, fenômeno raro com poucos casos descritos na literatura, também foi encontrada em portadores de EA<sup>(12)</sup>.

Até 60% dos pacientes com EA podem apresentar inflamação intestinal em cólon ou íleo, geralmente assintomática, detectada por endoscopia<sup>(13,14)</sup>. A forte ligação entre o trato gastrointestinal e o sistema osteoarticular é sugerida por muitos estudos clínicos e experimentais, particularmente aqueles relacionados a presença do HLA-B27<sup>(15)</sup>.

Complicações neurológicas são descritas em até 2,1% dos pacientes com o diagnóstico de EA<sup>(16)</sup>. A síndrome da cauda equina, uma das mais temíveis complicações neurológicas, é caracterizada por seu início insidioso, progressão lenta, e elevada incidência de ectasia dural na coluna lombossacra<sup>(17)</sup>.

A alta prevalência de mortalidade cardiovascular na EA tem conduzido muitos pesquisadores a investigar diversos fatores de risco possivelmente envolvidos no aparecimento de doenças cardiovasculares nesta enfermidade. Em 1973, Bulkley e Roberts publicaram uma descrição de insuficiência aórtica e cardiomegalia em necropsias de pacientes com EA.<sup>(18)</sup> Desde o início da década passada sabe-se que de fato, a morbimortalidade cardiovascular de pacientes com EA está aumentada quando comparada a da população geral<sup>(19)</sup>. O risco cardiovascular em doenças autoimunes é claramente multifatorial, mas, entre os mecanismos envolvidos, a aterogênese acelerada causada pela resposta inflamatória sistêmica parece ser um dos mais importantes. Esse mecanismo tem sido demonstrado na artrite reumatóide (AR) e no lúpus eritematoso sistêmico (LES)<sup>(20-22)</sup>.

Para a confirmação diagnóstica da EA, os critérios mais utilizados são os de Nova Iorque modificados, que combinam critérios clínicos e radiográficos<sup>(1)</sup>. Assim, para o diagnóstico de EA, faz-se necessária a presença de um critério clínico e um critério radiográfico<sup>(23)</sup>. Contudo, uma das limitações destes critérios está no fato de que somente identifique pacientes com doença articular mais avançada por causa da necessidade do critério radiológico.

Nas últimas décadas diversos instrumentos foram propostos para tornar mais objetiva e padronizada a avaliação clínica de pacientes com EA,. devido ao surgimento de novas e mais eficazes medicações.

Em 1994, *Garret et al.* apresentaram um questionário a fim de avaliar a atividade da EA <sup>(24)</sup>. O teste BASDAI é um questionário que consiste em seis questões que abordam domínios relacionados à fadiga, dor na coluna, dor e sintomas articulares, dor devido ao acometimento das enteses, e duas questões relacionadas à qualidade e quantidade de rigidez matinal. O escore é medido em escalas visuais analógicas (EVA) de 0 a 10 (0 = bom; 10 = ruim). Atualmente é considerado um dos mais importantes instrumentos para a utilização em ensaios clínicos <sup>(25)</sup>.

Em 1994, *Callin et al.* publicaram o BASFI, questionário que objetiva a avaliação da limitação de funcionalidade presente nos pacientes de EA. O teste inclui oito itens relacionados a atividades da vida diária e dois itens que medem as habilidades do paciente em lidar com o seu dia-a-dia <sup>(26)</sup>.

Ambos os critérios, BASFI e BASDAI, foram bem aceitos pela praticidade, funcionalidade, reprodutibilidade e sensibilidade para apreciar as características da EA e sua evolução. Muitos países já fizeram a validação desse método de acordo com sua língua, assim como o Brasil. <sup>(27, 28)</sup>

Pela importância da avaliação da qualidade de vida como medida de desfecho em estudos clínicos, questionários como o ASQoL têm sido cada vez mais utilizados. O teste engloba 18 questões com resposta sim ou não, resultando em um escore de 0 a 18, com o maior valor implicando em uma pior qualidade de vida. É o único desenvolvido originalmente para a medida específica de qualidade de vida em EA <sup>(25,29)</sup>. O ASDAS é um escore mais específico do que o BASDAI e tem sido utilizado em pesquisas clínicas. Aos poucos seu uso vem se incorporando à prática clínica diária. Este escore utiliza em sua fórmula logarítmica questões do BASDAI associadas a avaliação de dor e atividade inflamatória medida por PCR ou VHS <sup>(25)</sup>.

### 1.1.2 Tratamento da Espondilite Anquilosante

O tratamento da EA fundamenta-se no alívio sintomático, na melhora da capacidade funcional, na redução de acometimentos extra-articulares e na

prevenção de deformidades articulares e suas complicações. Inicial e fundamentalmente, deve-se orientar o paciente a respeito de sua doença, amparando-o psicologicamente para uma perfeita integração com a sociedade. Deve-se esclarecer que embora a doença seja crônica, atualmente apresenta boas perspectivas terapêuticas. A agregação familiar costuma ser mais comum em famílias de pacientes HLA-B27 positivo<sup>(1)</sup>.

A fisioterapia é de grande importância na abordagem geral para pacientes com EA<sup>(30)</sup>. Notadamente os programas de exercícios supervisionados podem ser utilizados de maneira sistemática em todos os estágios da doença, já que os seus benefícios na prevenção de limitações funcionais e na restauração de uma adequada mobilidade articular são observados especialmente no período em que o paciente os realiza<sup>(31)</sup>.

Os AINHs são considerados terapia de primeira linha, sendo recomendados a todos pacientes sintomáticos com EA. São particularmente efetivos no controle da dor e rigidez da doença, podendo retardar a progressão radiográfica da doença. Não existem trabalhos evidenciando que uma classe de determinado AINH se mostre superior a outra na comparação direta<sup>(32)</sup>.

Deve-se evitar o uso de glicocorticóides sistêmicos nos pacientes espondilíticos, pois além de não melhorarem satisfatoriamente os sintomas, podem ainda piorar a desmineralização óssea intrínseca da doença e predispor às fraturas vertebrais<sup>(33,34)</sup>. Reserva-se o uso de corticosteróides a casos específicos. Em pacientes com artrite periférica persistente, o uso de prednisona, na dose de 10 mg/dia (ou equivalente) deve ser intermitente, enquanto houver atividade de doença<sup>(35)</sup>. A metilprednisolona pode ser usada por via endovenosa em casos muito sintomáticos<sup>(36)</sup>. O uso de corticosteróides por via intra-articular pode ser uma alternativa em casos de artrite persistente ou sacroiliíte refratária<sup>(37)</sup>.

A sulfasalazina, na dose de 30 a 50 mg/kg/dia, apresenta resposta mais significativa na artrite periférica<sup>(38)</sup> e na prevenção de surtos recorrentes de uveíte<sup>(39)</sup>.

O metotrexato, apesar de ainda ser amplamente utilizado, não apresenta evidências de eficácia na doença axial<sup>(40)</sup>. Na dose de 7,5 a 25 mg semanal, por via oral ou intramuscular, apresenta melhor resposta nos pacientes com EA que apresentem comprometimento periférico<sup>(41)</sup>.

Observou-se discreto benefício clínico com o uso de leflunomida, talidomida e pamidronato. Quanto a leflunomida, houve ausência de eficácia, mesmo na doença periférica<sup>(42)</sup>. Os estudos iniciais, isolados e com pequenas casuísticas, com a talidomida<sup>(43)</sup> e com o pamidronato<sup>(44)</sup> sugeriram resultados promissores. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para estabelecer os reais riscos e benefícios do uso de drogas modificadoras de curso de doença a médio e longo prazo na EA<sup>(42)</sup>.

O uso de agentes biológicos bloqueadores do TNF $\alpha$  tem demonstrado melhora na evolução radiográfica e de indicadores objetivos e subjetivos, mesmo em pacientes com longa duração de doença. Estão indicados para pacientes que não obtiveram resposta com o uso de pelo menos dois diferentes AINH, por um período mínimo de tratamento de 3 meses, e que apresentam envolvimento articular periférico proximal (quadril e ombros) ou distal (demais articulações periféricas)<sup>(45)</sup>. Os atuais medicamentos anti-TNF aprovados no Brasil para o tratamento da EA são o infliximabe, o etanercepte, o adalimumabe e o golimumabe. Os quatro tratamentos são clinicamente eficazes em relação à avaliação da ASAS, BASDAI e BASFI<sup>(46)</sup>. Entretanto, efeitos adversos sérios desses medicamentos são descritos na literatura: infecções graves (principalmente tuberculose disseminada), distúrbios desmielinizantes, piora de insuficiência cardíaca congestiva, aparecimento de auto-anticorpos para Lúpus Eritematoso Sistêmico, reações de hipersensibilidade e doença hepática grave.

O infliximabe (anticorpo quimérico monoclonal contra TNF alfa) é uma medicação de uso endovenoso, que requer que sua administração seja realizada em centros de infusão com equipe médica experiente no acompanhamento destes casos. Recomenda-se a dose de 3 a 5 mg/kg, apresentando um esquema de ataque (doses a 0, 2 e 6 semanas) e outro de manutenção, a cada 6 a 8 semanas. O Infliximabe é efetivo no controle da atividade da doença<sup>(47)</sup>, na redução dos índices laboratoriais<sup>(48)</sup>, na redução da inflamação axial detectada na ressonância nuclear magnética<sup>(49)</sup>, na melhora da qualidade de vida<sup>(50)</sup>, na redução do uso de AINH<sup>(51)</sup> e na redução da incidência de uveíte anterior<sup>(52)</sup>.

O etanercepte (receptor solúvel do TNF) atualmente é utilizado na dose de 50 mg, via subcutânea, uma vez por semana, sendo efetivo na melhora da dor e função articulares e na qualidade de vida<sup>(53)</sup>, na redução dos índices laboratoriais<sup>(54)</sup> e de biomarcadores de degradação cartilaginosa<sup>(55)</sup>, além de diminuir a inflamação axial

detectada pela ressonância nuclear magnética<sup>(56)</sup> e a incidência de uveíte anterior<sup>(57)</sup>. O etanercepte também pode ser utilizado na dose de 25mg SC duas vezes por semana.<sup>(58)</sup>

O adalimumabe (anticorpo monoclonal totalmente humano contra o TNF), é recomendado na dose de 40 mg, por via subcutânea, a cada duas semanas, apresentando melhora nos parâmetros clínicos e de imagem<sup>(59)</sup>. Sua eficácia é sustentada a curto, médio e longo prazo, mas pode levar à recidiva se suspenso abruptamente, o que subentende que seu uso deve ser por tempo prolongado e sua diminuição de doses deve ser gradativa.

Dois novos agentes anti-TNF, golimumabe e certolizumabe peguilado, já disponíveis no Brasil, apresentam bons resultados a partir de ensaios clínicos. O Golimumabe demonstrou eficácia significativa, quando administrado por via subcutânea uma vez a cada quatro semanas. Tem sido geralmente bem tolerado em estudos clínicos e seu perfil de segurança é comparável ao de outros anti-TNF.<sup>(60)</sup> O Certolizumabe peguilado embora aprovado somente para tratamento de Artrite Reumatóide e Doença de Crohn, demonstrou bons resultados de fase II na EA e seus estudos de fase III estão em andamento.

O tratamento da EA representa um encargo considerável para o Brasil. É extremamente importante a realização de estudos que avaliem os custos das doenças crônicas, especialmente nas nações em desenvolvimento, a fim de determinar a melhor forma de alocar os recursos já escassos nestas regiões<sup>(61)</sup>.

## 1.2 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, MARCADORES, TECNICAS DE AVALIAÇÃO E ATEROSCLEROSE

### 1.2.1 Endotélio - conceitos básicos

O endotélio é avaliado atualmente como o principal regulador da homeostase vascular. Ele é constituído por uma camada única de células que possui um variado número de funções, sendo capaz de responder a sinais físicos e químicos produzidos por fatores que regulam o tônus vascular, a adesão celular, a trombólise, a proliferação de células musculares lisas e a inflamação da parede do vaso. Quando saudável, tem função protetora contra o desenvolvimento de lesões vasculares, mas uma vez disfuncional, torna-se o elemento chave no processo de aterogênese.

A valorização do papel do endotélio na patogênese de lesões vasculares tem conduzido muitos estudiosos a buscarem novos métodos para se testar diferentes aspectos da função endotelial e meios de se quantificar o dano endotelial e suas complicações clínicas.

O endotélio mantém a estrutura da parede vascular e atua como barreira física à circulação de moléculas e mesmo células, impedindo ou facilitando sua entrada para o lúmen do vaso. Possui ainda funções metabólicas, sintetizando e liberando uma série de substâncias de ação local ou sistêmica que exercem controle sobre o tônus vascular, proliferação de células musculares lisas e remodelamento do vaso, migração e adesão de leucócitos e plaquetas, e atividades inflamatória e imune.<sup>(62)</sup>

A diferença entre endotélio saudável e disfuncional baseia-se na qualidade do tônus vascular, que depende de um equilíbrio entre moléculas vasodilatadoras e vasoconstritoras produzidas pelo próprio endotélio em resposta às condições sistêmicas a que está exposto. Em condições fisiológicas, há uma produção mais importante de fatores vasodilatadores. A injúria ao endotélio causada por alterações locais do fluxo sanguíneo e associada a condições patológicas sistêmicas, tais como hipertensão arterial, tabagismo, dislipidemia e diabete, origina uma cadeia de eventos que culmina com aumento dos mediadores vasoconstritores. Essa diminuição do relaxamento vascular é chamada de disfunção endotelial.

O endotélio exerce funções de suma importância para a manutenção da homeostase vascular e o faz, muitas vezes, através da produção de uma vasta gama de substâncias. Dentre os fatores vasodilatadores derivados do endotélio, destacam-se o óxido nítrico, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e as prostaciclinas. Há os fatores que levam à vasoconstrição, como a endotelina-1 (ET-1), os derivados do ácido araquidônico (prostaglandina H<sub>2</sub> e tromboxana A<sub>2</sub>), a angiotensina II e espécies reativas de oxigênio (ROS); fatores antioxidantes, como a enzima superóxido dismutase; substâncias antitrombóticas, como o ativador de plasminogênio tecidual (tPA) e a proteína C; moléculas pró-trombóticas, como o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1); fatores envolvidos na angiogênese, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); fatores que levam à proliferação celular, como angiotensinogênio II; fatores antiproliferativos, como o fator beta de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), e mesmo marcadores de inflamação, como moléculas de adesão da célula vascular (VCAM), moléculas de adesão intercelular (ICAM) e moléculas de adesão de selectinas<sup>(62)</sup>.

### 1.2.2 Funções do endotélio

O endotélio sadio mantém a estrutura da parede do vaso e atua como barreiras física e metabólica contra a entrada de moléculas e células, degradando substâncias e evitando que elas atuem em camadas mais profundas do vaso de modo a alterar seu fenótipo. O endotélio exerce controle sobre a dilatação e contração do vaso, tanto em resposta a agentes vasoativos circulantes quanto à influência de alterações do fluxo sanguíneo local, como sua força de cisalhamento. As células endoteliais, dispostas em uma camada única que separa o sangue da parede vascular e do interstício, atuam na conservação do fluxo sanguíneo laminar. A manutenção da fluidez da membrana endotelial é fundamental para que haja um arranjo tridimensional adequado de seus receptores de superfície, possibilitando assim ligações eficientes com moléculas circulantes para correta sinalização intracelular<sup>(63)</sup>.

Através do controle do tônus vascular, permite perfusão adequada dos tecidos, uma vez que direciona o sangue de capilares e promove fechamentos destes quando não estão sendo perfundidos e tem papel no crescimento de novos

vasos sanguíneos e dilatação de ramos colaterais frente a fenômenos isquêmicos. O endotélio contribui para a formação de coágulos na tentativa de reparar lesões vasculares e atua também na eliminação destes quando necessário <sup>(64)</sup>.

Em condições fisiológicas, a produção de ativador do plasminogênio tecidual (tPA) pelo endotélio mantém uma superfície não trombogênica (carregada negativamente) que impede a trombose local por evitar a aderência de plaquetas, células sanguíneas e ativação da cascata de coagulação. O endotélio também atua na inibição da proliferação, migração e apoptose de células musculares lisas da parede do vaso, a fim de manter a morfologia vascular normal <sup>(63)</sup>.

### 1.2.3 Fatores vasodilatadores derivados do endotélio

Furchgott e Zawadzki, em 1980, demonstraram pela primeira vez a existência de um fator relaxante da musculatura lisa vascular derivado do endotélio, que foi posteriormente constatado tratar-se do óxido nítrico (NO) <sup>(65)</sup>.

O NO é um gás de baixo peso molecular com grande capacidade de difusão pelas células musculares lisas do vaso. Possui propriedades antagônicas, que podem ser protetoras ou deletérias ao endotélio vascular, que dependem de seu estado molecular – oxidado ou reduzido. A molécula de NO possui um elétron não pareado, reagindo facilmente com oxigênio, produzindo nitrato ou nitrito. Tem ainda alta afinidade pelo grupamento heme e grupos –SH <sup>(66)</sup>. O NO ou os produtos de sua reação com oxigênio molecular ou radicais superóxidos podem modificar vários tipos de moléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos para produzir tanto efeitos fisiológicos como patológicos <sup>(67)</sup>.

Ele é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima sintetase endotelial do óxido nítrico (eNOS), que contém um grupamento heme e requer a presença de co-fatores adequados, tais como tetrahydrobiopterina (BH4), NADPH, íons cálcio, calmodulina e flavinas FAD e FMN. A eNOS é ativada pelo aumento intracelular de íons cálcio, ação de agonistas como acetilcolina, ATP, angiotensina II ou pela influência de fatores físicos da circulação, como a força de cisalhamento. Sua inibição é mediada por análogos da L-arginina <sup>(62)</sup>.

Há três isoformas da enzima óxido nítrico sintase, sendo duas constitutivas e uma induzida. A eNOS é constitutiva e é a isoforma predominante, presente em

células endoteliais, plaquetas e no cérebro. Ela sintetiza e secreta NO de forma contínua na microcirculação. Outra isoforma constitutiva é a NOS neuronal, também cálcio-calmodulina dependente. A enzima induzida é independente do cálcio e é expressa frente a respostas inflamatórias difusas ou locais. Sua ativação leva à produção de grandes quantidades de NO, responsável pelos efeitos citotóxicos (62,68).

Nas células do endotélio vascular, o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina, em presença de oxigênio, produz NO e L-citrulina catalisado pela eNOS. O NO difunde-se até as células musculares lisas adjacentes e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase, que catalisa a conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Este, por sua vez, ativa uma quinase dependente de GMP cíclico (PKG), que desencadeia uma cascata de respostas que culmina com o seqüestro intracelular de cálcio (69). A diminuição do cálcio plasmático resulta em relaxamento da musculatura lisa e conseqüente vasodilatação, que se mantém enquanto estiver ocorrendo difusão de NO para as células musculares lisas. Se a formação de NO diminui, ocorre uma vasoconstrição moderada (70).

O NO modula o crescimento de células musculares lisas dos vasos através de mecanismos dependentes ou não de GMP cíclico. Além de inibir a proliferação dessas células, o NO também inibe a produção de níveis basais de colágeno, inibe a divisão celular e a produção de matriz extracelular e estimula a apoptose, mantendo a morfologia vascular normal (71-73).

Níveis diminuídos de tetrahydrobiopterina (BH4) promovem a produção de ânions superóxidos pela ação da eNOS (o que é chamado de desacoplamento da eNOS). Essa transformação da eNOS de uma enzima protetora para uma facilitadora de stress oxidativo tem sido observada em uma série de modelos *in vitro*, em modelos animais de doenças cardiovasculares e em pacientes com fatores de risco cardiovasculares. Em muitos casos, a suplementação com BH4 mostrou-se efetiva para corrigir a disfunção enzimática em modelos animais e pacientes. Além disso, a infusão de ácido fólico e vitamina C também é capaz de restaurar a funcionalidade da eNOS, muito provavelmente por aumentar a biodisponibilidade de BH4 (74).

Outro fator endotelial responsável pelo controle do tônus vascular é a prostaciclina, cuja ação depende da presença de receptores específicos na parede

das células musculares lisas vasculares. A estimulação desses receptores leva à ativação da adenilil ciclase, gerando um aumento de AMP cíclico (AMPc), o que causa estimulação de quinase dependente de AMPc (PKA). Essa quinase tem efeito semelhante à PKG, determinando vasodilatação.

Além do NO e da prostaciclina, o endotélio ainda sintetiza um fator vasodilatador, mas que é independente do aumento dos níveis intracelulares de GMPc e AMPc. É o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), que determina maior vasodilatação nos vasos sanguíneos de resistência do que nas grandes artérias <sup>(75-76)</sup>.

#### 1.2.4 Fatores vasoconstritores derivados do endotélio

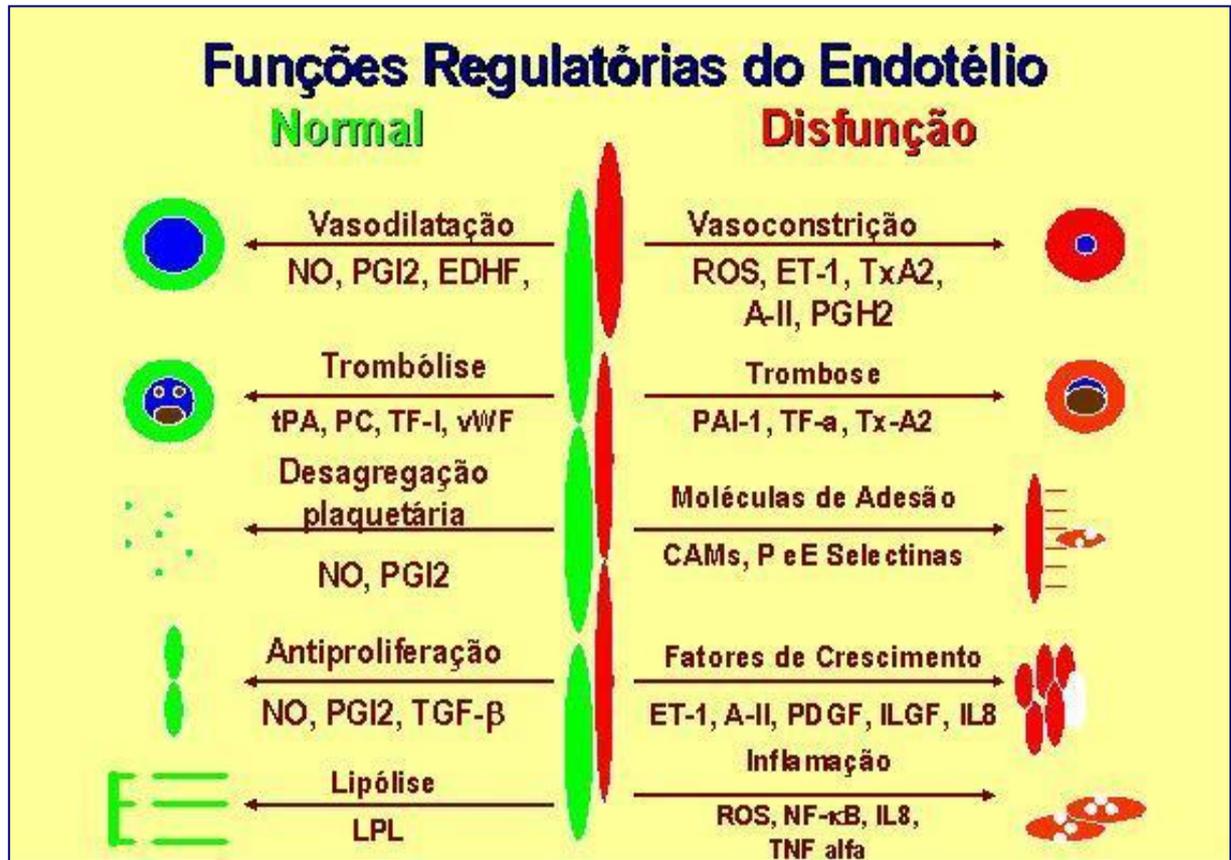
Além das substâncias vasodilatadoras, as células endoteliais possuem a capacidade de produzir substâncias vasoconstritoras como o tromboxano, a angiotensina II e a endotelina-1, que influenciam na formação da aterosclerose.

As endotelinas são proteínas compostas de 21 aminoácidos e tem a sua produção em vários tecidos. Existem três isoformas de endotelinas (endotelina-1, endotelina-2 e endotelina-3) e vários são os fatores que podem estimular a sua produção, tais como a trombina, a adrenalina, a vasopressina, a angiotensina II, a bradicinina, a hipóxia, as lipoproteínas de alta e baixa densidade, a insulina, a isquemia, a tensão de cisalhamento, a interleucina-1 e fatores de crescimento. A endotelina-1 é o mais potente vasoconstritor descrito até o momento, tanto de vasos de grande calibre quanto na microcirculação. Ela está envolvida na adesão de leucócitos, quimiotaxia de monócitos, proliferação de células musculares lisas e também aumenta a captação de LDL oxidado pelas células endoteliais. A endotelina juntamente com a angiotensina II promovem a proliferação de células musculares lisas contribuindo para a formação da placa aterosclerótica <sup>(77)</sup>. Macrófagos ativados juntamente com células musculares lisas vasculares produzem grandes quantidade de endotelina <sup>(78)</sup>.

Outro vasoconstritor é a Angiotensina II, um potente regulador do sistema cardiovascular e está envolvida na inflamação vascular, no estresse oxidativo e proliferação celular <sup>(79,80)</sup>, e na promoção da senescência vascular. A angiotensina II aumenta a produção de ROS, com isto ocorre a ativação de vários fatores de

transcrição próinflamatórios, como o NF $\kappa$ B, promovendo a inflamação vascular e a aterogenese<sup>(81)</sup>.

**Figura 2. Resumo das Funções Regulatórias do Endotélio- adaptado de Dr.R.V.S.N. Sarma**



### 1.2.5 Disfunção Endotelial

A alteração da função endotelial é um dos principais fatores que contribui para distúrbios cardiovasculares, como a aterosclerose, a hipertensão arterial e a insuficiência cardíaca, que por conseqüência levam a hipoperfusão tecidual, oclusão de artérias e por fim a lesões em órgãos <sup>(82)</sup>.

A função endotelial pode ser alterada por inúmeros fatores e condições. Ao sofrer estímulos nocivos ocorre uma modulação fenotípica do endotélio, caracterizando um estado de “ativação endotelial” ou também chamado de disfunção endotelial, estas alterações fazem com que ocorram mudanças nos mecanismos homeostáticos do endotélio saudável. Estas alterações associam-se com o aumento da expressão de moléculas de adesão, aumento na síntese de fatores pró-inflamatórias e fatores pró-trombóticos e aumento do estresse oxidativo. Ocorre também um controle anormal do tônus vascular, onde há uma diminuição da disponibilidade de vasodilatadores, principalmente de óxido nítrico, e um aumento de vasoconstritores. Todas essas alterações estão envolvidas na aterosclerose <sup>(83)</sup>.

O principal determinante da biologia endotelial é o estado redox da célula e a principal molécula que controla a função endotelial é o NO. Os processos redox são basicamente a formação enzimática de ROS. O equilíbrio entre NO e ROS, como os ânions superóxidos e o peróxido de hidrogênio, regulam o estado redox da célula e isto é necessário para uma função endotelial normal.

A mudança fundamental que ocorre na ativação endotelial é a alteração de um estado celular silenciado mediado por NO em uma ativação sinalizada por processos redox. Espécies reativas de oxigênio (ROS), na presença de superóxido dismutase, levam à geração de peróxido de hidrogênio, que podem se propagar rapidamente por toda a célula e reagir com os grupos de cisteína nas proteínas para alterar a sua função. Assim, a capacidade da eNOS para regular o fenótipo quiescente e o de ativação endotelial, coloca essa enzima no centro da homeostase endotelial <sup>(65)</sup>.

O estresse oxidativo possui um importante papel na disfunção endotelial. A geração de ROS leva a redução da biodisponibilidade de NO, alterando o equilíbrio do endotélio. As principais fontes formadoras de ROS na vasculatura são os complexos enzimáticos: NADPH-oxidases e da eNOS desacoplada. Outras fontes de ROS são a cadeia respiratória mitocondrial, a xantina oxidase e a lipoxigenase

<sup>(84)</sup>. Durante a síntese de NO, a eNOS recebe e estoca elétrons para transformar os co-substratos O<sub>2</sub> e L-arginina em NO e L-citrulina. A eNOS, que normalmente ajuda a manter o endotélio inativado, em algumas circunstâncias pode gerar espécies reativas de oxigênio(ROS). Esse processo é chamado de desacoplamento da eNOS, e forma superóxido se o cofator tetrahidrobiopterina não estiver presente, ou pode gerar peróxido de hidrogênio se o substrato L-arginina for deficitário. A ausência do cofator tetrahidrobiopterina é o principal responsável pelo desacoplamento da eNOS<sup>(65)</sup>.

A exposição prolongada ou repetida a fatores de risco cardiovasculares pode diminuir a ação de proteção do sistema antiinflamatório endógeno das células endoteliais. Com isto o endotélio pode se tornar disfuncional, mas também podem ocorrer alterações na integridade da célula endotelial, a célula progredir para a senescência e desprender-se da parede do vaso e cair na circulação<sup>(85)</sup>. Marcadores de dano da célula endotelial estão presentes na corrente sanguínea, e são micropartículas endoteliais que tem origem em células ativas ou apoptóticas ou em células endoteliais íntegras. Estes marcadores estão aumentados na doença aterosclerótica periférica e coronária e também são encontrados em outras doenças inflamatórias associadas com aumentado risco vascular, como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico <sup>(86)</sup>. Micropartículas endoteliais circulantes e células endoteliais podem ser quantificadas, e podem ser candidatas promissoras para testes clínicos <sup>(65)</sup>.

Quando o endotélio é lesado a sua capacidade de reparação não depende apenas da extensão da lesão, mas também da capacidade endógena para o reparo. Existem dois mecanismos pelos quais esse processo de reparo é conhecido. Células endoteliais maduras próximas ao local da lesão podem se replicar localmente e substituir células perdidas ou danificadas. As células endoteliais locais seriam suficientes para manter a integridade vascular durante toda a vida do indivíduo em circunstâncias saudáveis, mas na presença de fatores de risco, a perda da integridade endotelial se desenvolveria rapidamente se apenas os mecanismos de replicação local estivessem presentes <sup>(87)</sup>. Outro mecanismo envolvido na reparação endotelial seria de que a circulação de células progenitoras endoteliais, células com origem na medula óssea, também poderiam fazer a reparação do endotélio <sup>(88)</sup>. Parte da ativação destas células endoteliais se dá em parte por estímulo dependente

de NO, e nesse sentido, pacientes com fatores de risco cardiovascular poderiam ter a ação deste mecanismo de reparação prejudicada. Outrossim, fatores que melhoram a função endotelial e a biodisponibilidade de NO, podem ajudar na reparação endotelial, pois promovem a mobilização de células progenitoras endoteliais. As células progenitoras endoteliais são de grande importância, pois indivíduos que apresentam altos níveis de exposição a fatores de risco, possuem função endotelial preservada quando tem um número aumentado destas células <sup>(89)</sup>.

#### 1.2.6 Avaliação clínica da função endotelial

Para a avaliação clínica da função endotelial, utilizam-se os chamados testes de função. A resposta vasodilatadora endotélio-dependente pode ser estudada na circulação coronariana ou periférica. Os testes envolvem estímulos farmacológicos e /ou fisiológicos de liberação endotelial de NO e outros compostos vasoativos, e muitas vezes a comparação das respostas vasculares com dilatadores independentes do endotélio, tais como nitroglicerina. A determinação da biodisponibilidade de NO local não só reflete a sua influência sobre o tônus vascular, mas também outras importantes funções desta molécula, que incluem trombo-regulação, adesão celular e proliferação.

Os estudos clínicos iniciais da função endotelial foram realizados na circulação coronariana e envolveram a infusão intra-arterial de fármacos vasodilatadores (bradicinina, acetilcolina, metacolina) com posterior avaliação das alterações no diâmetro do vaso por angiografia coronariana <sup>(90,91)</sup>. A avaliação da liberação basal de NO pode ser feita com a administração de inibidores da eNOS, tais como os análogos da L-arginina e o NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) <sup>(92)</sup>. Esta abordagem é um análogo clínico direto do experimento original de Furchgott e Zawadzki. Em coronárias saudáveis, a acetilcolina promove a liberação de NO de vasos com endotélio intacto, o que leva à vasodilatação. Porém, em indivíduos com fatores de risco ou doença aterosclerótica estabelecida, esta resposta está diminuída, abolida ou, paradoxalmente, provoca vasoconstrição como resultado direto do efeito muscarínico vasoconstritor no tecido muscular liso. As doses que resultam em concentrações finais sanguíneas na faixa de  $10^{-8}$  e  $10^{-5}$  mol são as mais

apropriadas para a avaliação da faixa fisiológica de respostas <sup>(93)</sup>. Este método é invasivo, custoso e apresenta riscos inerentes à cateterização coronariana.

A função da vasculatura coronária também pode ser estudada por Doppler intracoronariano<sup>(94)</sup>, que mede o fluxo sanguíneo em resposta a estímulos farmacológicos, com uso de uma ampla gama de agonistas endoteliais, que incluem a substância P, adenosina e bradicinina, bem como a estímulos fisiológicos, como o teste de Cold Pressur <sup>(95)</sup>. Outros testes não-invasivos também são capazes de avaliar a função endotelial coronariana, tais como ecocardiograma com Doppler, tomografia com emissão de pósitrons e ressonância magnética.

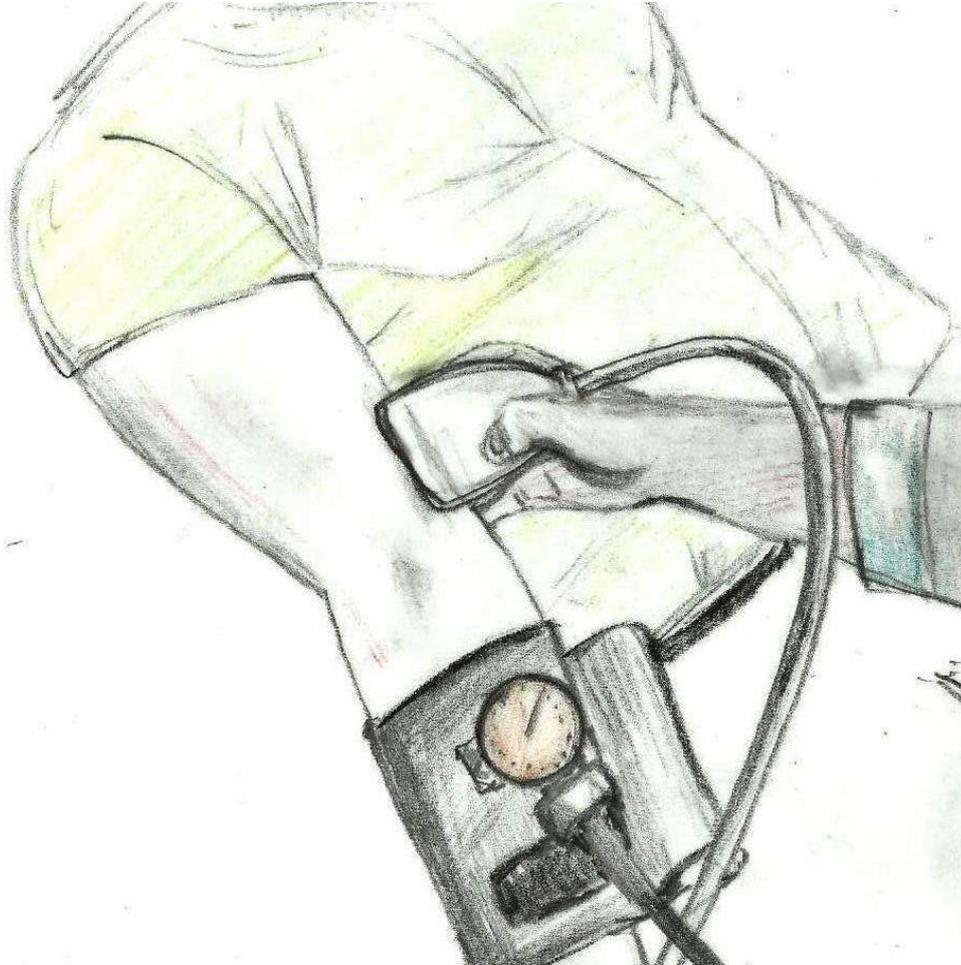
Embora estes testes avaliem diretamente a circulação coronária, sua natureza invasiva limita a sua utilização em doentes com doença avançada, e se opõe à repetição dos testes durante séries de *follow-up*. Como a disfunção endotelial é um processo sistêmico, uma abordagem menos invasiva tem sido desenvolvida, a qual utiliza os mesmos princípios de infusão local de testes farmacológicos e de aferição das mudanças na resistência do tônus vascular, agora da circulação periférica. São utilizados dois testes: pletismografia de oclusão venosa e o doppler arterial <sup>(96)</sup>. Existe uma correlação já estabelecida entre esses métodos e a angiografia coronariana <sup>(97)</sup>. Tais testes tem proporcionado uma oportunidade para avaliar a fisiopatologia endotelial durante a fase pré-clínica da doença pelo uso de agonistas e antagonistas apropriados com construção de curvas de dose-resposta.

A pletismografia de oclusão venosa já vem sendo utilizada há 100 anos para estudo das funções do sistema nervoso autônomo na regulação do fluxo sanguíneo dos membros <sup>(98)</sup>. Após a descoberta da função endotelial, esse método passou a ser utilizado para avaliar indiretamente esta função através da reatividade vascular. As alterações no fluxo sanguíneo e na resistência vascular do membro (normalmente antebraço) são medidas em resposta à injeção intraarterial de agentes vasoativos dependentes ou independentes do endotélio. É um método invasivo na medida em que requer canulação arterial, mas que possui mínimos riscos de injúria vascular e infecção. Mesmo assim, sua aplicação em estudos de larga escala é limitada. Os resultados também são difíceis de se padronizar porque o tônus basal do vaso é variável e protocolos de ensaio diferem entre as pesquisas laboratoriais. A relevância clínica para aterosclerose é também incerta devido à fisiopatologia

microvascular não necessariamente refletir alterações nas artérias de condução, que são particularmente predispostas a desenvolver a doença.

Por todas estas razões, o Doppler da artéria braquial tem sido utilizado de maneira crescente por ser menos invasivo, mais seguro, rápido, e pela possibilidade de que sua realização seja realizada em um maior número de pacientes <sup>(99)</sup>. Neste método, o diâmetro da artéria braquial é medido antes e depois do aumento na tensão de cisalhamento. Um manguito de esfigmomanômetro é colocado no antebraço distalmente à artéria braquial e insuflado a 200 mm Hg. O fluxo sanguíneo fica ocluído por 5 minutos e sua posterior liberação resulta em hiperemia reativa por aumento da tensão de cisalhamento. Mede-se o diâmetro da artéria braquial no estado de repouso e após a dilatação fluxo-mediada (FMD). A FMD ocorre predominantemente como resultado da liberação endotelial local de NO <sup>(100)</sup>, mas há também a participação de outras substâncias, como prostanóides e fator hiperpolarizante do endotélio. Tal como na circulação coronariana, essa resposta da artéria braquial pode ser contrastada com a dilatação independente do endotélio em resposta à administração sublingual de nitroglicerina <sup>(99)</sup>. O diâmetro do vaso interfere nas respostas (maior diâmetro basal, menos dilatação) e as medidas são extremamente dependentes do examinador e do aparelho utilizado <sup>(101)</sup>. A FMD da artéria braquial tem sido estudada amplamente em investigação clínica, pois permite avaliação seriada dos indivíduos jovens, incluindo crianças. Ela também permite verificar a influência do estilo de vida e de intervenções farmacológicas sobre a biologia endotelial na fase inicial pré-clínica, quando o processo da doença é mais suscetível à reversão <sup>(102)</sup>. Este teste representa o padrão ouro para a pesquisa clínica sobre a biologia do endotélio de artérias de condução. Entretanto, existem desafios práticos que necessitam ser superados antes que esta técnica possa ser adequada para uso na prática clínica. Tais desafios incluem a necessidade de operadores altamente treinados, altas despesas com a compra e manutenção do equipamento, e os cuidados necessários para minimizar o efeito do ambiente ou influências fisiológicas, tais como o exercício físico, alimentação, ingestão de cafeína, e importantes variações de temperatura. A FMD é também determinada em parte pela magnitude da vasodilatação pós isquêmica, o que a torna também uma medida da função microcirculatória <sup>(103)</sup>.

**Figura 3. FMD – Avaliação pela artéria braquial**



A medida do endurecimento arterial, incluindo a velocidade da onda de pulso e a distensibilidade arterial, também tem sido investigada como método não-invasivo <sup>(104)</sup>. O teste depende da capacidade do beta-2-agonista salbutamol de reduzir a rigidez arterial em uma forma dependente de NO, sem redução significativa na pressão arterial quando administradas doses clínicas padrão por inalação <sup>(105)</sup>. Mudanças na rigidez arterial podem ser medidas com a análise da onda de pulso por tonometria de artéria radial ou por análise de contorno de pulso digital por fotopleletismografia <sup>(105)</sup>. A hiperemia reativa foi usada para se obter mudanças na velocidade de condução da onda de pulso arterial e volume de pulso digital, que pode ser medido por oscilometria para identificar pressão de pulso arterial dos

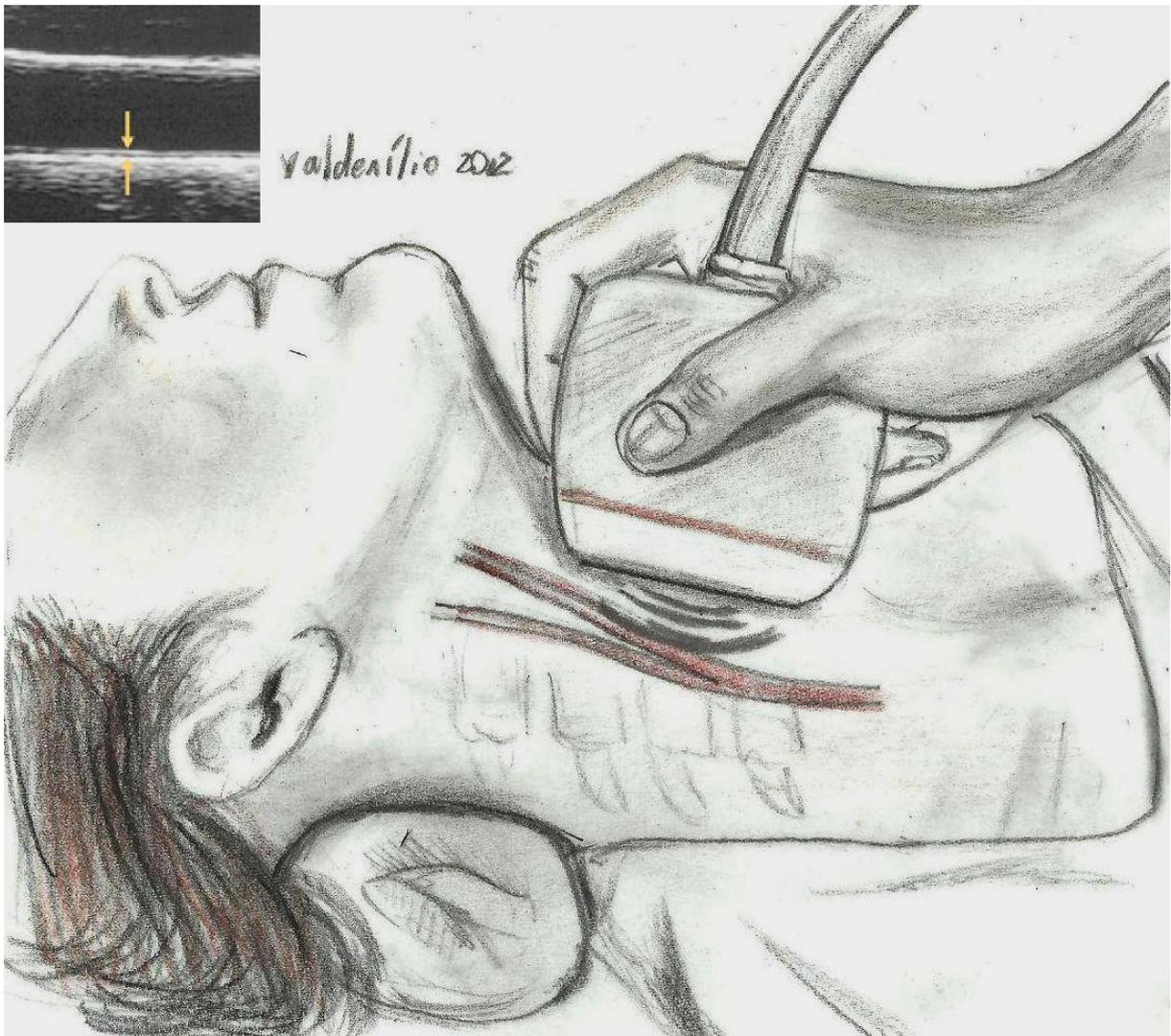
membros, forma de onda, duração e também a amplitude de pulso digital por tonometria <sup>(106,107)</sup>. O endurecimento da parede do vaso é dependente de fatores dinâmicos, como a liberação de NO, mas também de características estruturais fixas da parede do vaso (fibrose e calcificação). A relação precisa entre função endotelial e endurecimento arterial precisa de mais estudos.

Vários destes métodos foram validados como medidas de biodisponibilidade de NO. Foi demonstrado que esses testes podem sofrer alterações com a exposição aos fatores de risco e com doença aterosclerótica. A contribuição relativa de alterações estruturais na parede do vaso e da biologia dependente do endotélio permanece incerta. Validação adicional é necessária, inclusive um estudo mais amplo da reprodutibilidade destes testes em diferentes faixas etárias e estágios da doença, bem como a clarificação das suas relações com as outras medidas estabelecidas da função endotelial.

#### 1.2.7 Técnicas de avaliação de dano endotelial

Como a relação de espessura íntima/média (IMT) da artéria carótida comum medida por ultrassonografia de alta resolução tem sido considerada um bom indicador para a identificação de estágios iniciais da aterosclerose <sup>(108)</sup>, alguns estudos em EA têm utilizado este indicador, a fim de detectar aterosclerose subclínica <sup>(109-112)</sup>. Esses estudos, apesar de bem desenhados, apresentaram resultados discrepantes e baixa significância estatística. Sari et al. avaliaram 54 pacientes com EA e 31 controles <sup>(111)</sup>. Neste estudo foram avaliadas através de ultrassonografia as artérias braquial e carótida comum. Na artéria braquial foram mensuradas a dilatação mediada por fluxo (FMD) e a dilatação independente do endotélio. Para a artéria carótida comum foi medida a IMT. Os autores não identificaram correlações entre a FMD e os seguintes fatores: sexo, idade, perfil lipídico, PCR, VHS, tabagismo e os escores de atividade da doença.

**Figura 4. IMT - Quantificação da Espessura Intima Média por Ultrassonografia**



No entanto, relataram que a IMT da carótida comum foi positivamente correlacionada com a idade e a pontuação no BASMI. Também não foi observada diferença significativa na IMT entre os dois grupos. Embora o efeito do tabagismo sobre a função endotelial não tenha sido o foco de seu estudo, constatou uma alta prevalência de fumantes entre os pacientes e os controles. Como o tabagismo está fortemente correlacionado com disfunção endotelial, os autores apresentaram uma análise de subgrupo, comparando os dois grupos (fumantes versus não fumantes) entre os pacientes com EA, independentemente do seu estado de doença. Observaram apenas uma redução da FMD entre os fumantes <sup>(113)</sup>. Mathieu et al.

demonstraram uma tendência de aumento da IMT e da rigidez arterial da carótida (ambos marcadores de aterosclerose subclínica), porém sem relevância estatística <sup>(112)</sup>. Ao contrário do que se esperava, o grupo controle apresentou um perfil cardiovascular pior, com TG, glicemia e pressão arterial sistólica mais elevados; no grupo dos pacientes apenas a relação cintura/quadril (RCQ) foi maior. Curiosamente, algumas peculiaridades específicas das populações observadas nos grupos controle e de pacientes nos estudos de Sari et al. <sup>(111)</sup> (alta prevalência de fumantes na Turquia) e Mathieu et al. <sup>(112)</sup> (alto risco cardiovascular na região da França) influenciaram seus resultados. Um estudo mais recente de Mike J.L. et al. <sup>(114)</sup> identificou uma IMT significativamente maior ( $p=0,02$ ) entre os pacientes com EA quando comparados ao grupo controle, sendo que a idade e o índice de massa corpórea foram fortemente correlacionados com a IMT entre os pacientes com EA. Com relação aos índices de rigidez arterial, a idade, IMC, colesterol total, triglicérides e a duração da doença foram identificados como determinantes. A rigidez arterial foi determinada pela distensibilidade, conformidade e módulo de elasticidade de Young da artéria carótida.

Na contracorrente, o estudo transversal de Choe et al. mostrou que a IMT carotídea e os parâmetros relacionados com propriedades elásticas arteriais em pacientes jovens com EA e sem evidencia clínica de fatores de risco cardiovascular não foram diferentes dos controles, bem como concluíram que os níveis séricos de TNF-alfa, IL-6 e MCP-1 não refletem o grau de aterosclerose carotídea subclínica <sup>(112)</sup>.

Caliskan et al. demonstraram redução da reserva de fluxo coronariano (RFC) em pacientes com EA <sup>(115)</sup>. RFC reduzida reflete disfunção microvascular coronariana e está associada com disfunção diastólica do ventrículo esquerdo <sup>(116,117)</sup>.

Propriedades elásticas da parede arterial, tais como coeficiente de distensibilidade (DC), índice de rigidez (beta) e módulo de elasticidade incremental (Einc) da carótida de pacientes com EA foram avaliadas em um estudo e não houve diferenças significativas quando comparadas com controles <sup>(110)</sup>. Recentemente, Nurmohamed et al. estudou a função microvascular em um pequeno grupo de pacientes através da análise da vasodilatação dependente do endotélio e da investigação do recrutamento capilar da pele. Os autores demonstraram que essas

variáveis podem ser utilizadas para identificar disfunção vascular no nível da microcirculação <sup>(118)</sup>. Os pacientes deste estudo foram submetidos a tratamento com etanercepte de acordo com as diretrizes do grupo ASAS e apresentaram melhora nos parâmetros clínicos e laboratoriais, bem como melhora na função microvascular <sup>(119)</sup>.

## 1.2.8 Aterosclerose

### 1.2.8.1 Etiopatogenia e Fisiopatogenia

A patogênese da aterosclerose está relacionada intimamente com a inflamação, autoimunidade, doenças crônicas e dislipidemia <sup>(120)</sup>. Em uma variedade de modelos animais os sinais de inflamação ocorrem paralelamente com o acúmulo de lipídios na parede arterial <sup>(121)</sup>.

Numerosas observações fisiopatológicas em humanos e animais levaram a formulação da hipótese da resposta a injúria na formação da aterosclerose, a qual inicialmente propunha que a retirada da cobertura endotelial era o primeiro estágio na aterosclerose. A versão mais recente desta hipótese considera a disfunção endotelial ao invés da perda da camada endotelial. Os desencadeadores dessa disfunção endotelial incluem LDL elevado e modificado, radicais livres gerados pelo tabagismo, diabetes mellitus, alterações genéticas, concentrações elevadas de homocisteína e infecções por *Herpes vírus* ou *Chlamydia pneumoniae*, dentre outras variáveis. Independente da causa da disfunção endotelial, a aterosclerose é uma resposta altamente característica <sup>(122)</sup>.

### 1.2.8.2 Lipoproteínas oxidadas e inflamação

De acordo com a hipótese da oxidação, as LDL retidas na íntima, em parte pela ligação com proteoglicanos, sofre modificação pela reação de oxidação <sup>(123,124)</sup>. Hiperóxidos lipídicos, lisofosfolipídios, compostos carbonílicos e outras partículas biologicamente ativas localizam-se na fração lipídica do ateroma. As frações de apoproteínas das moléculas de lipoproteínas também podem sofrer alteração na

parede arterial, conferindo a elas a propriedade antigênica e a capacidade de estimular os linfócitos T, formando assim uma resposta imune adaptativa <sup>(125)</sup>.

Estes lipídios modificados podem induzir a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas próinflamatórias e outros mediadores da inflamação em macrófagos e células da parede vascular. Neste estágio inicial, linfócitos T já estão presentes na lesão antes mesmo do desenvolvimento da placa <sup>(126)</sup>. Na sequência, um abundante infiltrado de células mononucleares se instala: a maioria linfócitos Th1 ativados (principalmente CD4+, mas com CD8+ também), macrófagos, monócitos e mastócitos <sup>(127-129)</sup>. Os anticorpos, antígenos e complemento também estão presentes no espaço subendotelial, enquanto os linfócitos B podem ser encontrados na camada mais externa e nos linfonodos de drenagem <sup>(130-132)</sup>. Desta forma, as fases mais precoces da aterosclerose são caracterizadas por uma resposta mediada imunologicamente possivelmente causada por autoantígenos <sup>(126)</sup>.

#### 1.2.8.3 Dislipidemia e inflamação

Outras partículas lipoprotéicas tais como a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteína de densidade intermediária também têm um potencial aterogênico considerável. Elas podem sofrer oxidação tal como ocorre com a LDL. Além disso, algumas evidências sugerem que as próprias partículas beta de VLDL podem ativar a inflamação nas células endoteliais vasculares <sup>(133)</sup>. As lipoproteínas de alta densidade protegem contra aterosclerose. O HDL promove um transporte reverso de colesterol que provavelmente tem uma função ateroprotetora. Entretanto, partículas de HDL também podem transportar enzimas antioxidantes como a acetilhidrolase e a paraoxonase, as quais podem quebrar os lipídios oxidados neutralizando seu efeito próinflamatório. Em especial, a família de genes da paraoxonase tem sido largamente implicada como responsável pelas propriedades antioxidantes do HDL <sup>(134,135)</sup>.

#### 1.2.8.4 Hipertensão e inflamação

A angiotensina II (AII), além de sua função vasoconstritora, pode aumentar a inflamação intimal. A AII aumenta a produção de ânions superóxido, um radical livre,

a partir de células endoteliais e das células musculares lisas (SMCs) <sup>(136)</sup>. A AII também estimula as SMCs a produzirem citocinas tais como a IL-6, a proteína quimioatratadora de monócitos tipo 1 (MCP-1) e moléculas de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) <sup>(137)</sup>.

Recentemente a genética tem sido introduzida no estudo dos fatores de risco tradicionais devido ao agrupamento de hipertensão essencial e acidente vascular encefálico, infarto e insuficiência renal moderada sugerindo que a sobreposição de fatores genéticos (isolado ou combinados com fatores ambientais) afetam a susceptibilidade para o desenvolvimento de hipertensão e dano a órgãos alvo <sup>(138)</sup>.

#### 1.2.8.5 Diabetes e inflamação

A hiperglicemia, através dos radicais livres de oxigênio e grupos carbonil, aumenta o estresse oxidativo levando á disfunção endotelial <sup>(139)</sup>. A hiperglicemia modifica as macromoléculas formando produtos que estimulam a produção de citocinas próinflamatórias além de estimular outras vias próinflamatórias nas células musculares lisas <sup>(140)</sup>.

#### 1.2.8.6 Obesidade e inflamação

A obesidade não predispõe somente á resistência a insulina e ao diabetes. Ela contribui para a dislipidemia e diretamente para o processo inflamatório. Altos níveis de ácidos graxos livres originados da gordura visceral chegam ao fígado através da circulação portal e estimulam a síntese de VLDL pelos hepatócitos. A elevação do VLDL resultante pode baixar os níveis de HDL colesterol através do aumento na conversão do HDL para VLDL pela transferase de éster de colesterol. O tecido adiposo também pode sintetizar citocinas tais como TNF e IL-6. Desta forma, a obesidade promove a inflamação e potencializa a aterogenese independente dos efeitos na resistência á insulina e e de seu efeito nas lipoproteínas <sup>(141)</sup>.

#### 1.2.8.7 Tabagismo e inflamação

O componente do cigarro responsável pelo dano endotelial é incerto. Tem-se postulado que a fumaça do cigarro potencializa o processo de degradação dos fatores relaxadores derivados do endotélio mediado pelos ânions superóxido. Este processo seria mediado pelo estresse oxidativo aumentado. Consistente com esta hipótese, os níveis plasmáticos de peroxidação lipídica estão aumentados em fumantes <sup>(142)</sup>.

Há fortes evidências de que há um efeito dose dependente da fumaça do cigarro na disfunção endotelial. Mesmo o fumo passivo compromete precocemente a parede arterial levando a uma maior incidência de doença coronariana <sup>(142)</sup>.

#### 1.2.8.8 Infecção e a inflamação

Os agentes infecciosos podem acentuar a aterogênese. Numerosos estudos têm demonstrado uma relação patogênica entre aterosclerose e alguns microorganismos (bactérias e vírus) que causam infecções crônicas <sup>(143-144)</sup>.

Esta relação parece ser mais importante em países nos quais os fatores de risco convencionais são menos relevantes <sup>(145)</sup>. As principais bactérias envolvidas são *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* <sup>(146)</sup> e *Porphyromonas gingivalis* <sup>(147)</sup>. Os vírus envolvidos são do Grupo *Herpes* vírus, *Cytomegalovirus*, *Epstein-Barr virus*, Vírus da Hepatite A e B e alguns *Enterovirus* <sup>(148)</sup>.

As infecções agudas podem alterar a hemodinâmica e os sistemas de coagulação e fibrinólise de forma que pode precipitar eventos isquêmicos. A infecção extravascular crônica (gengivite, prostatite, bronquite, etc) pode aumentar a produção extravascular de citocinas próinflamatórias que podem acelerar a evolução das lesões ateroscleróticas. As infecções intravasculares também proporcionam estímulo inflamatório que pode acelerar a aterogênese.

Além desses fatores, a contribuição de eventos autoimunes tem sido demonstrada em estudos que mostram a presença de anticorpos contra vários antígenos expressos na placa aterosclerótica <sup>(149,150)</sup>. A hipótese de que doenças inflamatórias sistêmicas têm importante papel na aceleração da aterogênese tem sido demonstrada na artrite reumatóide e no lúpus eritematoso sistêmico <sup>(20,22)</sup>.

A agressão endotelial proporcionada por diversos fatores citados leva a uma resposta compensatória que altera as propriedades homeostáticas do endotélio. Estas alterações provocam diferentes formas de dano que aumentam a adesividade do endotélio aos leucócitos e plaquetas, bem como aumentam sua permeabilidade a estas células. A disfunção endotelial se caracteriza pela redução da biodisponibilidade de fatores vasodilatadores, em particular do óxido nítrico, enquanto fatores constritores derivados do endotélio estão aumentados <sup>(151)</sup>. Este desequilíbrio no processo de vasodilatação representa a característica funcional da disfunção endotelial. Por outro lado, a disfunção endotelial também pode ser compreendida como um estado específico de “ativação endotelial”, o qual se caracteriza por ser próinflamatório, proliferativo e procoagulante e que favorece todos os estágios da aterogênese <sup>(152)</sup>. O endotélio agredido passa a expressar em sua superfície, moléculas de adesão celular, tal como VCAM-1 que permite a ligação de vários tipos de leucócitos, especificamente linfócitos T e monócitos <sup>(153)</sup>. Além da VCAM-1, Selectinas P e E também contribuem para o recrutamento de leucócitos em ratos susceptíveis ao processo aterosclerótico <sup>(154)</sup>.

Se a resposta inflamatória não neutraliza ou remove os agentes agressores, esta se perpetuará. Uma vez aderidos ao endotélio, os leucócitos penetram na íntima. O fator responsável por esta migração leucocitária é o gradiente de quimiocinas. Várias quimiocinas são responsáveis pela migração dos monócitos, particularmente a interação entre a MCP-1 e seu receptor CCR2. Uma vez residentes na parede arterial, tais células inflamatórias perpetuam uma resposta inflamatória local. Os macrófagos expressam receptores *scavenger* que se ligam às lipoproteínas modificadas por glicação ou oxidação, permitindo a ingestão dessas moléculas lipídicas. Posteriormente os macrófagos se transformam em células espumosas. Além da MCP-1, o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) contribui para a diferenciação dos monócitos circulantes em células espumosas <sup>(121)</sup>. As células espumosas secretam citocinas próinflamatórias que amplificam a resposta inflamatória local, bem como aumentam a formação de radicais livres de oxigênio.

Da mesma forma, linfócitos são atraídos por quimiocinas (da família Interferon-gama) que se ligam ao receptores CXCR3 expressos pelas células T da lesão aterosclerótica. Uma vez na íntima arterial, os linfócitos T encontram antígenos

tais como LDL-oxidada e proteínas “heat-shock” endógenas e ou de origem microbiana, entre outras. Após a interação ligante/receptor, as células T passam a produzir citocinas que podem influenciar o comportamento de outras células presentes no ateroma. Notavelmente, o ligante CD154 (linfocitário) interage com o receptor CD40 (macrofágico), podendo induzir uma maior expressão de fator tecidual, metaloproteinases da matriz e citocinas próinflamatórias. A produção destes mediadores proporciona uma alça de amplificação resultante da interação entre imunidade inata e adquirida (linfócitos T). Dentro do ateroma, como em outros tecidos, as células T auxiliares podem se polarizar naquelas secretantes de citocinas próinflamatórias (conhecidas como células TH1) e naquelas secretantes de citocinas antiinflamatórias (conhecidas como TH2). Geralmente a resposta Th1 predomina no ateroma. Entretanto estudos experimentais em ratos sugerem que níveis extremamente elevados de hipercolesterolemia promovam um predomínio na resposta Th2 <sup>(121)</sup>. Além de estimular os macrófagos, os linfócitos T também estimulam as células musculares lisas e as células endoteliais.

Sendo assim, a resposta inflamatória promove migração e proliferação de células musculares lisas que se misturam à área de inflamação para formar uma lesão intermediária. Se essa resposta progride, pode haver espessamento da parede arterial, que será compensada por uma dilatação gradual, permitindo que o lúmen permaneça inalterado, um fenômeno denominado “remodelamento” <sup>(155)</sup>.

Esta resposta, mediada por macrófagos, derivados de monócitos, e subtipos específicos de linfócitos T para cada estágio da doença <sup>(156)</sup> leva a uma inflamação continuada, aumentando ainda mais o número de células na lesão. Ciclos de acúmulo de células mononucleares, migração e proliferação de células musculares lisas, e formação de tecido fibroso levam ao aumento e reestruturação da lesão, tornando-a coberta por uma capa fibrosa que envolve um núcleo de lipídios e de tecido necrótico – denominada lesão avançada complicada. Em algum ponto da evolução da lesão, a artéria não consegue compensar este processo por meio de dilatação; a lesão passa então a diminuir o diâmetro luminal, alterando o fluxo sanguíneo o que pode desencadear sintomas de isquemia.

O processo inflamatório não promove somente o início e a formação do ateroma, mas também contribui decisivamente para a precipitação de complicações trombóticas agudas do ateroma. A maioria dos trombos arteriais coronarianos que

causam infarto agudo do miocárdio, surgem por causa de uma ruptura na placa aterosclerótica. Os macrófagos ativados no ateroma produzem enzimas proteolíticas, capazes de degradar o colágeno, que conferem força à capsula fibrosa da placa, tornando-a fina, enfraquecida e suscetível a ruptura. O interferon gama proveniente dos linfócitos-T da placa pode bloquear a síntese de colágeno das células musculares lisas, limitando sua capacidade de renovar o colágeno que reforça a placa<sup>(157,158)</sup>. Os macrófagos também produzem fator tissular, um conhecido desencadeador de trombose na placa. Mediadores inflamatórios regulam a expressão deste fator pelos macrófagos na placa, demonstrando uma ligação importante entre a inflamação arterial e a trombose<sup>(121,159,160)</sup>.

#### *1.2.8.9 Marcadores de dano endotelial*

##### *1.2.8.9.1 - MCP-1*

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), é uma molécula pertencente a família das  $\beta$  quimiocinas C-C, que desempenha papel primordial na inflamação devido ao seu poder atrator sobre monócitos. Esta quimiocina interage com o receptor CCR2 destas células estimulando o tropismo para o sítio inflamatório<sup>(161)</sup>. O MCP-1 é secretado por uma série de outras células como células endoteliais, musculares lisas, fibroblastos e células imunes (linfócitos T e os próprios macrófagos situados no local do estímulo).<sup>(162)</sup> Dentre as várias situações em que já foi observada uma maior expressão de MCP-1 estão aterosclerose, artrite e câncer<sup>(163)</sup>. Em todas estas afecções, há um consenso de que a migração de monócitos para os locais de lesão contribui para um maior dano causado por elas <sup>(164,165,166)</sup>.

##### *1.2.8.9.2 - VCAM-1 e ICAM-1*

São moléculas de adesão expressas na face luminal de células endoteliais ou solúveis no plasma cuja produção é estimulada por citocinas. Elas promovem uma maior adesão de vários tipos de leucócitos à superfície endotelial, objetivando maior proteção de seres humanos contra agressões tissulares. Entretanto, os níveis de VCAM-1 estão aumentados em vários processos inflamatórios, incluindo a

aterosclerose<sup>(167)</sup> e também estão presentes na inflamação da fase aguda de Acidentes Vasculares Cerebrais<sup>(168)</sup>. Os níveis destas duas moléculas parecem estar normais em indivíduos saudáveis<sup>(169)</sup>, entretanto, em indivíduos com doença arterial coronariana os níveis de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis pode se encontrar elevados<sup>(170,171)</sup>.

Muitos estudos usaram a ICAM-1 solúvel como biomarcador para prognóstico de doenças cardiovasculares. A gravidade do prognóstico cardiovascular está correlacionada com níveis aumentados desse biomarcador. Hwang et al. Demonstraram que ICAM-1 e selectina E são potentes biomarcadores de aterosclerose e lesão cardiovascular, mas não encontraram correlação tão forte para com VCAM-1<sup>(172)</sup>. Uma meta-análise realizada por Malik et al demonstrou uma associação significativa entre os níveis de ICAM-1 e VCAM-1 e presença de fatores de risco clássicos para doença coronariana<sup>(173)</sup>. No estudo prospectivo feito por Haim et al. foi verificado uma associação significativa entre a concentração de ICAM-1 solúvel e risco aumentado para eventos coronarianos futuros, não levando em conta a associação deste risco com outros fatores<sup>(174)</sup>.

#### 1.2.8.9.3 – Fetuina A

Fetuinase são proteínas sanguíneas de produção hepática pertencentes a superfamília das cistatinas. A fetuina A, também conhecida como  *$\alpha$ 2-Heremans-Schmid glycoprotein*, foi reconhecida a pouco tempo como um potente inibidor da formação de cristais de hidroxapatita<sup>(175)</sup> e potente inibidora de calcificação vascular, além de induzir em roedores, resistência à insulina e inflamação. No estudo de Stenvinkel et al. verificou-se uma relação entre baixos níveis de fetuina A no plasma com má-nutrição, inflamação e formação de placas ateroscleróticas<sup>(176)</sup>.

Weickert et al. encontraram uma correlação entre níveis elevados de fetuina A e infarto do miocárdio e Acidente Vascular Encefálico Isquêmico. Verificou-se que estes níveis elevados estavam ligados a um risco relativo de 3,80 ( $p < 0,0001$ ) para IM e um risco de 3,93 ( $p < 0,0001$ ) para AVC isquêmico<sup>(177)</sup>. Roos et al, também descreveram uma correlação significativa entre níveis elevados de fetuina-A e hipertrigliceridemia, mas nenhuma correlação significativa com danos cardiovasculares<sup>(178)</sup>. Os dados até o momento divergem sobre o papel das alterações da concentração da fetuina-A no organismo e sua relação com

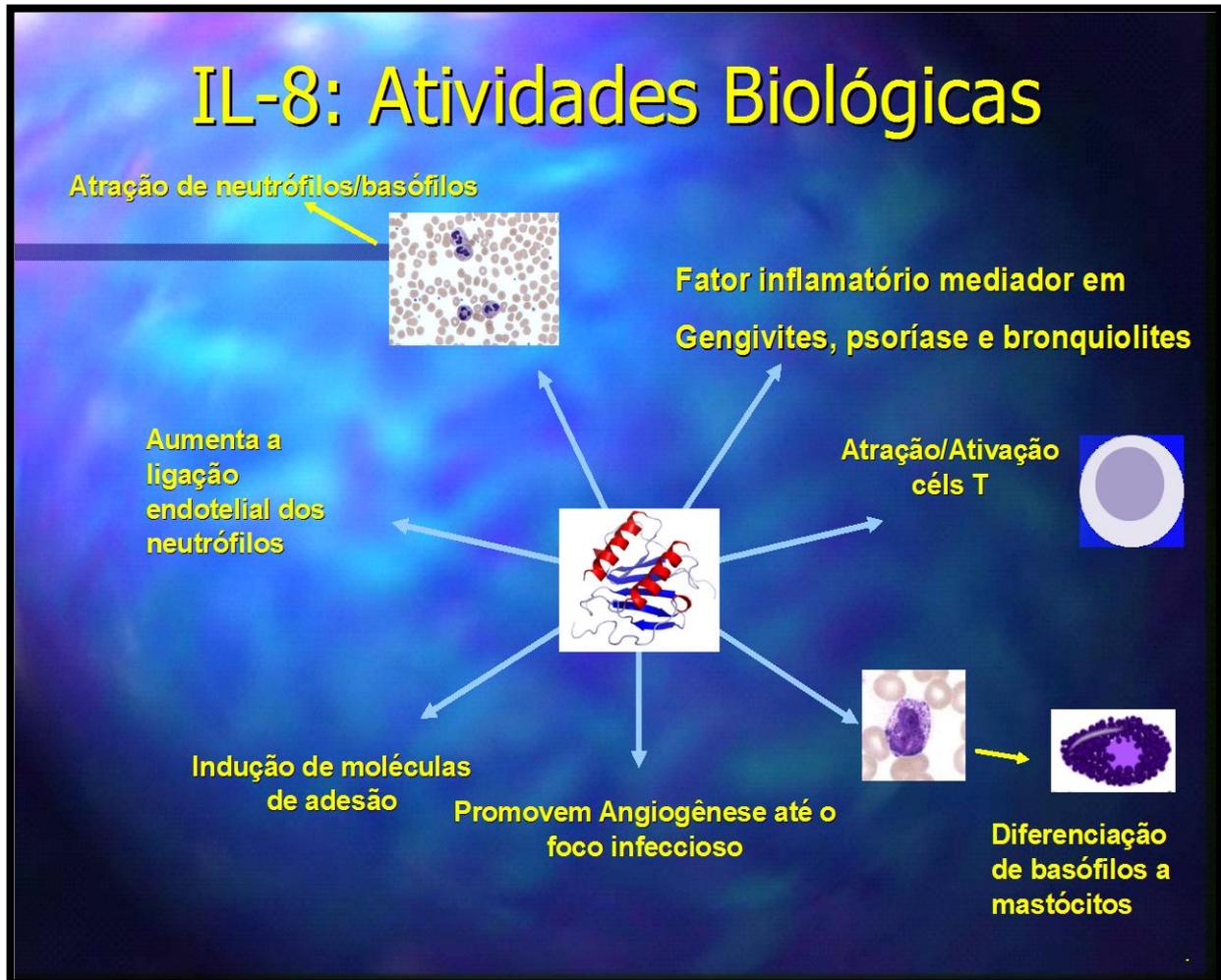
aterosclerose. Mais estudos e revisões sistemáticas necessitam ser realizadas sobre o tema.

#### 1.2.8.9.4 - IL-8

A IL-8 é produzida por algumas células sanguíneas e por outros tecidos. É membro da superfamília das quimiocinas CXC <sup>(179)</sup>. A maioria das ações da IL-8 é dependente da sua interação com neutrófilos <sup>(180)</sup>.

A interleucina 8(CXCL8) é encontrada na formação de ateromas e outros processos ateroscleróticos <sup>(181)</sup>. Esse fato já está bem trabalhado e revisado em muito artigos que abordam o papel de citocinas neste processo <sup>(182)</sup>. Também foi demonstrado que ela estimula a proliferação e migração das células musculares lisas endoteliais <sup>(183)</sup>. Além da sua função já conhecida de interação com neutrófilos, parece ter também uma interação com monócitos <sup>(184)</sup>. Outras implicações da inflamação, proliferação celular e dano na parede dos vasos incluem o aumento do risco de estenose pós colocação de *stent*, na qual é verificado altos níveis de IL-8 sérica <sup>(185)</sup>. Asano T e Ogawa S encontraram alta na expressão do mRNA da IL-8 plasmática durante os quadros de agudização da Doença de Kawasaki <sup>(186)</sup>. Muitos outros trabalhos citam a ação do TNF na inflamação, mas sabemos que esta citocina estimula a produção de várias outras, dentre elas a IL-8. Enfim, sabe-se que por vários meios e vias intercelulares, a IL-8 pode ser empregada como um marcador de mudanças e atividade no endotélio parede do vaso. Sabe-se atualmente que IL8 pode estar alterada na resposta th17 mediada por IL 17A e esta resposta é freqüente nas espondiloartrites. <sup>(239,240)</sup>.

Figura 5. Atividades biológicas da IL 8



### 1.3 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E ATEROSCLEROSE NA ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Pacientes com EA tem aumento de morbimortalidade cardiovascular quando comparados com a população geral <sup>(19)</sup>. Essa tendência aumentada parece ser predominantemente ligada à doença cardiovascular como indicado por estudos populacionais no Canadá, Reino Unido e Finlândia <sup>(187-190)</sup>. O risco cardiovascular em doenças auto-imunes é claramente multifatorial, mas, entre os mecanismos envolvidos, a aterogênese acelerada causada pela resposta inflamatória sistêmica parece ser um dos mais importantes. Esse mecanismo tem sido demonstrado na artrite reumatóide (AR) e no lúpus eritematoso sistêmico (LES)<sup>(20,21,22)</sup>.

O papel das lipoproteínas e células inflamatórias na aterosclerose está bem definido<sup>(122)</sup>. A influência de eventos autoimunes tem ganhado força progressivamente em função de alguns estudos que evidenciaram a presença de anticorpos contra vários antígenos expressos na placa aterosclerótica <sup>(149,150)</sup>. Como uma doença inflamatória, a aterosclerose tem sido relacionada a marcadores de inflamação sistêmica tais como proteína C reativa (PCR), fibrinogênio e recentemente a biomarcadores como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e proteases <sup>(191,192)</sup>.

A maioria dos estudos que correlacionam aterosclerose e EA são estudos transversais e que envolvem pequenas amostras de pacientes e controles. Han et al. <sup>(193)</sup> observaram que o risco de aterosclerose estava aumentado em até 1,5 vezes em uma coorte de pacientes com EA quando comparados aos seus controles. Altos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL colesterol) geralmente têm um efeito protetor, particularmente HDLc normal <sup>(194)</sup>. Há uma linha crescente de pesquisa indicando que o HDLc próinflamatório exerce um efeito não protetor <sup>(195)</sup>. Níveis séricos aumentados de triglicerídeos e lipoproteína de baixa densidade (LDL colesterol) têm sido relacionados a formação da placa; um índice aterogênico representado pela razão entre o colesterol total e o HDLc foi proposto a fim de discriminar melhor o prognóstico para doença cardiovascular <sup>(194,196)</sup>. Estudos com pequenas populações avaliando lipoproteínas em sujeitos com EA demonstraram colesterol total <sup>(197)</sup> e HDLc diminuídos <sup>(198)</sup>, mas estes estudos de duas décadas atrás não levaram em consideração possíveis vieses de confusão e nem a interação

destas lipoproteínas com inflamação sistêmica. Sattar et al. analisando parâmetros de risco cardiovascular em homens com EA, observaram que as concentrações de colesterol circulante e LDLc, estavam diminuídos e eram inversamente correlacionados com as concentrações de IL-6 ou PCR. O índice aterogênico também estava discretamente elevado neste mesmo estudo. Níveis diminuídos de HDLc foram mais frequentemente encontrados em indivíduos com EA que em controles <sup>(109,199,200)</sup>. Um estudo demonstrou que a síndrome metabólica era mais prevalente em EA que em controles, contudo, os autores não investigaram a relação entre inflamação e síndrome metabólica <sup>(109)</sup>. Nurmohamed et al. observaram níveis aumentados de atividade de doença em pacientes com EA, curiosamente associados com baixos níveis lipídicos <sup>(200)</sup>. Nesse mesmo estudo os autores observaram que um perfil lipídico aterogênico está mais correlacionado à concentração de HDLc diminuído que níveis alterados de colesterol total. Contudo, ainda não está claro se um perfil lipídico aterogênico específico está ou não presente na EA <sup>(109,200-202)</sup>.

Há considerável evidência de que a inflamação pode deteriorar o perfil lipídico <sup>(203,204)</sup>. Particularmente em pacientes com AR, o processo inflamatório que ocorre na membrana sinovial apresenta semelhanças com o processo que ocorre na parede vascular <sup>(122,205)</sup>. Embora a aterosclerose seja um fenômeno muito complexo, seu desencadeante parece ser a retenção subendotelial de apolipoproteína B contendo lipoproteínas.

Marcora et al. relataram evidências preliminares de caquexia em dezenove homens com EA de longa data <sup>(206)</sup>. Pesquisas adicionais são necessárias para determinar se essas mudanças no estado metabólico bem como a perda acelerada de músculo esquelético e modificações no IMC poderiam de fato mudar o perfil lipídico e assim induzir aterosclerose. Na resposta inflamatória crônica observada em pacientes portadores de AR com caquexia, a PCR e a IL-6 foram correlacionadas negativamente com a massa corpórea magra <sup>(207)</sup>. Alguns estudos prospectivos sugeriram que mesmo elevações modestas nas concentrações de IL-6 predizem doença coronariana (CHD) independentemente dos fatores de risco tradicionais <sup>(208,209)</sup>. Em particular, a IL-6 está correlacionada a dislipidemia e disfunção endotelial mesmo em quadros não inflamatórios <sup>(210)</sup>.

Disfunção endotelial deveria ser considerada mais apropriadamente como ativação endotelial, que por sua vez representa o desencadeamento de um fenótipo quiescente na direção de uma resposta de defesa do hospedeiro<sup>(65,211)</sup>. Esse processo é caracterizado por um desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores, gerando ativação de processos apoptóticos, remodelação vascular e atividade aumentada de fatores vasoconstritores e mediadores pró-inflamatórios e pró-trombóticos<sup>(211,212,214)</sup>. Esse processo desempenha um importante papel em todas as fases da aterosclerose<sup>(213)</sup> e parece ser um preditor independente de eventos coronarianos<sup>(214)</sup>.

Sabe-se que o endotélio desempenha um papel crucial na manutenção do tônus vascular e sua estrutura e um dos principais mediadores vasoativos derivados do endotélio é o NO. A dimetilarginina assimétrica (ADMA) é um inibidor endógeno de eNOS<sup>(215)</sup> e é metabolizada pela enzima dimetilaminohidrolase dimetilarginina (DDAH). Uma alteração na atividade e /ou expressão desta enzima pode contribuir para a patogênese da disfunção endotelial em diversas doenças. ADMA está aumentada no plasma de humanos com hipercolesterolemia, aterosclerose, hipertensão, insuficiência renal crônica e insuficiência cardíaca crônica. Níveis aumentados ADMA estão associados com redução da síntese de NO, avaliada pela vasodilatação endotélio-dependente prejudicada. Em diversos estudos prospectivos e transversais, ADMA foi considerada um marcador de risco cardiovascular<sup>(216)</sup>. Elevação da ADMA induz disfunção endotelial, que se manifesta clinicamente por prejuízo na vasodilatação endotélio-dependente, adesividade plaquetária aumentada, maior aderência de monócitos<sup>(217)</sup>. Recentemente a ADMA tem sido associada com artrite, incluindo artrite reumatóide e EA<sup>(218)</sup>. Keméry-Beke et al. identificaram níveis séricos de ADMA significativamente aumentados em pacientes com EA, quando comparados a pacientes com osteoartrite. Entretanto, não encontraram correlações entre os níveis de ADMA e duração da doença, intensidade de dor, BASDAI, BASFI, BASMI, qualidade de vida, PCR, positividade do HLA-B27, disfunção endotelial e aterosclerose carotídea. Sugerem que mais estudos são necessários para avaliar o possível papel da ADMA na EA e sua relação com a doença vascular.

O estudo da função endotelial na pesquisa clínica surgiu como um importante marco que complementa a mensuração de fatores de risco circulatório, a avaliação

de resultados clínicos cardiovasculares tradicionais e a implementação de técnicas de imagem para quantificação da doença arterial estrutural, incluindo a relação de espessura íntima/média (IMT) e ultrassonografia intravascular <sup>(65)</sup>.

Dados atuais indicam que neovascularização da vasa vasorum e aterosclerose parecem estar inseparavelmente ligadas, engatilhadas e perpetuadas por reações inflamatórias dentro da parede vascular <sup>(219)</sup>. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um regulador endógeno da integridade endotelial e um potente fator angiogênico. Ele desempenha um papel central na AR humana e em modelos animais de artrites <sup>(220)</sup>, e também desempenha papel significativo na formação óssea <sup>(221)</sup>. Sabe-se que a ossificação endocondral típica envolve um padrão de invasão vascular sobre uma cartilagem hialina calcificada. Um estudo recente conduzido em pacientes com espondiloartrites mostrou que a formação e crescimento de esporões ósseos nas enteses é promovido por ossificação endocondral, intramembranosa e condroidal; porém o mesmo estudo identificou que o padrão de invasão vascular da cartilagem calcificada não foi notória, como observada na ossificação endocondral típica <sup>(222)</sup>. Em um pequeno estudo, os níveis plasmáticos de VEGF estavam elevados em pacientes com EA em comparação ao grupo controle e embora os níveis de VEGF estivessem significativamente correlacionados com a pontuação do BASMI, os autores não avaliaram completamente a atividade de doença <sup>(223)</sup>. Toussiro et al. relataram que os níveis de VEGF estavam significativamente elevados em pacientes com espondiloartrites e AR em relação ao grupo controle. Os níveis séricos de VEGF foram fortemente correlacionados com índices clínicos e laboratoriais de atividade de doença em espondiloartrites <sup>(224)</sup>. Weiss et al, propuseram que a alta atividade dos fatores angiogênicos estimuladores de células endoteliais (ESAF), encontrados na EA, poderia refletir o processo angiogênico envolvido em neoformação óssea. Não se sabe ainda se o ESAF desempenha ou não um papel no processo de aterosclerose, porém os autores o propuseram como um novo marcador biológico para atividade de doença em pacientes com EA <sup>(225,226)</sup>.

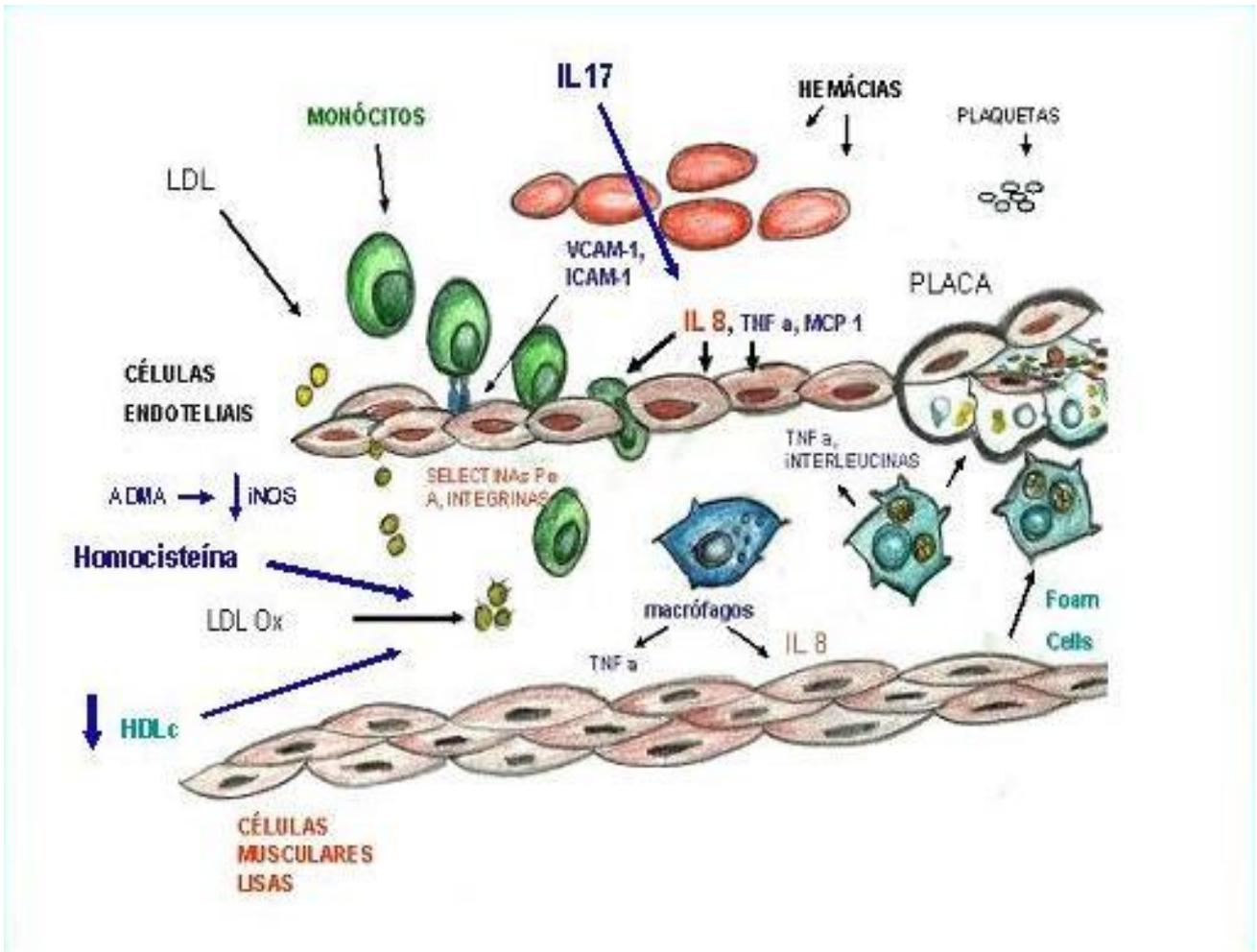
Estudos recentes e com um pequeno número de pacientes revelaram distúrbios da função vasorreguladora de endotélio associados a atividade de doença. Esses distúrbios se manifestam com aumento no número de células circulantes endoteliais em pacientes cuja atividade de doença está elevada. No

entanto, critérios de exclusão e os métodos de avaliação não foram os mesmos em todos os estudos<sup>(227,228)</sup>. Aumento dos níveis de células endoteliais circulantes em pacientes com doença aterosclerótica e inflamação vascular sugere uma relação direta entre o número dessas células na circulação periférica e a extensão da lesão endotelial<sup>(65)</sup>. Estas células podem ser mensuradas na circulação tanto pela citometria de fluxo combinada com seleção magnética de microesferas (Técnica Imunomagnética com Microesfera; Extração Imunomagnética) como também pela microscopia fluorescente<sup>(229)</sup>.

A ativação das células endoteliais leva ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão, que por sua vez, provocam a adesão de leucócitos e migração para o espaço subendotelial. Muitos desses marcadores circulantes foram avaliados em pacientes com EA (MCP-1, IL 6, V-CAM, I-CAM, TNFalfa). Devido a grande variabilidade na biodisponibilidade destes marcadores, vários estudos apresentaram resultados contraditórios. Assim, estes marcadores estão limitados à pesquisa clínica. O TNF alfa circulante é uma citocina importante envolvida na patogênese da EA e seus níveis estão aumentados em pacientes com EA<sup>(230,231)</sup>. O TNF alfa também bloqueia a ativação da eNOS, por interferir com a fosforilação Akt, que é essencial para a vasodilatação dependente de fluxo e acetilcolina (Ach)<sup>(232)</sup>. Dois estudos sugeriram que TNF alfa e IL-6 podem contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose em EA<sup>(115,199)</sup>, no entanto, um estudo indicou que os níveis de TNFalfa em pacientes com EA não diferiram dos controles, embora os níveis de IL-6 fossem mais elevados em pacientes com EA<sup>(110)</sup>. Além disso, os autores não encontraram uma correlação entre os níveis de MCP-1, IL-6 ou TNF alfa e as características clínicas ou parâmetros de rigidez arterial.

Caliskan et al. relataram que altos níveis circulantes de PCR e TNFa foram positivamente correlacionados com a reserva de fluxo coronariano (RFC)<sup>(115)</sup>; no entanto, sabe-se que os níveis circulantes de PCR e TNFa estão associados com a disfunção microvascular da pele mesmo em indivíduos normais<sup>(233,234)</sup>.

Fig 6. Disfunção do Endotélio e inflamação( Modelo na EA)



## 2. HIPÓTESE

Sabe-se que o sistema cardiovascular pode ser afetado na EA e pacientes espondilíticos podem cursar com alterações no sistema de condução elétrica cardíaco (infiltrado inflamatório nos sistemas de condução), maior incidência de doença arterial coronariana, dilatação da raiz aórtica, alterações valvares cardíacas e maior incidência de disfunção diastólica ventricular <sup>(19)</sup>, sendo que os dados epidemiológicos destas anormalidades apresentam grande variabilidade na literatura<sup>(235,236,237)</sup>. Alguns estudos demonstram que o envolvimento cardíaco pode ser subclínico e que a ecocardiografia pode ser útil em detectar precocemente estas anormalidades<sup>(238)</sup>. De maneira geral, pacientes espondilíticos somente são encaminhados para a realização de avaliação cardiovascular quando há aparecimento de sintomas clínicos. Disfunção endotelial é outro importante fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose precoce e há fortes evidências de que exista disfunção na EA como em outras doenças reumatológicas como Artrite Reumatóide e Lupus Eritematoso Sistêmico. A morbimortalidade na EA é diretamente correlacionada à mortalidade cardiovascular. Em nossa hipótese as alterações cardiovasculares estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de aterosclerose precoce conseqüentes à maior atividade de doença.

Entretanto, resultados clínicos controversos demonstram que os mecanismos que correlacionam a inflamação da coluna vertebral (na qual predominam o edema medular ósseo e entesites) ao desenvolvimento de doença aterosclerótica e maior disfunção cardiovascular não são perfeitamente conhecidos até o momento. Há necessidade de intensa produção científica na área para esclarecimento sobre quais são os mecanismos implicados na ligação entre as duas alterações patológicas e quais os mediadores destes processos. Como desdobramento científico e prático há necessidade de esclarecer se o tratamento do processo inflamatório da coluna vertebral, além de melhorar as manifestações clínicas e diminuir a progressão radiográfica, pode também diminuir as complicações cardiovasculares, aumentando assim a sobrevida de pacientes espondilíticos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estabelecer uma correlação entre conhecidos marcadores de disfunção endotelial e de desenvolvimento de aterosclerose com parâmetros internacionais de avaliação de atividade de doença na Espondilite Anquilosante.

#### 3.2 Objetivos específicos

Os trabalhos conduzidos tiveram como objetivos específicos :

- A. Investigar a associação entre a quimocina IL8, que parece estar aumentada pela exacerbação da resposta th17 presente nas espondiloartrites( e é sabidamente um marcador de disfunção endotelial) com escores de atividade de doença, em pacientes com EA sem uso de anti-TNF. Investigar a associação de outros conhecidos biomarcadores de disfunção endotelial (MCP-1, V-CAM, I-CAM) e escores de atividade de doença.
- B. Determinar as alterações inflamatórias no desenvolvimento e progressão de aterosclerose subclínica por LDL oxidada e modificada, em pacientes com EA e em grupo controle e correlacionar estes achados com os índices de atividade de doença.

## 4. RESUMOS DOS ARTIGOS

### 4.1 IL-8 EM ASSOCIAÇÃO COM ATIVIDADE DE DOENÇA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE SEM TRATAMENTO COM AGENTES ANTI-TNF

.

**Objetivo:** Investigar a associação entre IL8 e outros biomarcadores de disfunção endotelial(MCP-1, V-CAM, I-CAM) e escores de atividade de doença em uma amostra de 54 pacientes portadores de Espondilite Anquilosante(EA) e sem tratamento com agentes biológicos anti-TNF alfa.

**Pacientes e Métodos:** 54 pacientes com EA sem tratamento com agentes anti-TNF entre 18 e 80 anos que preenchiam os Critérios de Nova Iorque e ao mesmo tempo os critérios axiais propostos pelo grupo ASAS, foram avaliados por meio de um questionário epidemiológico que incluiu além de dados clínicos: BASDAI, BASFI, ASQoL, ASDAS, dosagem de VHS, PCR e dos níveis plasmáticos de MCP-1, IL-8, ICAM-1 e VCAM-1.

**Resultados:** IL-8 variou proporcionalmente aos escores de atividade de doença da Espondilite Anquilosante(BASDAI e ASDAS) $p < 0,05$  sendo portanto, fortemente correlacionada com atividade de doença. Os níveis das moléculas de adesão I-CAM e VCAM, como já descrito em outros estudos, foram positivamente correlacionados com fatores de predisposição para doença cardiovascular mas não com atividade de doença.

#### **Conclusão:**

IL-8 foi fortemente correlacionada com marcadores clínicos de atividade de doença e pode ser uma variável adicional para a avaliação geral de atividade na EA.

## 4.2 IL-8 IN ASSOCIATION WITH DISEASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS WITHOUT TREATMENT WITH ANTI-TNF AGENTS

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the association between IL8 and other biomarkers of endothelial dysfunction (MCP-1, V-CAM, I-CAM) and the disease activity scores in a sample of 54 patients with Ankylosing Spondylitis(AS) without use of biological agents.

**Patients and Methods:** 54 AS patients without treatment with anti-TNFs agents between 18 and 80 years old, who met modified New York criteria and at the same time the axial ASAS criteria, were evaluated using an epidemiological questionnaire that included among others clinical data, BASDAI, BASFI, ASQoL, ASDAS and plasma levels of CRP, ESR, MCP-1, IL-8, ICAM-1 and VCAM-1.

**Results:** IL-8 varied in proportion to disease activity rates (BASDAI and ASDAS)  $p < 0.05$ , being strongly correlated with the disease activity. The levels of adhesion molecules I-CAM and VCAM, as described in other studies, were positively correlated with predisposing factors for cardiovascular disease. **Conclusion:** IL-8 has shown to be strongly correlated with clinical markers of disease activity and inflammatory activity and may be an additional variable to the overall assessment of the activity of the AS.

**RHEI: Your manuscript entitled IL-8 BUT NOT OTHER BIOMARKERS OF ENDOTHELIAL DAMAGE IS ASSOCIATED WITH DISEASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS WITHOUT TREATMENT WITH ANTI-TNF AGENTS.**

De: **em.rhei.9.2ea5ff.cd2473a8@editorialmanager.com** em nome de **Ernst-Martin Lemmel** (monika.suschka@itsmagic.com)

Enviada: quarta-feira, 24 de outubro de 2012 12:01:13

Para: valderilio feijó azevedo (valderilio@hotmail.com)

Ref.: Ms. No. RHEI-D-12-00200R1

IL-8 BUT NOT OTHER BIOMARKERS OF ENDOTHELIAL DAMAGE IS ASSOCIATED WITH DISEASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS WITHOUT TREATMENT WITH ANTI-TNF AGENTS.

Rheumatology International (Clinical and Experimental Investigations)

Dear Doctor azevedo,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in Rheumatology International (Clinical and Experimental Investigations).

It was accepted on 24-10-2012.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Ernst-Martin Lemmel, Prof.

Editor-in-Chief

Rheumatology International (Clinical and Experimental Investigations)

**Rheumatology International (Clinical and Experimental Investigations)**  
**IL-8 BUT NOT OTHER BIOMARKERS OF ENDOTHELIAL DAMAGE IS ASSOCIATED**  
**WITH DISEASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS**  
**WITHOUT TREATMENT WITH ANTI-TNF AGENTS.**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	RHEI-D-12-00200R1
<b>Full Title:</b>	IL-8 BUT NOT OTHER BIOMARKERS OF ENDOTHELIAL DAMAGE IS ASSOCIATED WITH DISEASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS WITHOUT TREATMENT WITH ANTI-TNF AGENTS.
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Keywords:</b>	IL-8; MCP-1; VCAM-1; ICAM-1; biomarkers; Endothelial Damage; ankylosing spondylitis
<b>Corresponding Author:</b>	valderilio feijó azevedo, MD Federal University of Paraná curitiba, paraná BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Federal University of Paraná
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	valderilio feijó azevedo, MD
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	valderilio feijó azevedo, MD JOSE F ROCHA NETO, PHD ANDREA STINGHEN, PHD pedro g lorencetti, medical student wagner p miller, medical student beatriz p gonçalves, medical student carla c szyhta, medical student roberto pecoits-Filho, Phd, professor
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>ABSTRACT</b></p> <p>Objective: To investigate the association between IL8 and other biomarkers of endothelial dysfunction (MCP-1, V-CAM, I-CAM) and the disease activity scores in a sample of 54 patients with Ankylosing Spondylitis(AS) without use of biological agents. Patients and Methods: 54 AS patients without treatment with anti-TNFs agents between 18 and 80 years old, who met modified New York criteria and at the same time the axial ASAS criteria, were evaluated using an epidemiological questionnaire that included among others clinical data, BASDAI, BASFI, ASQoL, ASDAS and plasma levels of CRP, ESR, MCP-1, IL-8, ICAM-1 and VCAM-1. Results: IL-8 varied in proportion to disease activity rates (BASDAI and ASDAS) <math>p &lt; 0.05</math>, being strongly correlated with the disease activity. The levels of adhesion molecules I-CAM and V-CAM, as described in other studies, were positively correlated with predisposing factors for cardiovascular disease. Conclusion: IL-8 has shown to be strongly correlated with clinical markers of disease activity and inflammatory activity and may be an additional variable to the overall assessment of the activity of the AS.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	matucci cerinic, phd professor , Phd, University of Florence cerinic@unifi.it

## INTRODUCTION

Ankylosing Spondylitis (AS) is a chronic autoimmune inflammatory disease, typically with axial joint involvement. Its prevalence is higher among young men, Caucasians and HLA-B27 positives<sup>1,2</sup>. Inflammatory Back Pain (IBP) associated with morning stiffness is the main symptom of the disease.<sup>1,3</sup> Although it does not occur in all patients with AS, extra-articular manifestations are responsible for increased morbidity and mortality. High incidence of cardiovascular mortality in patients with AS have stimulated researchers to the study of possible etiologic or risk factors involved<sup>4</sup>. Han et al. found an increased risk of atherosclerosis by 1.5 times in a cohort of patients with AS compared to the controls.<sup>5</sup>

The cardiovascular risk in autoimmune diseases is multifactorial. Traditional cardiovascular risk factors have been reported to be more prevalent in patients with rheumatic diseases as smoking, hypertension, low high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels, diabetes and obesity. Furthermore some inflammation factors are being correlated with accelerated atherogenesis. The C-Reactive Protein is the well established factor related with the low-grade inflammation of the vessels<sup>6</sup> but reduced plasma levels of lipoprotein associated phospholipase A<sub>2</sub> (Lp-PLA<sub>2</sub>) and apoprotein A-I also predispose to coronary heart disease<sup>7</sup>. Specifically in AS, the hypertension<sup>8</sup>, low levels of HDL-cholesterol and apoA-I<sup>9</sup> are correlated with increased cardiovascular risk.

Currently, the endothelium is considered the main regulator of vascular homeostasis and pathogenesis of atherosclerosis is closely related to systemic inflammation, autoimmunity, chronic diseases and dyslipidemia<sup>10</sup>. Lipoproteins, activated neutrophil, platelets and other pro-inflammatory factors play an important role in the inflammation in autoimmune diseases.<sup>11,12</sup> Atherosclerosis has been associated with markers of systemic inflammation such as CRP, fibrinogen, and recently, biomarkers such as cytokines, chemokines, adhesion molecules and proteases.<sup>13,14</sup> Due to biological variability and availability, many of these biomarkers such as MCP-1, IL 8, V-CAM, I-CAM, have shown contradictory results, which somehow still limits their measurements to clinical research. IL-8, a member of the superfamily of chemokines CXC<sup>15</sup> was found

increased in studies approaching the role of cytokines in the atherosclerotic process.<sup>16</sup> Its production is stimulated by the action of TNF alpha and most of its actions depend on the interaction with neutrophils<sup>17</sup> and monocytes<sup>18</sup>. IL 8 also stimulates proliferation and migration of smooth muscle endothelial cells.<sup>19</sup> MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) is a molecule belonging to the family of C-C chemokines  $\beta$ , which plays an important role in inflammation because of its power attractor on monocytes. MCP-1 interacts with the CCR2 receptor of these cells stimulating tropism to the inflammatory site<sup>20</sup> and it is secreted by endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts and immune cells such as T lymphocytes and macrophages located in the stimulus place<sup>21</sup>. The adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 are stimulated by inflammatory cytokines, expressed in the luminal surface of endothelial cells or soluble in plasma and mediate the adhesion of various types of leukocytes to the endothelial surface. The objective of this study was to investigate the association between the levels of IL 8 and other biomarkers of endothelial dysfunction such as MCP-1, V-CAM, I-CAM with disease activity scores (BASDAI, ASDAS); the index of quality of life ASQoL, factors related to cardiovascular disease and the functional activity score (BASFI) in a sample of patients with AS.

## **MATERIALS AND METHODS**

*Study Population.* Fifty-four patients with AS followed between December 2009 and February 2010 at the Outpatient Spondyloarthritis Clinic of Federal University of Paraná (UFPR) were initially recruited for this study and submitted to an Informed Consent (IC). Inclusion criteria were age between 18 and 80 years, presence of AS according to the modified New York criteria<sup>22</sup> and also axial ASAS at the same time<sup>23</sup>. The exclusion criteria were use of anti-TNF agents or other biologics, signs of acute inflammation or infectious disease, presence of other concomitant autoimmune diseases, presence of malignancy, liver dysfunction or diabetes. At the recruitment, patients were categorized according to age, sex, weight, height, smoking, diabetes mellitus (DM), Hypertension (HBP), cardiovascular disease, dyslipidemia, cerebrovascular

disease, peripheral vascular disease and use of concomitant medication. No control group was included because the main purpose of the study was to correlate the level of these endothelial markers, mainly IL8 with specific disease activity scores in AS. All patients were using NSAIDs for more than one year and no one were using Methotrexate for axial disease. Two patients were being treated with sulfasalazine and none of them was taking steroids. *Measures.* After the initial consultation, patients who agreed and signed the IC were submitted to the proposed methodology. The assessment of disease activity and functional status were performed by using protocols BASDAI and BASFI. A questionnaire of quality of life in AS (ASQoL) was also applied. After responding to the questionnaires, all of them answered a clinical and epidemiological survey. Then, patients were examined with a specific focus for clinical signs of AS. After the physical examination, two blood samples were collected from each patient. The tubes with blood samples were stored in a refrigerator at -80 degrees Celsius and were later transported to the laboratory of the Health Sciences Research Center at the Catholic University of Paraná.

Samples of patients serum were separated by immediately centrifugation (1,500 g for 10 minutes), divided into tubes, and stored at -80° C until the analysis. Plasma levels of MCP-1, IL-8, ICAM-1 and VCAM-1 were measured by ELISA method (enzyme-linked immunosorbent assay) using commercial kits with antibodies (R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA). The concentrations of chemokines (pg/ml) and adhesion molecules (ng/ml) were calculated with reference to standard curves performed with the corresponding recombinant molecule. The measurement range of the ELISA system was 31.25-2,000 pg/ml for MCP-1 and IL-8 and 0.03 to 2 ng/ml for ICAM-1 and VCAM-1. When the values were outside the expected range, the samples were previously diluted. The intra-assay coefficients of variation (CV) for MCP-1, IL-8, ICAM and VCAM-1 were 6.0, 8.0, 7.9 and 8.2%, respectively, and inter-assay CV 6.2, 7.7, 7.7 and 8.1% respectively. There were also assayed in the same blood tests CRP, ESR, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides and glucose. ASDAS CRP was calculated only after the release of ultra-sensitive CRP result.

*Statistical Analysis.* The results obtained in the study were expressed as averages, median, minimum values, maximum values and standard deviation

(quantitative variables) or as frequencies and percentages (qualitative variables). All variables were normally distributed according to Shapiro Wilk test. To compare the groups regarding quantitative variables, it was considered the nonparametric Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis nonparametric test. To assess the association between two quantitative variables, it was estimated the Spearman correlation coefficient. P values <0.05 were considered statistically significant. The data were organized into an Excel spreadsheet and analyzed with the computer program Statistica v.8.0.

## RESULTS

54 patients were evaluated (09 women and 45 men). The average age was  $43 \pm 11.6$  years. 46 patients were regularly taking NSAIDs and none was using anti-TNF. The sample general characteristics are presented in **Table 1**. The measurements of the 4 biomarkers were correlated to the indexes of disease activity such as CRP, VAS, ASDAS and BASDAI. There were also correlated with factors related to cardiovascular disease such as HBP, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), body mass index (BMI), waist circumference (WC), total cholesterol (TC), DM, Dyslipidemia, history of coronary artery disease (CAD Hx), smoking, alcohol consumption, as well as the functional activity BASFI score.

We observed that the rate of MCP-1 showed an inverse correlation to the measurement of CRP (Spearman correlation coefficients of -0.33 with  $p = 0.018$ ) and factors related to cardiovascular disease, such as HBP ( $p = 0.01$ ) and CAD Hx ( $p = 0.058$ ).

V-CAM was increased in hypertensive patients, but not correlated with CRP or BASDAI. (**Table 2**)

I-CAM was positively correlated with the presence of factors such as HBP, DBP, DBP, Dyslipidemia, Smoking and CAD Hx but not with disease activity.

IL-8 varied proportionally with two indices of disease activity analyzed, BASDAI and ASDAS. (Table 3).

## DISCUSSION

No control group was included in this study. The main purpose was to correlate the level of these endothelial markers, mainly IL8 with disease activity in a sample of patients with AS without use of anti-TNFs agents.

Our selected sample did not include patients using anti-TNFs in order to facilitate the analysis of the criteria for inflammatory activity, although most of them were in regular use of NSAIDs. There is considerable evidence that the biomarkers evaluated in our study are very well correlated with endothelial dysfunction in case controlled studies in AS and other rheumatic diseases as well. The link between high disease activity and the onset of cardiovascular disease in patients with Ankylosing Spondylitis is under investigation.

While employed as a marker of changes and activity in the endothelium, IL8 has been presented with conflicting and inconclusive results in the medical literature. While some studies show correlation between patients with angina and increased plasma levels of IL-8<sup>19</sup>, or even high levels of IL-8 in patients who later came to coronary artery disease<sup>20</sup>, other studies suggest a protective effect of IL-8, delivering little attraction and little migration of neutrophils to the chemotactic site of atherosclerotic plaques via modulation by VCAM-1<sup>24</sup>.

IL 8 has also been studied in patients with AS and its levels seems to be elevated when compared with controls, but it has not been compared with specific AS disease activity scores.<sup>25,26</sup>

In this study, IL-8 did not correlate with factors related to cardiovascular disease, SBP, DBP, BMI, and TC (descriptive levels: 0.531, 0.585, 0.860, 0.463 and 0.934). IL8 also did not correlate with BASFI functional activity score ( $p = 0.403$ ). However, levels of IL-8 were positively correlated and statistically significant to ASDAS and BASDAI ( $p\text{-value} = 0.015$ ) and curiously not statistically significant related to CRP (0.728) alone, VAS back pain (0.539) or

ASQoI (0,221). (**Table 2**).Based in our results we consider that IL-8 may be an additional useful marker of disease activity although it has not had a correlation with acute inflammatory activity when measured only by CRP.

Hwang et al. demonstrated that ICAM-1 and E-selectin are potent biomarkers of atherosclerosis and cardiovascular damage, yet not so strong correlation was found with VCAM-1<sup>27</sup>. A meta-analysis conducted by Malik et al.<sup>28</sup>demonstrated a significant association between levels of ICAM-1 and VCAM-1 and traditional risk factors for coronary disease. Corroborating with the same idea, the prospective study of Haim et al. showed significant association between the concentration of soluble ICAM-1 and increased risk for future coronary events, but did not take into account several other factors<sup>29</sup>. Thus, although it was not our primary objective, our results also reinforce what has been described in the literature, i.e., the unquestionable quality of these molecules, particularly ICAM-1, as early markers of cardiovascular lesions.

In this study we have shown that VCAM-1 is a good marker for HBP, while ICAM-1 is a good marker for DBP, Smoking, HBP, Dyslipidaemia and CAD Hx but do not have association with specific disease activity scores of AS. Finally and the most important, IL-8 proved to be a good marker for disease activity, since it is associated only with BASDAI and ASDAS.

## CONCLUSION

Our results should be interpreted cautiously, all the observations are cross-sectional and do not provide evidence of causality or directionality. Some limitations include the small sample size and the lack of analyses between medications used in the treatment and IL-8. In the other hand we believe that the absence of a control group does not jeopardize our results. At the same time, a single temporary measure of four biomarkers and of three criteria for disease activity were performed to determine correlations between variables. The results of this study demonstrated that IL-8 can be used as a marker of

inflammatory activity due to its statistically significant correlation with BASDAI and ASDAS.

#### NOTES FROM THE AUTHORS

- **Azevedo V F and Faria Neto wrote the final version of the article**
- **Azevedo, Lorencetti and Miller did the literature review.**
- **Pecoits-Filho did the statistical analysis**
- **Stinghen performed all the lab analysis**
- **Azevedo, Szytha., Piantoni, Lorencetti and Miller performed patients evaluation**

**DISCLOSURES: NONE**

**Table 1**  
Sample General Characteristics

<b>Variable</b>	<b>n</b>	<b>Average</b>	<b>Standard Deviation</b>
Age	54	43.0	11.6
Time to Diagnosis (months)	54	121.5	96.8
MCP-1 (Pg/mL)	54	201.3	124.9
IL-8 (Pg/mL)	54	134.6	331.8
VCAM-1 (Ng/mL)	54	385.5	169.9
ICAM-1 (Ng/mL)	54	79.4	42.2
SBP	54	123.1	20.0
DBP	54	82.5	12.5
BMI	52	25.0	4.2
WC (cm)	54	92.7	9.2
Total Cholesterol	52	194.9	31.3
CRP-Us	52	2.7	2.9
VAS by Med	54	5.6	3.0
ASQoL	52	10.1	5.8
BASFI	54	5.7	3.3
BASDAI	54	4.9	2.5
ASDAS	54	2.4	1.4

**Table 3**

Relation between IL-8 , BASDAI and ASDAS.

<b>Variables</b>	<b>n</b>	<b>Spearman Correlation Coef.</b>	<b>p-value</b>
BASDAI	54	0.34	0.015
ASDAS	54	0.35	0.036
CRP	54	0.05	0.728*
VAS Back Pain	54	0.09	0.539*
ASQoI	54	0.17	0.221*

\*without statistic relevance.

Relation between V-CAM, CRP and factors related to cardiovascular disease.

<b>Variables</b>	<b>References</b>	<b>n</b>	<b>Average</b>	<b>p-value</b>
HBP	No	39	353.4	0.018
	Yes	15	468.9	
CRP	≤ 0.6	7	331.3	0.511
	> 0.6	47	396.6	
Dyslipidemia	No	48	372.5	0.178
	Yes	6	489.2	
CAD Hx	No	48	378.9	0.122
	Yes	6	438.4	
Smoking	No	42	372.3	0.544
	Yes	12	431.8	

### 4.3 AVALIAÇÃO DE ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE LDL MINIMAMENTE MODIFICADA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E SUA CORRELAÇÃO COM BASDAI.

#### RESUMO

Aterosclerose acentuada está presente em algumas doenças auto-imunes, principalmente em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide. Apesar do uso de corticoesteróides ser um fator de confusão devido a seus efeitos negativos sobre vários fatores de risco cardiovascular, considera-se que a inflamação *per se* tenha um papel na aterogênese destes pacientes. Nós avaliamos aterosclerose sub-clínica e os níveis séricos da LDL minimamente modificada, em pacientes com espondilite anquilosante (EA). Quatorze pacientes que preenchem os critérios diagnósticos de Nova Iorque para EA foram comparados com 15 controles. A espessura da camada íntima-média das carótidas (EIM) foi medida através de ultra-sonografia bilateralmente nas artérias carótidas comum, interna e na bifurcação. Os grupos eram semelhantes em relação aos fatores de risco cardiovascular. Apenas um paciente do grupo de EA estava sob o uso de corticoesteróide. A presença de inflamação ativa foi demonstrada através dos níveis mais elevados de PCR e altos níveis de BASDAI nos pacientes do que nos controles (12,36 vs 3,45 mg/dl,  $p=0,002$ ). Não houve diferença na EIM de carótidas entre os grupos, em nenhum ponto das artérias. A média da EIM (6 medidas, em 3 pontos pré-especificados bilateralmente) foi  $0,72 \pm 0,28$  no grupo EA e  $0,70 \pm 0,45$  mm nos controles ( $p=0,91$ ). Os níveis da LDL minimamente modificada não tiveram diferença entre ambos os grupos ( $14,03 \pm 17,40$  vs  $13,21 \pm 10,21$ ;  $p=0,88$ ). Concluindo, pacientes com EA não demonstraram maior EIM de carótidas do que os controles. Também não houve diferença entre os níveis séricos da LDL minimamente modificada em ambos os grupos.

#### **4.4 EVALUATION OF SUB-CLINICAL ATHEROSCLEROSIS AND PLASMA LEVELS OF MINIMALLY MODIFIED LDL IN PATIENTS WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS AND ITS CORRELATION WITH BASDAI**

##### **ABSTRACT**

Accelerated atherosclerosis has been shown in some autoimmune diseases, mainly in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. Although high prevalence of corticosteroids use may be a confounding factor due to their detrimental effects on several risk factors, systemic inflammation per se is supposed to play an important role in atherogenesis in these patients. We have evaluated sub-clinical atherosclerosis and plasma levels of circulating electronegative LDL, which represents the fraction of LDL that is minimally modified, in patients with ankylosing spondylitis (AS). Fourteen patients who fulfilled the modified New York criteria for AS were compared with 15 paired controls. Carotid intimal-media thickness (IMT) was assessed by ultrasonography bilaterally in common carotid artery, internal carotid artery and bifurcation. Groups were homogeneous regarding cardiovascular risk factors. Only a single patient in AS group was in use of corticosteroid. The presence of active inflammation was demonstrated by elevated BASDAI and higher CRP levels and in patients than in controls (12.36 vs. 3.45 mg/dl,  $p=0.002$ ). No difference was found in carotid IMT between both groups, in any site of artery. Averaged IMT (6 measurements, at 3 pre-specified sites bilaterally) was  $0.72 \pm 0.28$  in AS group and  $0.70 \pm 0.45$  mm in controls ( $p=0.91$ ). Minimally modified LDL did not differ significantly either between patients and controls ( $14.03 \pm 17.40$  vs.  $13.21 \pm 10.21$ ;  $p=0.88$ ). In conclusion patients with AS did not show increased carotid IMT in comparison to controls. In the same way, circulating plasma levels of LDL(-), did not differ significantly in both groups.

Elsevier Editorial System(tm) for Brazilian Journal of Rheumatology  
Manuscript Draft

Manuscript Number: BJR-D-12-00017

Title: Evaluation of sub-clinical atherosclerosis and plasma levels of minimally modified LDL in patients with ankylosing spondylitis and its correlation with disease activity

Article Type: Original

Keywords: Atherosclerosis; Inflammation; Ankylosing spondylitis; Minimally modified LDL; Carotid Intimal-media thickness

Corresponding Author: Dr Valderilio feijó Azevedo, M.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Paraná

First Author: Fernanda T Ceccon, medical doctor, cardiologist, MsC

Order of Authors: Fernanda T Ceccon, medical doctor, cardiologist, MsC; Valderilio feijó Azevedo, M.D.; Carlos A Engelhorn , medical doctor, PhD, Adjunct professor; Dulcinéia S Abdalla, pharmacist, PhD; Tanize E Faulin, pharmacist, PhD; roberto pecoits-filho, phd, nephrologist; Luiz c Guarita-Souza , phd, cardiologist; Jose R Faria Neto, cardiologist, professor, PhD

Abstract: Objective: To evaluated sub-clinical atherosclerosis and plasma levels of circulating electronegative LDL, which represents the fraction of LDL that is minimally modified, in patients with ankylosing spondylitis (AS).

Methods: Fourteen patients who fulfilled the modified New York criteria for AS were compared with 15 controls. Carotid intimal-media thickness (IMT) was assessed by ultrasonography bilaterally in common carotid artery, internal carotid artery and bifurcation.

Results: Groups were homogeneous regarding cardiovascular risk factors. Only a single patient in AS group was in use of corticosteroid. The presence of active inflammation was demonstrated by elevated BASDAI in AS patients than in controls ( $5,6 \pm 1,2$  vs  $1,3 \pm 0,7$ ;  $p=0,047$ ) and also higher CRP levels than in controls ( $12,36$  vs.  $3,45$  mg/dl,  $p=0,002$ ). No difference was found in carotid IMT between both groups, in any site of artery. Averaged IMT (6 measurements, at 3 pre-specified sites bilaterally) was  $0,72 \pm 0,28$  in AS group and  $0,70 \pm 0,45$  mm in controls ( $p=0,91$ ). Minimally modified LDL did not differ significantly either between patients and controls ( $14,03 \pm 17,40$  vs.  $13,21 \pm 10,21$ ;  $p=0,88$ ).

Conclusions: patients with AS did not show increased carotid IMT in comparison to controls. In the same way, circulating plasma levels of LDL(-) did not differ significantly in both groups.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate sub-clinical atherosclerosis and plasma levels of circulating electronegative LDL, which represents the fraction of LDL that is minimally modified, in patients with ankylosing spondylitis (AS).

**Methods:** Fourteen patients who fulfilled the modified New York criteria for AS were compared with 15 controls. Carotid intimal-media thickness (IMT) was assessed by ultrasonography bilaterally in common carotid artery, internal carotid artery and bifurcation.

**Results:** Groups were homogeneous regarding cardiovascular risk factors. Only a single patient in AS group was in use of corticosteroid. The presence of active inflammation was demonstrated by elevated BASDAI in AS patients than in controls ( $5.6 \pm 1.2$  vs  $1.3 \pm 0.7$ ;  $p=0.047$ ) and also higher CRP levels than in controls ( $12.36$  vs.  $3.45$  mg/dl,  $p=0.002$ ). No difference was found in carotid IMT between both groups, in any site of artery. Averaged IMT (6 measurements, at 3 pre-specified sites bilaterally) was  $0.72 \pm 0.28$  in AS group and  $0.70 \pm 0.45$  mm in controls ( $p=0.91$ ). Minimally modified LDL did not differ significantly either between patients and controls ( $14.03 \pm 17.40$  vs.  $13.21 \pm 10.21$ ;  $p=0.88$ ).

**Conclusions:** patients with AS did not show increased carotid IMT in comparison to controls. In the same way, circulating plasma levels of LDL(-) did not differ significantly in both groups. **Keywords**

Atherosclerosis . Inflammation . Ankylosing spondylitis . Minimally modified LDL . Carotid Intimal-media thickness

## Introduction

Atherosclerosis is a progressive disease of the large and medium size arteries involving inflammation, lipid accumulation, cell death, and thrombosis in vessel wall<sup>1</sup>. The “response to injury hypothesis” postulates that long-term endothelial cell injury alters endothelial permeability to low density lipoproteins (LDL) and induces leukocyte adhesion and migration to sub-endothelial space<sup>2</sup>. Regardless of the risk factor inducing endothelial dysfunction, the following inflammation process will lead to plaque formation. The uptake of oxidized LDL (OxLDL), but not native LDL, by macrophages in vessel wall will lead to the formation of foam cells, that are not only a reservoir of modified lipids, but also a source of proinflammatory mediators contributing to plaque progression<sup>3</sup>. Therefore, proinflammatory OxLDL may be a unifying link between lipid accumulation and inflammation<sup>4</sup>. Although most of the oxidation of LDL occurs in vessel wall, lipoproteins can be minimally modified in plasma becoming more prone to oxidation on a subsequent entry into the intima<sup>5</sup>. A more electronegative subfraction of LDL, called LDL(-) has been subfractionated by high resolution ion exchange chromatography (IE-HPLC) and seems to represent circulating minimally modified LDL in plasma<sup>6</sup>.

The recognition that inflammation is the main feature of atherosclerotic disease has led to a series of studies reporting high prevalence of atherosclerosis in chronic inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE)<sup>7, 8</sup>. There is a twofold increased risk for myocardial infarction and stroke in patients with RA, with risk increasing to nearly threefold in those who have the disease for 10 years or more<sup>9</sup>. This increased morbidity and mortality due to atherosclerosis seems to depend not only on traditional RF, that may be negatively affected by corticosteroid use. Inflammatory mechanisms seem to be associated with worse cardiovascular outcomes in these patients<sup>10-12</sup>. Although some controversial results have been published, another plausible mechanism for accelerated atherosclerosis in these patients may be an increased level of OxLDL<sup>13</sup>.

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic rheumatic disease that compromises mainly the spine and sacroiliac joints. Despite its inflammatory origin like AR and SLE, it's not totally clear if atherosclerosis accounts for higher mortality in these patients<sup>14,15</sup>. As steroids are not commonly part of clinical treatment of these patients, AS may be a better model to evaluate the role of inflammation in atherosclerosis. In this study we evaluated subclinical atherosclerosis (carotid intimal-media thickness – IMT) and plasma levels of minimally modified LDL in patients with AS in comparison to controls.

## **Methods**

### **Study population**

In this cross-sectional study we enrolled 14 patients who fulfilled the modified New York<sup>16</sup> criteria for AS and 13 controls. Written informed consent was obtained from all subjects and the research protocol was approved by the Ethical Committee of the Catholic University of Paraná. Essentials of diagnosis of AS were inflammatory back pain (IBP) in young adults, generally worst in the morning; progressive limitation of back motion and chest expansion; peripheral arthritis; anterior uveitis; diagnostic radiographic changes in sacroiliac joints and elevated erythrocyte sedimentation rate (ESR) or C reactive Protein (CRP). Patients were recruited in the ADORE Association, a Brazilian association of rheumatic patients. Controls were enrolled in a 1:1 ratio matched for age, sex and CVD risk factors status. Subjects were questioned about lifestyle and clinical information. Age, gender, BASDAI and BMI were recorded. Blood samples were collected for the biochemical measurements of complete lipid profile, fasting blood glucose, hematology evaluation, erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein (CRP) and minimally modified LDL. Samples were collected in the morning, after a fasting period of 10-12h; serum and plasma were separated and frozen at -22°C. Cholesterol and triglyceride levels were determined by fully enzymatic techniques. LDL cholesterol was calculated as described by Friedwald formula. High sensitivity CRP was assessed by turbidimetry methodology.

### **Minimally modified LDL**

---

The plasma LDL fraction is comprised of a heterogeneous population of particles that varies with respect to charge<sup>17</sup>, density, size, antioxidant content, presence of apoproteins other than apoB and degree of oxidative modification<sup>18</sup>. Concentrations of minimally modified LDL in blood plasma were determined by ELISA using an anti-LDL human monoclonal antibody (mAb3D1036). The mAb3D1036 recognizes an epitope formed due to slight loss of apo B100 secondary structure on minimally modified LDL particles. Microplates (EIA/RIA, Costar, Cambridge, Mass., USA) were coated with 50µl mAb3D1036 (1µg/well) in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.4, 0.1M) and incubated overnight at 4°C. Then, each microplate was washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS; Tris-HCl 50mM and NaCl 150mM, pH 7.4) containing Tween 20 (0.5%) and blocked with 5% nonfat dry milk for 2 hours at 37°C. The microplates were washed again and incubated with 50µl plasma for 2 hours at 37°C. The plates were washed and incubated with anti-LDL monoclonal antibody biotinylated for 2 hours at 37°C. After washing, the microplates were incubated with streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) conjugate (Rockland Immunochemicals for Research, Gilbertville, Pa., USA) for 1 hour at 37°C. Then, the HRP substrate solution (92.3 nM luminol, 0.9 mM p-iodophenol and 3.0 nM hydrogen peroxide) was added to each well. The chemiluminescence intensity was determined immediately using a microplate reader (LumiCount; Packard Bioscience, Meriden, Conn., USA). The calibration curve was made with LDL obtained from human plasma. All samples and standards were run in triplicate. The intraassay and interassay variations for this ELISA test were 8% and 15%, respectively.

### **Carotid intima-media thickness assessment**

Carotid IMT is associated with the risk of coronary artery disease, stroke and myocardial infarction and predicts the progression of CVD<sup>19</sup>. Measurement of IMT was taken at the common distal carotid (1-2cm proximal to carotid bifurcation), bilaterally in the bifurcation and in the internal carotid, as well as at the origin of the right subclavian artery. During the analysis, the greatest right and left carotid IMT values were considered, as well as the value measured at the origin of the right subclavian artery. The right subclavian artery was easily

evaluated since it is more superficial than the contra-lateral subclavian artery; however, this does not denote advantages or technical limitations relative to the carotid arteries. The measurement of the intima-media complex was performed with a Siemens Sonoline Elegra® vascular ultrasonography equipment. A 7.5 MHz linear transducer was used, with a frequency range of 7-9 MHz, longitudinal section and B-mode images. Thickness measurement was performed at the anterior or posterior artery wall, as the distance between two echogenic lines corresponding to the lumen-intima and media-adventitia interfaces of the artery wall.

### **Statistical analysis**

All analyses were performed with GraphPad Prism (Version 3.02, GraphPad Software Incorporated). Continuous variables are presented as means  $\pm$  standard deviation, and categorical variables as number and percentages. The two groups were compared using the Student *t*-test. Chi-square statistics were used to assess differences between categorical variables. Pearson's correlation analysis was used to test univariate relations. Prediction of independent variables was obtained by stepwise, forward, multiple regression model including potential confounders. A *p* value of  $<0.05$  was considered significant.

### **Results**

Initially 33 subjects were screened for the study. Twenty seven of those were found eligible and willing to participate. The baseline characteristics of patients and controls are presented in Table 1. Subjects were predominantly male, and mean age of the patients was 45.14 years  $\pm$  8.99 vs 46.75 years  $\pm$  8.40 of the controls ( $p=0.642$ ). Systolic and diastolic blood pressure was similar in both groups. Body mass index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), was 25.60  $\pm$  5.02 for AS group and 28.34  $\pm$  4.09 for controls ( $p=0.139$ ). The abdominal circumference in patients and controls, was respectively, 94.0  $\pm$  14.3 cm vs. 93.8  $\pm$  14.3 ( $p=0.976$ ). As expected, BASDAI was higher in AS patients than in controls ( 5,6  $\pm$  1,2 vs 1.3  $\pm$  0,7;  $p=0.047$ ). Prevalence of hypertension and diabetes were similar in both

groups. Mean time of diagnosis was 12 years for the patients with AS. Only a single patient was in use of corticosteroids. No patient was using anti-TNFs.

Biochemical parameters are presented in Table 2. Lipid profile was similar in both groups, with no difference regarding total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and LDL cholesterol. Most inflammatory markers were elevated patients with AS. Patients had higher levels of CRP ( $12.36 \pm 7.99$  vs.  $3.44$ ;  $p=0.002$ ) and total leukocyte count ( $9550 \pm 2256$  vs.  $6915 \pm 1721$ ;  $p=0.003$ ). ESR did not differ significantly in both groups. Platelets count was also higher in patients with AS ( $334.000 \pm 106.000$  vs.  $252.000 \pm 66.000$ ;  $p=0.028$ ), as have been previously demonstrated in other rheumatic diseases<sup>20</sup>. Although subjects were matched for diabetes, glucose level was higher in control than in AS patients ( $95.43 \pm 10.53$  vs.  $109.1 \pm 13.33$ ;  $p=0.009$ ). Minimally modified LDL did not differ significantly between patients with AS and controls ( $14.03 \pm 17.40$  vs.  $13.21 \pm 10.21$ ;  $p=0.88$ ).

Data regarding carotid IMT is summarized in table 3. Regardless of the location (internal, bifurcation or common carotid) and side (left or right) of the artery where IMT was assessed, no difference was found between two groups. As previously described, right subclavian was also evaluated and no difference was found either.

## Discussion

Atherosclerosis is an inflammatory condition and inflammation experienced in chronic immune diseases may contribute to accelerate atherosclerosis in these situations<sup>21</sup>. In this study, despite of active inflammation as demonstrated by high CRP levels and BASDAI, patients with AS did not show higher prevalence of sub-clinical atherosclerosis, as demonstrated by carotid IMT. In the same way, circulating plasma levels of LDL(-), which represents the fraction of LDL that is minimally modified, did not differ significantly in both groups.

Our study is in accordance with a previous study that also demonstrated lack of correlation between AS and increased IMT<sup>22</sup>. In the study by Sari *et al.*, young age of patients (mean age 37 years old) could have explained, at least in part, the lack of correlation if inflammation was really assumed as an important factor for atherosclerosis development. In the same study, a compromised endothelial function, as demonstrated by impaired flow mediated dilation of brachial artery, was also shown. This could be interpreted as an evidence that maybe patients were evaluated in a very initial phase of atherosclerosis development, since endothelial dysfunction precedes the morphological changes in arterial wall<sup>23</sup>. Whether age (mean 45 years old) was a limiting factor in our study is not known. Considering patients with other rheumatological conditions, not only IMT is already increased in fourth decade<sup>24</sup>, but also the length of disease (mean time of diagnosis in our population was 12 years) is a determinant of thickening<sup>25</sup>. In a publication where IMT was also assessed in patients with AS, only a trend towards increased thickness was seen.<sup>26</sup> Simillary to our study, patients in control group had a slight worse metabolic profile than patients in AS, specially glucose levels<sup>26</sup>. An interesting finding in this study was that arterial stiffness, another marker of subclinical atherosclerosis, was not modified by TNF- $\alpha$  inhibitors, suggesting that modulation of inflammatory response has no effect on arterial wall injury<sup>26</sup>. None of our patients were being treated with TNF- $\alpha$  inhibitors .

This was the first study to evaluate plasma levels of modified LDL in patients with AS. Although elevated levels of oxidized LDL have been

previously reported in patients with other autoimmune diseases<sup>27</sup>, little has been published regarding minimally modified LDL. These moieties are more prone to be oxidized when into the subendothelial space, where most of oxidation process occurs. Although not as pro-atherogenic as oxidized LDL, minimally modified forms induce monocyte adhesion to endothelial cells and MCP-1 production, critical steps in early atherogenesis<sup>28, 29</sup>. The source of these minimally modified forms remains unclear; however, there are possible sources<sup>30</sup>: oxidation of LDL in the arterial wall followed by egress into the circulation, ingestion of oxidized fats and/or generation from postprandial lipoprotein remnants or direct oxidation in blood plasma. Regardless of the source, our findings do not support any role of inflammation in this initial modification of LDL particle. Not only plasma levels were similar in AS and control group, but also no correlation was found between minimally modified LDL and CRP levels (data not shown). Whether the same concept can be applied to oxidized LDL levels in patients with AS remains to be exploited. In patients with SLE and RA, not only oxidized LDL, but also their autoantibodies are associated to atherosclerosis<sup>31, 32</sup>.

It's not clear why the results in patients with AS are consistently in the opposite direction of studies with SLE and RA regarding atherosclerosis. It's worth mentioning that corticosteroids treatment is always a confounding factor in these studies. While commonly prescribed in patients with RA and SLE, this not a first line treatment in AS. In our study, a single patient was in use of prednisone. Mainly when used in high doses, corticosteroids have an important detrimental effect on several cardiovascular risk factors. These effects can be in part responsible for the accelerated atherosclerosis seen in patients with SLE and RA<sup>33, 34</sup>. Further studies including higher number of patients with AS taking steroids could clarify this issue.

Two potential limitations of our study are the small number of patients included and the fact that patients with more physical impairment, although invited during screening phase, did not participate. Refusal was always justified by difficulties in transportation. This is a frequent bias, reported also in studies with RA and SLE. Once patients with worst clinical conditions were not

included, we may have lost those with more complications, including atherosclerosis due to their inflammatory condition.

In conclusion, despite active inflammation and higher disease activity, there were no differences regarding plasma levels of minimally modified LDL and carotid IMT assessed by ultrasonography between patients with AS and controls. These findings are in accordance with previous studies in AS but in the opposite direction of studies with other inflammatory diseases, namely SLE and RA. Further studies are necessary to explore the role of inflammation *per se* as an accelerating factor of atherosclerosis in patients with spondyloarthritis.

**Table 1. Clinical characteristics**

Characteristics	AS	Control group	
Age (years)	45,14±8,99	46,75±8,40	0,642
Male(%)	78,57	76,92	
Body mass index (kg.m <sup>-2</sup> )	25,60±5,02	28,34±4,09	0,139
Abdominal circumference (cm)	94±14,34	93,83±14,31	0,976
DM (%)	7,14	7,70	
Hyperlipidemia (%)	21,43	30,77	
Diastolic blood pressure (mmHg)	78,93±12,12	76,67±6,51	0,552
Hypertension (%)	21,43	30,77	
BASDAI	5,6± 1,2	1,3±0,7	0.0712

**Table 2. Biochemical parameters**

Biochemical measurement	AS	Control group	<i>P</i>
Cholesterol (mg/dl)	185,40±34,88	221,60±59,46	0,080
HDL (mg/dl)	46,79±10,64	44,25±11,11	0,559
Tryglicerides (mg/dl)	131,20±66,53	196,40±105,20	0,080
LDL (mg/dl)	112,10±29,10	140,70±47,80	0,099
OxLDL	14,03±17,40	13,21±10,21	0,880
Glucose (mg/dl)	95,43±10,53	109,10±13,33	0,009
Leukocytes	9550±2256	6915±1721	0,003
Platelets (x10 <sup>3</sup> )	334±106	252±66	0,028
ESR (mm)	21,64±15,01	15,64±12,42	0,285
CRP (mg/l)	12,36±7,99	3,45±4,81	0,002

**Table 3. Doppler ultrasonography assessment of intima-media thickness (IMT) of left (L) and right (R) carotid and right subclavian**

Characteristics	AS	Control group	<i>P</i>
Left common carotid (mm)	0,58±0,13	0,69±0,53	0,461
Left bifurcation (mm)	0,86±0,42	0,85±0,35	0,982
Left internal carotid (mm)	0,74±0,54	0,67±0,15	0,623
Right common carotid (mm)	0,55±0,16	0,55±0,12	0,944
Right bifurcation (mm)	0,82±0,37	0,80±0,42	0,889
Right internal carotid (mm)	0,79±0,53	0,70±0,45	0,652
Right subclavian (mm)	1,16±0,62	0,95±0,30	0,287

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta prevalência de mortalidade cardiovascular em portadores de EA tem conduzido muitos pesquisadores a investigar possíveis fatores de risco associados a maior atividade de doença e que ao mesmo tempo também possam estar envolvidos com maior incidência de doença cardiovascular.

O risco cardiovascular em doenças auto-imunes é sabidamente multifatorial, e entre os mecanismos envolvidos, a aterogênese acelerada causada pela resposta inflamatória sistêmica parece ser um dos mais importantes. Apesar deste mecanismo ter sido bem demonstrado em portadores de artrite reumatóide (AR) e de lúpus eritematoso sistêmico (LES), em portadores de Espondilite Anquilosante(EA) há resultados controversos obtidos em estudos clínicos, o que impossibilita uma conclusão definitiva até o presente momento, dos reais mecanismos envolvidos neste grupo

O presente conjunto de artigos é uma produção da linha de pesquisa de Disfunção Endotelial e Aterosclerose e sua atividade de doença na Espondilite Anquilosante iniciada em 2006 na PUCPR por um grupo de pesquisadores com a liderança do aluno de doutoramento Dr Valderilio Feijó Azevedo sob a orientação do Dr Roberto Pecoits-Filho , coordenador do programa de Pós-Graduação da PUCPR.

Três publicações foram o resultado parcial, sendo uma delas anexas e dois estudos originais componentes do corpo desta tese.

Os estudos intitulados “IL-8 EM ASSOCIAÇÃO COM ATIVIDADE DE DOENÇA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE SEM TRATAMENTO COM AGENTES ANTI-TNF” e “AVALIAÇÃO DA ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE LDL MINIMAMENTE MODIFICADA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E SUA CORRELAÇÃO COM BASDAI” são os principais dos estudos realizados.

Em ambos os estudos a proposição foi a de correlacionar conhecidos fatores que levam a disfunção cardiovascular com níveis de atividade de doença avaliada por parâmetros internacionais estabelecidos para portadores de Espondilite

Anquilosante. A morbimortalidade da EA está diretamente correlacionada à mortalidade cardiovascular e muitos pacientes sem alterações cardiovasculares clínicas já podem apresentar disfunção cardíaca.

Consideramos que nossos resultados, particularmente aquele obtido no estudo de IL8- correlacionada a maior atividade de doença e sabidamente também biomarcador de disfunção do endotélio - é promissor no sentido de se fomentar a ampliação de estudos clínicos nos quais marcadores inflamatórios e ao mesmo tempo também de desenvolvimento de disfunção endotelial e de aterosclerose possam ser avaliados e seus níveis correlacionados a altos índices de atividade de doença em portadores de Espondilite Anquilosante.

Acreditamos que há possibilidade de se produzir evidências mais robustas de que a inibição precoce de IL8 ou mesmo a introdução de tratamentos com agentes anticitocinas diferentes dos anti-TNFs empregados até o momento, possam além de proporcionar melhor de parâmetros clínicos axiais também aumentar a sobrevida cardiovascular de espondilíticos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Sampaio-Barros P, Azevedo VF et al. **Consenso Brasileiro de Espondiloartropatias: Espondilite Anquilosante e Artrite Psoriásica Diagnóstico e Tratamento – Primeira Revisão.** Rev Bras Reumatologia. 2007. 47(4): 233-42.
- 2) Dougados M. **Diagnostic features of ankylosing spondylitis.** Br Journal of Rheumatol. 1995. 34: 301-5.
- 3) Van Der Linden S, Van Der Heijde D. **Ankylosing spondylitis: clinical features.** Rheum Dis Clin North Am 1998. 24(4):663-76
- 4) Reveille JD, Ball EJ, Khan MA. **HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies.** Curr Opin Rheumatol. 2001. 13(4):265-72.
- 5) Rudwaleit M, Metter A. **Inflammatory back pain in ankylosing spondylitis: a reassessment of the clinical history for application as classification and diagnostic criteria.** Arthritis & Rheumatism. 2006. 54(9): 569-78.
- 6) Wang SW, Davis JC Jr. **Clinical aspects of ankylosing spondylitis.** Philadelphia: Mosby Elsevier. 2006. 145-53.
- 7) Azevedo VF, Felipe LRH et al. **Pulmonary fungal infection with hyalophomycosis associated with zygomycosis and Actinomyces spp. In a patient with ankylosing spondylitis.** Rev. bras. Reumatol. 2009. 49(5): 630-637.
- 8) Jones DW, Mansell MA, Samuell CT, Isenberg DA. **Renal abnormalities in ankylosing spondylitis.** Br J Rheumatol. 1987. 26:341-5.
- 9) Wall BA, Agudelo CA, Pisko EJ. **Increased incidence of recurrent hematuria in ankylosing spondylitis: a possible association with IgA nephropathy.** Rheumatol Int 1984;27-9.
- 10) Strobel ES, Fritschka E. **Renal diseases in ankylosing spondylitis: review of the literature illustrated by case reports.** Clin Rheumatol 1998. 17: 524-30.
- 11) Shu KH, Lian JD, Yang YF, et al. **Glomerulonephritis in ankylosing spondylitis.** Clin Nephrol. 1986. 25: 169-74.
- 12) Millán I, Sirvent AE, et al. **Obstructive nephropathy secondary to AA-type amyloidosis in ankylosing spondylitis.** Ren Fail. 2010. 32(3): 404-6.
- 13) Mielants H, Veys EM, et al. **Ileocolonoscopy and spondylarthritis.** Br J Rheumatol. 1988. 27(2): 163-4.
- 14) De Keyser F, Mielants H. **The gut in ankylosing spondylitis and other spondyloarthropathies: inflammation beneath the surface.** J Rheumatol. 2003. 30(11): 2306-7.
- 15) Rodríguez-Reyna TS, Martínez-Reyes C, et al. **Rheumatic manifestations of inflammatory bowel disease.** World J Gastroenterol. 2009. 15(44): 5517-24.
- 16) Dinichert A, Cornelius JF, Lot G. **Lumboperitoneal shunt for treatment of dural ectasia in ankylosing spondylitis.** J Clin Neurosci. 2008. 15(10): 1179-82.
- 17) Ahn NU, Ahn UM, et al. **Cauda equine syndrome in ankylosing spondylitis (the CES-AS syndrome): meta-analysis of outcomes after medial and surgical treatments.** J Spinal Disord. 2001. 14(5): 427-33.

- 18) Bulkley BH, Roberts WC. **Ankylosing spondylitis and aortic regurgitation. Description of the characteristic cardiovascular lesion from study of eight necropsy patients.** *Circulation*. 1973. 48:1014.
- 19) Peters MJ, van der Horst-Bruinsma IE, et al. **Cardiovascular risk profile of patients with spondylarthropathies, particularly ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis.** *Semin Arthritis Rheum*. 2004. 34:585-92.
- 20) Salmon JE, Roman MJ **Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.** *Am J Med*. 2008. 121(10 Suppl 1): 53-58.
- 21) Pereira IA, Borba EF **The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis.** *Swiss Med Wkly*. 2008. 138(37–38):534-39.
- 22) Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB **Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis.** *Circulation*. 2003. 108: 2957-63.
- 23) Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. **Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria.** *Arthritis Rheum*. 1984. 27(4): 361-8.
- 24) Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. **A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index.** *The Journal of Rheumatology*. 1994. 21(12):2286-91
- 25) Zochling J. Measures of symptoms and disease status in ankylosing spondylitis: Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS), Ankylosing Spondylitis **Quality of Life Scale (ASQoL), Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), Bath Ankylosing Spondylitis Global Score (BAS-G), Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index (BASMI), Dougados Functional Index (DFI), and Health Assessment Questionnaire for the Spondylarthropathies (HAQ-S).** *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011 Nov;63 Suppl 11:S47-58
- 26) Callin A et al. **A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index.** *Journal of Rheumatology*. 1994. 21(12):2281-5
- 27) Heikkilä S, Viitanen JV, Kautianen H, Kauppi M. **Evaluation of the Finnish versions of the functional indices BASFI and DFI in spondylarthropathy,** *Clinical Rheumatology*. 2000; 19(6):464-9
- 28) Udrea G, Ciobanu C, Mihai C, Stoica V, Suteanu S, Van Der Heijde D, Van Der Linden S. **Evaluation of Romanian version of the Bath Ankylosing Spondylitis functional index (BASFI) in patients with spondylarthropathies.** *Romanian Journal of Internal Medicine*. 2004. 42(11): 199-209
- 29) Doward L, Spoorenberg A, Cook S, Whalley D, Helliwell P, Kay L et al. **Development of the ASQoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis.** *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003. 62(1): 20-6.
- 30) Braun J. **Therapy of spondyloarthritides.** *Adv Exp Med Biol*. 2009. 649:133-47.
- 31) Dagfinrud H, Kvien TK, Hagen KB. **The Cochrane review of physiotherapy interventions for ankylosing spondylitis.** *J Rheumatol*. 2005. 32:1899-906.
- 32) Clegg DO. **Treatment of ankylosing spondylitis.** *J Rheumatol*. 2006. 33(78): 24-31.
- 33) Gratacós J, Collado A, Pons F, et al. **Significant loss of bone mass in patients with early, active ankylosing spondylitis: a followup study.** *Arthritis Rheum*. 1999. 42: 2319-24.

- 34) Mitra D, Elvins DM, Speden DJ, Collins AJ. **Prevalence of vertebral compression fractures in mild ankylosing spondylitis and their relationship to bone mineral density.** *Rheumatology*. 2000. 39:85-93.
- 35) Dougados M, Dijkmans B, et al. **Conventional treatments for ankylosing spondylitis.** *Ann Rheum Dis*. 2002. 61(III):40-50.
- 36) Peters ND, Ejstrup L. **Intravenous methylprednisolone pulse therapy in ankylosing spondylitis.** *Scand J Rheumatol*. 1992. 21: 134-8.
- 37) Braun J, Bollow M, et al. **Computed tomography guided corticosteroid injection of sacroiliac joint in patients with spondyloarthropathy with sacroiliitis: clinical outcome and followup by dynamic magnetic resonance imaging.** *J Rheumatol*. 1996. 23: 659-64.
- 38) Dougados M, van der Linden S, et al. **Sulfasalazine in the treatment of spondylarthropathy: a randomized multicenter, double-blind, placebo-controlled study.** *Arthritis Rheum*. 1995. 38: 618-27.
- 39) Benitez-del-Castilho JM, Garcia-Sanchez J, et al. **Sulfasalazine in the prevention of anterior uveitis associated with ankylosing spondylitis.** *Eye*. 2000. 14: 340-3.
- 40) Chen J, Liu C, Lin J. **Methotrexate for ankylosing spondylitis.** *Cochrane Database Syst Rev*. 2006. 18(4):CD004524.
- 41) Sampaio-Barros PD, Costallat LTL, et al. **Methotrexate in the treatment of ankylosing spondylitis.** *Scand J Rheumatol*. 2000. 29: 160-2.
- 42) Akkoc N, van der Linden S, Khan MA. **Ankylosing spondylitis and symptom-modifying vs. disease modifying therapy.** *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006. 20: 539-57.
- 43) Huang F, Gu J, et al. **One year open label trial of thalidomide in ankylosing spondylitis.** *Arthritis Rheum*. 2002. 47: 249-54.
- 44) Maksymowych WP, Jhangri GS, et al. **A sixmonth randomized, controlled, double-blind, dose-response comparison of intravenous pamidronate (60 mg versus 10 mg) in the treatment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-refractory ankylosing spondylitis.** *Arthritis Rheum*. 2002. 46: 766-73.
- 45) Zochling J, Van der Heijde D, et al. **ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis.** *Ann Rheum Dis*. 2006. 65: 442-52.
- 46) McLeod C, Bagust A, et al. **Adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of ankylosing spondylitis: a systematic review and economic evaluation.** *Health Technol Assess*. 2007. 11(28):1-158.
- 47) Van den Bosch F, Kruithof E, et al. **Randomized double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor  $\alpha$  (infliximab) versus placebo in active spondylarthropathy.** *Arthritis Rheum*. 2002. 46: 755-65.
- 48) Kruithof E, Van den Bosch F, et al. **Repeated infusions of infliximab, a chimeric anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody, in patients with active spondyloarthropathy: one year follow up.** *Ann Rheum Dis*. 2002. 61:207-12.
- 49) Braun J, Landewe R, et al. **Major reduction in spinal inflammation in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled magnetic resonance imaging study.** *Arthritis Rheum*. 2006. 54: 1646-52.
- 50) Braun J, Brandt J, et al. **Treatment of ankylosing spondylitis with infliximab: a randomized controlled multicenter trial.** *Lancet*. 2002. 359: 1187-93.

- 51) Braun J, Brandt J, et al. **Long-term efficacy and safety of infliximab in the treatment of ankylosing spondylitis.** Arthritis Rheum. 2003. 48: 2224-33.
- 52) Braun J, Baraliakos X, et al. **Decreased incidence of anterior uveitis in patients with ankylosing spondylitis treated with the anti-tumor necrosis factor agents infliximab and etanercept.** Arthritis Rheum. 2005. 52: 2447-51.
- 53) Brandt J, Khariouzov A, et al. **Six-month results of a double-blind, placebo-controlled trial of etanercept treatment in patients with active ankylosing spondylitis.** Arthritis Rheum. 2003. 48: 1667-75.
- 54) Davis Jr. JC, van der Heijde D, et al. **Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating ankylosing spondylitis: a randomized controlled trial.** Arthritis Rheum. 2003. 48: 3230-6.
- 55) Maksymowych WP, Poole AR, Hiebert L, et al. **Etanercept exerts beneficial effects on articular cartilage biomarkers of degradation and turnover in patients with ankylosing spondylitis.** J Rheumatol. 2005. 32: 1911-7.
- 56) Baraliakos X, Brandt J, Listing J, et al. **Outcome of patients with active ankylosing spondylitis after two years of therapy with etanercept: clinical and magnetic resonance imaging data.** Arthritis Rheum. 2005. 53: 856-63.
- 57) Davis JC, Van der Heijde D, Braun J, et al. **Sustained durability and tolerability of etanercept in ankylosing spondylitis for 96 weeks.** Ann Rheum Dis. 2005. 64: 1557-62.
- 58) Van der Heijde D, Da Silva JC, Dougados M, et al. **Etanercept 50 mg once weekly is as effective as 25 mg twice weekly in patients with ankylosing spondylitis.** Ann Rheum Dis. 2006. 65: 1572-7
- 59) Van der Heijde D, Kivitz A, Schiff MH, et al. **Efficacy and safety of adalimumab in patients with ankylosing spondylitis.** Arthritis Rheum. 2006. 54: 2136-46.
- 60) Kay J, Rahman MU. **Golimumab: A novel human anti-TNF-alpha monoclonal antibody for the treatment of rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and psoriatic arthritis.** Core Evid. 2010. 15;4: 159-70.
- 61) Torres TM, Ferraz MB, Ciconelli RM. **Resource utilisation and cost of ankylosing spondylitis in Brazil.** Clin Exp Rheumatol. 2010. 28(4): 490-7.
- 62) Sampaio MF. **Função endotelial em adultos jovens com infarto do miocárdio: influências ambientais e genéticas - Tese (doutorado).** Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo: 2005.
- 63) Bahia L, Aguiar LGK, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. **O Endotélio na Síndrome Metabólica.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica. 2006. 50 (2): 291-303.
- 64) Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. **Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções.** Revista Brasileira de Hipertensão. 2001.8(1): 76-88.
- 65) Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. **Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance.** Circulation: 2007. 115:1285-1295.
- 66) Kiechele FL, Malinski T. **Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection.** Ann J Clin Pathol. 1993. 100 (5): 567-75.
- 67) Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. **Novel effects of nitric oxide.** Ann Rev Pharmacol Toxicol. 2001. 41: 203-36.

- 68) Cerqueira NF, Yoshida WB. **Óxido nítrico: revisão.** Acta Cirúrgica Brasileira. 2002. 17(6): 417-423.
- 69) Kuo PC, Schroeder RA. **The emerging multifaceted roles of nitric oxide.** Ann Surg. 1995; 221(3): 220-35.
- 70) Wong GKT, Marsden PA. **Nitric oxide synthases: regulation in disease.** Nefrol Dial Transplant. 1996. 11: 215-20.
- 71) Garg UC, Hassid A. **Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.** J Clin Invest. 1989. 83(5): 1774-7.
- 72) Rizvi MA, Myers PR. **Nitric oxide modulates basal and endothelin-1-induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels.** J Mol Cell Cardiol. 1997. 29(7): 1779-89.
- 73) Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. **Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis - Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II.** Circ Res. 1996. 79: 748-56.
- 74) Förstermann U, Münzel T. **Endothelial Nitric oxide Synthase in Vascular Disease.** Circulation. 2006. 113: 1708-14.
- 75) Mombouli JM, Vanhoutte PM. **Endothelium-dependent hyperpolarizing factor(s): updating the unknown.** Trends Pharmacol Sci. 1997. 18: 252-6.
- 76) Urakami-Harasawa L, Shimokava H, Nakashima M, Egashira k, Takeshita A. **Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries.** 1998. 101(6):1491.
- 77) Drexler H. **Factors involved in the maintenance of endothelial function.** Am J Cardiol. 1998. 82(10A):35-45.
- 78) Kinlay S, Behrendt D, Wainstain M, et al. **The role of endothelin-1 in the constriction of human atherosclerotic coronary arteries.** Circulation. 2001.104:1114-18.
- 79) Dzau VJ. **Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis.** Hypertension. 2001. 37:1047-52.
- 80) Daugherty A, Cassis L. **Angiotensin II-mediated development of vascular diseases.** Trends Cardiovasc Med. 2004.14:117-20.
- 81) Kunieda, Tohru Minamino T, et al. **Angiotensin II Induces Premature enescence of Vascular Smooth Muscle Cells and Accelerates the Development of Atherosclerosis via a p21-Dependent Pathway.** Circulation 2006;114:953-60.
- 82) Lüscher TF, Barton M. **Biology of the endothelium.** Clin Cardiol. 1997. 20(suppl II):II-3-II-10.
- 83) Tritto I, Ambrosio G. **The multi-faceted behavior of nitric oxide in vascular “inflammation”: catchy terminology or true phenomenon?** Cardiovasc Res. 2004. 63(1):1-4.
- 84) Clempus RE, Griendling KK. **Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cell.** Casdiovascular Res. 2006. 71(2): 216-25.
- 85) Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. **Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer.** Nephrol Dial Transplant. 2002. 17:1728-30.
- 86) Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, Chakrabarti A, Richardson BC, Shelden E, McCune WJ, Kaplan MJ. **Endothelial cell apoptosis in systemic**

- lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity.** *Blood*. 2004. 103(10):3677-83.
- 87) Op den Buijs J, Musters M, Verrips T, Post JA, Braam B, Van Riel N. **Mathematical modeling of vascular endothelial layer maintenance: the role of endothelial cell division, progenitor cell homing and telomere shortening.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004. 287(6):H2651-58.
- 88) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzgenbichler B, Schatteman G, Isner JM. **Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.** *Science*. 1997. 275(5302):964-7.
- 89) Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. **Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.** *N Engl J Med*. 2003. 348:593-600.
- 90) Cox DA, Vita JA, Treasure CB, Fish RD, Alexander RW, Ganz P, Selwyn AP. **Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans.** *Circulation*. 1989. 80:458-65.
- 91) Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. **Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries.** *N Engl J Med*. 1986. 315:1046-51.
- 92) Goodhart DM, Anderson TJ. **Role of nitric oxide in coronary arterial vasomotion and the influence of coronary atherosclerosis and its risks.** *Am J Cardiol*. 1998. 82(9):1034-39.
- 93) Okumura K, Yasue H, Matsuyama K, Ogawa H, Morikami Y, Obata K, Sakaino N. **Effect of acetylcholine on the highly stenotic coronary artery: difference between the constrictor response of the infarct-related coronary artery and that of the noninfarct-related artery.** *J Am Coll Cardiol* 1992. 19:752-58.
- 94) Drexler H, Zeiher AM. **Endothelial function in human coronary arteries in vivo: focus on hypercholesterolemia.** *Hypertension*. 1991. 18(4 suppl):II90-9.
- 95) Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P. **Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis.** *J Am Coll Cardiol*. 1990. 16(2):349-56.
- 96) Joannides R, Bellien J, Thuillez. **Clinical methods for the evaluation of endothelial function: a focus on resistance arteries.** *Fundam Clin Pharmacol*. 2006. 20(3):311-20.
- 97) Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrang D, et al. **Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation.** *J Am Coll Cardiol*. 1995. 26:1235-41.
- 98) Brodie TG, Russel AE. **On the determination of the rate of blood flow through an organ.** *J Physiol*. 1905. 32:47-9.
- 99) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. **Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis.** *Lancet*. 1992. 340(8828):1111-15.
- 100) Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. **Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo.** *Circulation*. 1995. 91: 1314-19.
- 101) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. **Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. A report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force.** *J Am Coll Cardiol*. 2002. 39:257-65.

- 102) Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, Lam CW, Metreweli C, Celermajer DS. **Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children.** *Circulation*. 2004. 109:1981-86.
- 103) Mitchell GF, Vita JA, Larson MG, Parise H, Keyes MJ, Warner E, Vasani RS, Levy D, Benjamin EJ. **Cross-sectional relations of peripheral microvascular function, cardiovascular disease risk factors, and aortic stiffness: the Framingham Heart Study.** *Circulation*. 2005. 112:3722-28.
- 104) Oliver JJ, Webb DJ. **Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003. 23(4):554-66.
- 105) Hayward CS, Kraidly M, Webb CM, Collins P. **Assessment of endothelial function using peripheral waveform analysis: a clinical application.** *J Am Coll Cardiol*. 2002. 40(3):521-28.
- 106) Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Kuvin JT, Lerman A. **Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia.** *J Am Coll Cardiol*. 2004. 44(11):2137-41.
- 107) Naka KK, Tweddel AC, Doshi SN, Goodfellow J, Henderson AH. **Flow-mediated changes in pulse wave velocity: a new clinical measure of endothelial function.** *Eur Heart J*. 2006. 27(3):302-9.
- 108) Wofford J, Kahl F, Howard G, McKinney W, Toole J, Crouse JI. **Relation of extent of extracranial carotid artery atherosclerosis as measured by B-mode ultrasound to the extent of coronary atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb*. 1991. 11(6):1786-94.
- 109) Malesci D, Niglio A, Mennillo GA, Buono R, Valentini G, La Montagna G. **High prevalence of metabolic syndrome in patients with ankylosing spondylitis.** *Clin Rheumatol*. 2007. 26(5):710-14.
- 110) Choe JY, Lee MY, Rheem I, Rhee MY, Park SH, Kim SK. **No differences of carotid intima-media thickness between young patients with ankylosing spondylitis and healthy controls.** *Joint Bone Spine*. 2008. 75(5):548-53.
- 111) Sari I, Okan T, Akar S, Cece H, Altay C, Secil M, Birlik M, Onen F, Akkoc N. **Impaired endothelial function in patients with ankylosing spondylitis.** *Rheumatology*. 2006. 45:283-86.
- 112) Mathieu S, Joly H, Baron G, Tournadre A, Dubost J-J, Ristori J-M, Lusson J-R, Soubrier M. **Trend towards increased arterial stiffness or intima-media thickness in ankylosing spondylitis patients without clinically evident cardiovascular disease.** *Rheumatology*. 2008. 47:1203-7.
- 113) Pieringer H. **Impaired endothelial function in patients with ankylosing spondylitis.** *Rheumatology (Oxford)* 45(10):1319; author reply 1319-20. Comment on: *Rheumatology (Oxford)*. 2006. 45(3):283-6.
- 114) Peters MJ, van Eijk IC, Smulders YM, Serne E, Dijkmans BA, van der Horst-Bruinsma IE, Nurmohamed MT. **Signs of accelerated preclinical atherosclerosis in patients with ankylosing spondylitis.** *J Rheumatol*. 2010. 37(1):161-6.
- 115) Caliskan M, Erdogan D, Gullu H, Yilmaz S, Gursoy Y, Yildirim A et al. **Impaired coronary microvascular and left ventricular diastolic functions in patients with ankylosing spondylitis.** *Atherosclerosis*. 2008. 196(1):306-12.
- 116) Galderisi M, Cicala S, Caso P et al. **Coronary flow reserve and myocardial diastolic dysfunction in arterial hypertension.** *Am J Cardiol*. 2002. 90:860-64.
- 117) Erdogan D, Gullu H, Caliskan M et al. **Coronary flow reserve in dipper and non-dipper hypertensive patients.** *Blood Press*. 2005. 14:345-52.

- 118) Van Eijk IC, Peters MJL, Serne EH, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans BAC, Smulders YM, Nurmohamed MT. **Microvascular function is impaired in ankylosing spondylitis and improves after TNF blockade.** *Ann Rheum Dis.* 2008 Apr 4. [Epub ahead of print].
- 119) Braun J, Davis J, Dougados M, Sieper J, van der LS, van der HD. **First update of the international ASAS consensus statement for the use of anti-TNF agents in patients with ankylosing spondylitis.** *Ann Rheum Dis.* 2006. 65(3):316-20.
- 120) Azevedo VF, Pecoits-Filho R. **Atherosclerosis and endothelial dysfunction in patients with ankylosing spondylitis.** *Rheumatology International.* 2010. 30(11): 1411-16.
- 121) Libby P. **Inflammation in atherosclerosis.** *Nature.* 2002. 420(6917): 868-74.
- 122) Ross R. **Atherosclerosis: an inflammatory disease.** *N Engl J Med.* 1999. 340(2):115-26.
- 123) Witztum JL, Berliner JA. **Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis.** *Curr Opin Lipidol.* 1998. 9(5):441-8.
- 124) Williams KJ, Tabas I. **The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced.** *Curr Opin Lipidol.* 1998. 9(5):471-4.
- 125) Stemme S, Faber B, Holm J, et al. **T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. 92(9):3893-7.
- 126) Sigal LH. **Atherosclerosis: an immunologically mediated (autoimmune?) disease.** *J Clin Rheumatol.* 2007. 13:160-8.
- 127) Prohászka Z, Füst G. **Immunological aspects of heat-shock protein: the optimum stress of life.** *Mol Immunol.* 2004. 41(1):29-44.
- 128) Xiao Q, Mandal K, Schett G, et al. **Association of serum-soluble heat shock protein 60 with carotid atherosclerosis.** *Stroke.* 2005. 36(12): 2571-6.
- 129) Mandal K, Jahangiri M, Xu Q. **Autoimmunity to heat shock proteins in atherosclerosis.** *Autoimm Rev.* 2004. 3(2):31-3.
- 130) Hansson GK, Libby P. **The immune response in atherosclerosis: a double edged sword.** *Nat Rev Immunol* 2006. 6(7): 508-18.
- 131) Groyer E, Caligiuri G, Laschet-Khallou J, Nicoletti A. **Immunologic aspects of atheroma.** *Presse Med* 2006. 35:475-86.
- 132) Mouthon L. **L'athérosclérose est-elle une maladie immunologique?** *Presse Med.* 2006. 35:454-5.
- 133) Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I, et al. **Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells.** *Circ Res.* 1999. 84:1085-94.
- 134) Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. **The paraoxonase gene family and atherosclerosis.** *Free Radic Biol Med.* 2005. 38(2): 153-63.
- 135) Seo D, Goldschmidt-Clermont P. **The paraoxonase gene family and atherosclerosis.** *Curr Atheroscler Rep.* 2009. 11(3): 182-7.
- 136) Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, et al. **Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle: new concepts.** *Hypertension.* 1997. 29(1): 366-73.
- 137) Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, et al. **Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999. 19(7):1623-9.

- 138) Sitia S., Tomasoni L. *et al.* **From endothelial dysfunction to atherosclerosis.** Autoimmunity Reviews, 2010.
- 139) Ceriello A. **Hyperglycaemia and the vessel wall: the pathophysiological aspects on the atherosclerotic burden in patients with diabetes.** Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2010. 17 (Suppl 1):S15-9.
- 140) Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, et al. **Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis.** Circ Res. 1999. 84:489-97.
- 141) Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, et al. **C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999. 19(4): 972-8.
- 142) Puranik R., Celermajer D. S. **Smoking and Endothelial Function.** Progress in Cardiovascular Diseases 2003. 45(6); 443-58.
- 143) Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R. **The role of macrophages.** In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. Atherosclerosis and coronary artery disease. 1996. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:539-55.
- 144) Kiechl S, Egger G, Mayr M, et al. **Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study.** Circulation 2001. 103(8): 1064-70.
- 145) Goyal P, Kale SC, Chaudhry R, Chauhan S, Shah N. **Association of common chronic infections with coronary artery disease in patients without any conventional risk factors.** Indian J Med Res. 2007. 125(2):129-36.
- 146) Ayada K, Yokota K, Kobayashi K, et al. **Chronic infections and atherosclerosis.** Ann NY Acad Sci. 2007. 1108: 594-602.
- 147) Ford PJ, Yamazaki H, Seymour GJ. **Cardiovascular and oral disease interactions: what is the evidence?** Prim Dent Care. 2007. 14(2):59-66.
- 148) Blasi C. **The role of infectious agents in the pathogenesis and evolution of atherosclerosis.** Ann Ital Med Int. 2004. 19(4): 249-61.
- 149) Wick G, Knoflach M, Xu Q. **Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis.** Ann Rev Immunol. 2004. 22:361-403.
- 150) Doria A, Sherer Y, Meroni PT, Schoenfeld Y. **Inflammation and accelerated atherosclerosis: Basic mechanisms.** Rheum Dis N Am. 2005. 31:355-62.
- 151) Lerman A, Burnett JC Jr. **Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion.** Circulation. 1992. 86(6 suppl):III-12-19.
- 152) Anderson TJ. **Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans.** J Am Coll Cardiol. 1999. 34(3): 631-8.
- 153) Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. **A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis.** J Clin Invest. 2001. 107(10): 1255-62.
- 154) Johnson, R. C. et al. **Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice.** J. Clin. Invest. 1997. 99(5): 1037-43.
- 155) Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. **Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries.** N Engl J Med. 1987. 316(2): 1371-5.

- 156) Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. **Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.** *Arteriosclerosis*. 1986. 6(2): 131-8.
- 157) Libby P, Geng Y-J, Aikawa M, et al. **Macrophages and atherosclerotic plaque stability.** *Curr Opin Lipidol*. 1996. 7(5): 330-5.
- 158) Libby P. **Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes.** *Circulation*. 2001. 104(3): 365-72.
- 159) Libby P, Simon DI. **Inflammation and thrombosis: the clot thickens.** *Circulation*. 2001. 103:1718-20.
- 160) Blasi C. **The autoimmune origin of atherosclerosis.** *Atherosclerosis*. 2008. 201(1):17-32.
- 161) O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. **Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment.** *Biochem J* 2008;409:635-49.
- 162) Conti P, DiGiacchino M. **MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation.** *Allergy Asthma Proc*. 2001;22:133-7.
- 163) Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R, et al. **Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2000;43:38-47.
- 164) Shin WS, Szuba A, Rockson SG. **The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights.** *Atherosclerosis* 2002;160:91-102.
- 165) Conti I, Rollins BJ. **CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer.** *Semin Cancer Biol* 2004;14:149-154.
- 166) Spoettl T, Hausmann M, Herlyn M, Gunckel M, Dirmeier A, Falk W, Herfarth H, Schoelmerich J, Rogler G. **Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes.** *Clin Exp Immunol* 2006;145:190-199.
- 167) Nakai K, Itoh C, Kawazoe K, Miura Y, Sotoyanagi H, Hotta K, et al: **Concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) correlated with expression of VCAM-1 mRNA in the human atherosclerotic aorta.** *Coron Artery Dis*. 1995. 6: 497-502.
- 168) Huang J, Urvashi M, Upadhyay BS, et al. **Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia.** *Surg Neurol*. 2006. 66(3):232-45.
- 169) Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. **Blood pressure and inflammation in apparently healthy men.** *Hypertension*. 2001. 38: 399-403.
- 170) Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C et al. **Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease.** *Circulation*. 2001. 104: 1336-42.
- 171) Lukacs NW, Strieter RM, Elnor VM, Evanoff HL, Burdick M, Kunkel SL: **Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte-derived MIP-1 alpha during monocyte-endothelial cell interactions.** *Blood*. 1994. 83, 1174-78.
- 172) Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E: **Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study.** *Circulation*. 1997. 96, 4219-25.

- 173) Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, Lennon L et al.: **Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis.** *Lancet.* 2001. 358, 971-76.
- 174) Haim M, Tanne D, Boyko V, Reshef T, Goldbourt U, Leor J, Mekori YA et al.: **Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease. Data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study.** *J Am Coll Cardiol.* 2002. 39:1133-38.
- 175) Schafer C, Heiss A, Schwarz A et al. **The serum protein alpha 2- Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification.** *J Clin Invest.* 2003. 112: 357-66.
- 176) Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, Barany P, Lindholm B, Jogestrand T, Heimbürger O, Holmes C, Schalling M, Nordfors L. **Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin.** *Kidney Int.* 2005. 67(6):2383-92.
- 177) Weikert C, Stefan N, Schulze MB, Pischon T, Berger K, Joost HG, Häring HU, Boeing H, Fritsche A. **Plasma fetuin-A levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke.** *Circulation.* 2008.118: 2555-62.
- 178) Roos M, von Eynatten M, Heemann U, Rothenbacher D, Brenner H, Breitling LP. **Serum fetuin-A, cardiovascular risk factors, and six-year follow-up outcome in patients with coronary heart disease.** *Am J Cardiol.* 2010. 105(12):1666-72.
- 179) Zhang W, Chen H: **The study on the interleukin-8 (IL-8).** *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2002, 19(4):697-702.
- 180) Baggiolini M, Clark-Lewis I. **Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine.** *Febs Lett.*1992. 307(1):97-101.
- 181) Terkeltaub R, Banka CL, Solan J, et al. **Oxidized LDL induces monocyte cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity.** *Arterioscler Thromb.* 1994. 14:47-53.
- 182) Apostolakis S, Papadakis EG, Krambovitis E, Spandidos DA **Chemokines in vascular pathology.** *Int J Mol Med.* 2006. 17: 691–701
- 183) Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL and Feuerstein GZ: **Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells.** *Circ Res.* 1994. 75: 1-7.
- 184) Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW and Rosenzweig A: **MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.** *Nature.* 1999. 398: 718-23.
- 185) Qi X, Li S, Li J. **The prognostic value of IL-8 for cardiac events and restenosis in patients with coronary heart diseases after percutaneous coronary intervention.** *Jpn Heart J.* 2003. 44:623-32.
- 186) Asano T, Ogawa S: **Expression of IL-8 in Kawasaki disease.** *Clin Exp Immunol.* 2000; 122:514-19.
- 187) Radford EP, Doll R, Smith PG. **Mortality among patients with ankylosing spondylitis not given X-ray therapy.** *N Engl J Med.* 1977. 297:572-6.
- 188) Kaprove RE, Little AH, Graham DC et al. **Ankylosing spondylitis: survival in men with and without radiotherapy.** *Arthritis Rheum.* 1980. 23:57-61.

- 189) Darby SC, Doll R, Gill SK et al. **Long term mortality after a single treatment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylitis.** Br J Cancer. 1987. 55:179-90.
- 190) Lehtinen K. **Mortality and causes of death in 398 patients admitted to hospital with ankylosing spondylitis.** Ann Rheum Dis. 1993. 52:174-6.
- 191) Maksimowicz-McKinnon K, Bhatt DL, Calabrese LH. **Recent advances in vascular inflammation: C-reactive protein and other inflammatory biomarkers.** Curr Opin Rheumatol. 2004. 16(1):18-24.
- 192) Hahn BH, Grossman J, Chen W, McMahon M. **The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia.** J Autoimmun. 2007. 28(2-3):69-75.
- 193) Han C, Robinson DW Jr, Hackett MV, Paramore LC, Fraeman KH, Bala MV. **Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis.** J Rheumatol. 2006. 33(11):2167-72.
- 194) Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA et al. **Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study.** Circulation. 2001. 104:1108-13.
- 195) Rosenson RS. **Low high-density lipoprotein cholesterol disorders and cardiovascular risk: contribution of associated low density lipoprotein subclass abnormalities.** Curr Opin Cardiol. 2005. 20:313-17.
- 196) Rader DJ. **High density lipoproteins and atherosclerosis.** Am J Cardiol. 2002. 90(suppl):i62-i70.
- 197) Rossner S. **Further studies on serum lipoproteins in connective tissue diseases.** Atherosclerosis. 1978. 31:93-9.
- 198) Joven J, Rubies-Prat J, Ras MR, de la Figuera M, Lience E, Masdeu S. **High density lipoprotein cholesterol subfractions and apolipoprotein A-I in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis.** Arthritis Rheum. 1984. 27:1199-2000.
- 199) Divecha H, Sattar N, Rumley A, Cherry L, Lowe GDO, Sturrock R. **Cardiovascular risk parameters in men with ankylosing spondylitis in comparison with non-inflammatory control subjects: relevance of systemic inflammation.** Clin Sci (Lond). 2005. 109(2):171-6.
- 200) Van Halm VP, van Denderen JC, Peters MJ, Twisk JW, van der Paardt M, van der Horst-Bruinsma IE, van de Stadt RJ, de Koning MH, Dijkmans BA, Nurmohamed MT. **Increased disease activity is associated with a deteriorated lipid profile in patients with ankylosing spondylitis.** Ann Rheum Dis. 2006. 65(11):1473-77.
- 201) Masi AT, Aldag JC, Mohan PC, Murugan TSR. **Determinants of significantly lower serum total cholesterol levels in ankylosing spondylitis patients than age-, gender-, and medical service-matched control patients: results of multivariate analysis.** Arthritis Rheum. 1999. 42(Suppl):S300.
- 202) Masi AT, Aldag JC, Mohan PC, Murugan TSR. **Significantly lower serum triglyceride levels in ankylosing spondylitis patients than age-, gender-, and medical service-matched controls: results of multivariate analysis.** Arthritis Rheum. 2000. 43(Suppl):S104.
- 203) Burger D, Dayer JM. **High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation?** Autoimmun Rev. 2002. 1:111-7.

- 204) Hulthe J, Fagerberg B. **Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR study)**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002. 22:1162-7.
- 205) Tabas I, Williams KJ, Boren J. **Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis. Update and therapeutic implications**. *Circulation*. 2007. 116:1832-44.
- 206) Marcora S, Casanova F, Williams E et al. **Preliminary evidence for cachexia in patients with well established ankylosing spondylitis**. *Rheumatology (Oxford)*. 2006. 45:1385-8.
- 207) Engvall IL, Elkan AC, Tengstrand B, Cederholm T, Brismar K, Hafstrom I. **Cachexia in rheumatoid arthritis is associated with inflammatory activity, physical disability, and low bioavailable insulin-like growth factor**. *Scand J Rheumatol*. 2008. 37(5):321-8.
- 208) Hennekens CH. **Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men**. *Circulation*. 2000. 101:1767-72.
- 209) Luc G, Bard JM, Juhan-Vague I et al. **C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease: the PRIME study**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003. 23:55-1261.
- 210) Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. **Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?** *Atherosclerosis*. 2000. 148:209-214.
- 211) Pepine CJ. **Clinical implications of endothelial dysfunction**. *Clin Cardiol*. 1998. 21:795-9.
- 212) Ganz P, Vita JA. **Testing endothelial vasomotor function. Nitric oxide, a multipotent molecule**. *Circulation* 108:2049-53.
- 213) Landmesser U, Hornig B, Drexler H. **Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?** *Circulation*. 2004. 109(suppl):II-27-II-33.
- 214) Widlansky ME, Gokce NL, Keaney JF Jr, Vita JA. **The clinical implications of endothelial dysfunction**. *J Am Coll Cardiol*. 2003. 42:1149-60.
- 215) Böger RH. **Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor**. *J Nutr*. 2004. 134(10 Suppl):2842S-2847S; discussion 2853S.
- 216) Böger RH. **The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor**. *Cardiovasc Res*. 2003. 59(4):824-33.
- 217) Böger RH. **Association of asymmetric dimethylarginine and endothelial dysfunction**. *Clin Chem Lab Med*. 2003. 41(11):1467-72.
- 218) Kemény-Beke A, Gesztelyi R, Bodnár N, Zsuga J, Kerekes G, Zsuga M, Biri B, Kéki S, Szodoray P, Berta A, Szekanecz Z, Szántó S. **Increased production of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in ankylosing spondylitis: Association with other clinical and laboratory parameters**. *Joint Bone Spine*. 2010. Jul 8. [Epub ahead of print]
- 219) Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM. **Vasa vasorum and atherosclerosis—Quid novi?** *Thromb Haemost*. 2007. 97(6):873-9.
- 220) Amoroso A, Del Porto F, Di Monaco C, Manfredini P, Afeltra A. **Vascular endothelial growth factor: a key mediator of neoangiogenesis. A review**. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 1997. 1:17-25

- 221) Ballara SC, Miotla JM, Paleolog EM. **New vessels, new approaches:angiogenesis as a therapeutic target in musculoskeletal disorders.** *Int J Exp Pathol.* 199. 80:235-50.
- 222) Benjamin M, Toumi H, Suzuki D, Hayashi K, McGonagle D. **Evidence for a distinctive pattern of bone formation in enthesophytes.** *Ann Rheum Dis.* 2008 Jul 14. [Epub ahead of print]
- 223) Goldberger C, Dulak J, Duftner C, Weidinger F, Falkenbach A, Schirmer M. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) in ankylosing spondylitis—a pilot study.** *Wien Med Wochenschr.* 2002. 152(9–10):223-5.
- 224) Drouart M, Saas P, Billot M, Cedoz J-P, Tiberghien P, Wendling D, Toussiro E. **High serum vascular endothelial growth factor correlates with disease activity of spondylarthropathies.** *Clin Exp Immunol.* 2003. 132:158-62.
- 225) Taylor HG, Weiss JB, McLaughlin B, Dawes PT. **Raised endothelial cell stimulating angiogenesis factor in ankylosing spondylitis.** *Clin Exp Rheumatol.* 1993. 11(5):537-39.
- 226) Jones PB, Makki RJ, Weiss JB. **Endothelial cell stimulating angiogenesis factor—a new biological marker for disease activity in ankylosing spondylitis?** *Br J Rheumatol.* 1994. 33(4):332-5.
- 227) Karoli NA, Rebrov AP. **Vascular wall lesion and disorder of endothelial vasoregulating function in patients with ankylosing spondylitis.** *Klin Med (Mosk).* 2007. 85(6):54-7.
- 228) Poddubnyĭ DA, Rebrov AP. **Endothelial dysfunction in patients with Bechterew’s disease (ankylosing spondylitis).** *Klin Med (Mosk).* 2007. 85(7):66-9.
- 229) George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Ambrosi P, Klein-Soyer C, Cazenave JP, Sampol J. **Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty.** *Thromb Haemost.* 1992. 67:147-53.
- 230) Braun J, Sieper J, Breban M, Collantes-Estevez E, Davis J, Inman R et al. **Anti-tumournecrosis factor alpha therapy for ankylosing spondylitis: international experience.** *Ann Rheum Dis.* 2002. 61(Suppl 3):iii51–iii60.
- 231) Gratacos J, Collado A, Filella X, Sanmarti R, Canete J, Llena J et al. **Serum cytokines(IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity.** *Br J Rheumatol.* 1994. 33(10):927-31.
- 232) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. **Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.** *Nature.* 1999. 399(6736):601-5.
- 233) de Jongh RT, Ijzerman RG, Serne EH, Voordouw JJ, Yudkin JS, de Waal HA et al. **Visceral and truncal subcutaneous adipose tissue are associated with impaired capillary recruitment in healthy individuals.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2006. 91(12):5100-6.
- 234) Ijzerman RG, Voordouw JJ, van Weissenbruch MM, Yudkin JS, Serne EH, Delemarrevande Waal HA et al. **TNF-alpha levels are associated with skin capillary recruitment in humans: a potential explanation for the relationship between TNF-alpha and insulin resistance.** *Clin Sci (Lond).* 2006. 110(3):361-8.
- 235) Takkunen J, Vuopala U, Isomaki H (1970) **Cardiomyopathy in ankylosing spondylitis. Medical history and results of clinical examination in a series of 55 patients.** *Ann Clin Res* 2:106–112
- 236) Bachmann F, Hartl W, Veress M, Frind W (1976) **Cardiovascular complications of ankylosing spondylitis (Bechterew’s disease).** *Med Welt* 27:2149–2150

- 237) Roldan CA, Chavez J, Wiest PW, Qualls CR, Crawford MH. **Aortic root disease and valve disease associated with ankylosing spondylitis.** J Am Coll Cardiol. 1998 Nov;32(5):1397-404.
- 238) O'Neill TW, King G, Graham IM, Molony J, Bresnihan B. **Echocardiographic abnormalities in ankylosing spondylitis.** Ann Rheum Dis. 1992 May;51(5):652-4.
- 239) Takei-Taniguchi R, Imai Y, Ishikawa C, Sakaguchi Y, Nakagawa N, Tsuda T, Hollenberg MD, Yamanishi K. **Interleukin-17- and protease-activated receptor 2-mediated production of CXCL1 and CXCL8 modulated by cyclosporine A, vitamin D3 and glucocorticoids in human keratinocytes.** J Dermatol. 2012 Jul;39(7):625-31.
- 240) Mei Y, Pan F, Gao J, Ge R, Duan Z, Zeng Z, Liao F, Xia G, Wang S, Xu S, Xu J, Zhang L, Ye D. **Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis.** Clin Rheumatol. 2011 Feb;30(2):269-73.

## 7.ANEXOS

## A.ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO

Rheumatol Int  
DOI 10.1007/s00296-010-1416-3

REVIEW

## Atherosclerosis and endothelial dysfunction in patients with ankylosing spondylitis

V. F. Azevedo · R. Pecoits-Filho

Received: 25 February 2009 / Accepted: 10 March 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** Ankylosing spondylitis (AS) is a systemic inflammatory rheumatic disease characterized primarily by axial joint involvement, sacroiliitis and various extra-articular manifestations. High cardiovascular mortality in AS has led many researchers to investigate possible risk factors involved with cardiovascular disease in these patients. This review summarizes published data concerning endothelial dysfunction and atherosclerosis in patients with AS. The author discusses current limitations and problems related to a better assessment of these two possible changes in AS.

**Keywords** Spondylarthropathies · Ankylosing Spondylitis · Inflammation · Biomarkers · Cardiovascular disease · Atherosclerosis · Endothelial activation · Endothelial dysfunction · Arterial stiffness

### Introduction

Ankylosing spondylitis (AS) is a systemic inflammatory rheumatic disease characterized primarily by axial joint involvement, sacroiliitis and various extra-articular manifestations. It is well recognized for causing impaired

physical function and work disability in young men. Furthermore, AS is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality when compared with the general population [1]. This increased burden seems to be predominantly linked to cardiovascular disease (CVD) as indicated by the published population studies based mainly in Canada, United Kingdom and Finland [2–5]. Cardiovascular risk in autoimmune diseases is clearly multifactorial, but among the mechanisms involved, accelerated atherogenesis caused by the systemic inflammatory response seems to be one of the most important. This observation has been demonstrated in rheumatoid arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus SLE [6–8]. This review summarizes published data concerning endothelial dysfunction and atherosclerosis in AS. The aim of this review is to discuss other atherogenic risk factors present in patients with AS and the current limitations to a better assessment of early atherosclerosis and endothelial activation.

### AS and atherosclerosis

The pathogenesis of atherosclerosis is closely related to inflammation, autoimmunity, chronic diseases, and dyslipidemia. The role of lipoproteins and inflammatory cells in atherosclerosis is well defined [9], while the contribution of autoimmune events are progressively gaining strength since some studies showed the presence of antibodies against various antigens expressed in atherosclerotic plaque [10, 11]. As an inflammatory disease, atherosclerosis has been linked to systemic inflammation markers such as C reactive protein (CRP), fibrinogen and recently to biomarkers such as cytokines, chemokines, adhesion molecules and proteases [12, 13].

V. F. Azevedo (✉)  
Head of Spondylarthropathies Service, Federal University  
of Paraná, Rua Lamenha Lins 1110 ap 11A, Rebouças-Curitiba,  
PR 80250-020, Brazil  
e-mail: valderilio@hotmail.com

R. Pecoits-Filho  
Graduate Program in Health Sciences, Pontificia Universidade  
Catolica do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Published online: 27 March 2010

 Springer

It is reasonable to accept that there is no grade A evidence linking atherosclerosis to AS, since most studies are cross sectional and involve small patient samples and controls. Han et al. [14] proposed that the risk of atherosclerosis increased 1.5 times in a cohort of patients with AS when compared to matching controls; however, prospective studies with long-term follow-up are clearly needed to fully quantify the increased risk of atherosclerosis in this patient group.

It is well known that disturbances in lipid profile can predispose patients to atherosclerosis. A high level of high density lipoprotein cholesterol (HDLc) generally has a protective effect, particularly normal HDLc [15]. There is a growing line of research indicating that pro-inflammatory HDLc exerts a non-protective effect [16]. Increasing serum levels of triglycerides and low density lipoproteins cholesterol (LDLc) have been related to plaque formation, and an atherogenic index represented by the ratio of total cholesterol to HDLc was proposed in order to improve prognoses for cardiovascular disease [15, 17]. Small studies evaluating lipoproteins in AS subjects have reported lower total cholesterol [18] and lower HDLc [19], but these earlier reports from nearly two decades ago did not address potential confounders nor exam interactions with systemic inflammation. Sattar et al. [20] analyzing cardiovascular risk parameters in men with ankylosing spondylitis noted that circulating cholesterol and LDLc concentrations were lower and inversely correlated with IL-6 or CRP concentrations. The atherogenic index was also slightly elevated in this same study. A reduction in HDLc was more frequently found in AS subjects than in controls [20–22]. One study showed that metabolic syndrome (MetS) was more prevalent in AS than in controls; however, the authors did not investigate the relationship between inflammation and MetS [21]. Nurmohamed et al. reported higher disease activity in patients with AS curiously associated with lower lipid levels [22]. In this same study, the authors observed a more atherogenic lipid profile related to HDLc concentration, decreasing twice as much as total cholesterol. However, it is still unclear whether or not a specific atherogenic lipid profile is present in AS [21–24].

There is considerable evidence that inflammation can deteriorate lipid profile [25, 26]. Particularly in patients with RA, the inflammatory process that occurs on the synovial membrane presents similarities to the process that occurs on the vascular wall [9, 27]. Although atherosclerosis is a very complex phenomenon, its key initiating process appears to be the sub-endothelial retention of apolipoprotein B-containing lipoproteins [27]. Interestingly, Marcora et al. reported preliminary evidence of cachexia in nineteen male patients with long-standing AS [28]. Further research is necessary to determine whether or not these changes in metabolic status as well as promotion

of accelerated loss of skeletal muscle and modifications in BMI could indeed change the lipid profile and thus induce atherosclerosis. In the chronic inflammatory response seen in patients with RA with cachexia, CRP and IL-6 were correlated negatively with lean body mass [29]. Some prospective studies have suggested that even modest elevations in IL-6 concentrations predict CHD independently of traditional risk factors [30, 31]. In particular, IL-6 was linked to dyslipidemia and endothelial dysfunction even in non-inflammatory subjects [32].

#### Vascular integrity and endothelial activation in AS

Endothelial dysfunction should more appropriately be considered as endothelial activation and represents a switch from a quiescent phenotype toward one involving the host defense response [33, 34]. It is characterized by an imbalance between vasodilating and vasoconstricting factors generating activation of the apoptotic processes, vascular remodeling and increased activity of vasoconstricting factors, and pro-inflammatory and prothrombotic mediators [33, 35, 37]. This dysfunction plays an important role in all stages of atherosclerosis [36] and appears to independently predict CHD events [37]. The study of endothelial function in clinical research has emerged as an important end point that complements measurement of circulating risk factors, traditional cardiovascular clinical outcomes and imaging techniques for structural arterial diseases burden, including carotid intima-media thickness and intravascular ultrasound [34].

The present data indicate that vasa vasorum neovascularization and atherosclerosis appear to be inseparably linked, triggered and perpetuated by inflammatory reactions within the vascular wall [38]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an endogenous regulator of endothelial integrity and a potent angiogenic factor. It plays a pivotal role in human RA and in animal models of arthritis [39] and also plays a role in bone formation [40] although a recent study conducted in patients with spondylarthritides showed that spur formation and growth affected by endochondral, intramembranous and chondroidal ossification, and also typical features of endochondral ossification such as cell hypertrophy and florid vascular invasion of a cellular calcified cartilage were not conspicuous [41]. In a small study, plasma levels of VEGF were elevated in patients with AS compared with controls and although VEGF levels were significantly correlated with BASMI score, the authors did not completely assess disease activity [42]. Toussirot et al. reported that VEGF levels were significantly higher in patients with spondylarthritides (SpA) and RA than in controls. Serum levels of VEGF were strongly correlated and involve in clinical and

laboratory indices of disease activity in SpA [43]. More than a decade ago, Weiss et al. proposed that high activity of endothelial cell stimulating angiogenesis factor (ESAF) found in AS could reflect the angiogenic process involved in new bone formation. It is not known whether or not ESAF plays a role in atherosclerosis process; however, the authors proposed it as a new biological marker for disease activity in patients with ankylosing spondylitis [44, 45].

### Biomarkers and endothelial activation

Recent studies with small numbers of patients have revealed disorders of the endothelium vasoregulating function associated with disease activity related to an increase in the number of circulating endothelial cells in patients with high activity; however, exclusion criteria and evaluating methods were not the same in all studies [46, 47]. Increased levels of circulating endothelial cells in patients with atherosclerotic disease and vascular inflammation suggest a direct relationship between the number of these cells in the peripheral circulation and the extent of endothelial injury [34]. These cells can be measured in the circulation by both flow cytometry and a combination of magnetic bead selection and fluorescent microscopy [48].

Endothelial cell activation leads to increased expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules that triggers leukocyte adhesion and migration into the sub-endothelial space. Many of these circulating markers were evaluated in patients with AS (such as MCP-1, IL 6, V-CAM, I-CAM, TNF $\alpha$ ). As a result of biological and assay availability and variability, some of these factors presented conflicting results and currently are limited to clinical research. Circulating TNF $\alpha$  is an important cytokine involved in the pathogenesis of AS and its levels are increased in patients with AS [49, 50]. TNF $\alpha$  also blocks the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), by interfering with Akt phosphorylation, which is essential for flow-dependent and Acetylcholine (ACh)-dependent vasodilatation [51]. Two studies suggested that TNF $\alpha$  and IL-6 may contribute to the development of atherosclerosis in AS [20, 52]; however, one study indicated that TNF $\alpha$  levels in patients with AS were not different from that of controls although IL-6 levels were higher in patients with AS [53]. In addition, the authors did not find a correlation between MCP-1, IL-6 or TNF $\alpha$  levels and clinical features or arterial stiffness parameters.

Caliskan et al. reported that high circulating levels of CRP and TNF $\alpha$  were positively correlated with coronary flow reserve (CFR) [52]; however, it is known that circulating levels of CRP and TNF $\alpha$  are associated with skin microvascular dysfunction even in normal subjects [54, 55].

### Methods of clinical assessment/images techniques

As IMT of common carotid artery measured by high-resolution ultrasonography has been considered a useful index for identifying early stages of atherosclerosis [56], some studies in AS have used this index in order to detect sub-clinical atherosclerosis [21, 53, 57, 58]. These studies, although well designed, showed results with discrepancies and lack statistical power. Sari et al. evaluated 54 patients with AS and 31 controls [58]. Flow-mediated dilatation and endothelium-independent dilatation of the brachial artery and intima-media thickness of the common carotid artery were measured by ultrasonography. They did not detect correlations between flow-mediated dilatation (FMD) and age, sex, serum lipids, CRP, ESR, smoking habits and disease activity scores but did report that intima-media thickness (IMT) of the common carotid artery was positively correlated with age and BASMI score. They also did not observe a significant difference in the prevalence of IMT between the two groups. Although the effect of smoking on endothelial function was not the focus of their study, there was a high prevalence of smokers among patients and controls. As smoking is strongly correlated with endothelial dysfunction, the authors presented a subgroup analysis comparing the two groups (smokers vs. non-smokers) between the patients with AS regardless of their disease status and reported only a slightly reduced FMD in smokers [59]. Mathieu et al. demonstrated a trend toward increased carotid IMT and arterial stiffness, markers of sub-clinical atherosclerosis, but without significance [58]. Interestingly, the control group had a worse cardiovascular profile with higher TC, higher glycemia and systolic blood pressure and only the waist hip ratio (WHR) was higher in the patient group. Curiously, some specific population characteristics seen in patients' groups and controls of Sari et al. [57] (high prevalence of smokers in Turkey) and Mathieu et al. [58] (high level of cardiovascular risk in their region of France) influenced their results.

Caliskan et al. demonstrated reduced coronary flow reserve (CFR) in patients with AS [52]. Reduced CFR reflects coronary microvascular dysfunction and is associated with left ventricular diastolic dysfunction [60, 61].

Arterial wall elastic properties such as distensibility coefficient (DC), stiffness index (beta) and incremental elastic modulus ( $E_{inc}$ ) of the carotid of patients with AS were estimated in a study and there were no significant differences compared to controls [53]. Recently, Nurmohamed et al. studying microvascular function in a small group of patients measured by endothelium-dependent vasodilation and skin capillary recruitment showed vascular dysfunction in the microcirculatory level [62]. These patients were scheduled for etanercept treatment according to the ASAS guidelines for anti-TNF $\alpha$  treatment [63] and

they reported improvement in clinical and laboratorial parameters as well as improvement in microvascular function after TNF $\alpha$  blocking therapy.

### Conclusion

Despite high cardiovascular mortality in patients with AS, it is extremely important to recognize early atherosclerosis and also to recognize if AS alone is an isolated risk factor to atherosclerosis. Few studies have investigated the prevalence of conventional risk factors in AS, and the patient profile of those who are prone to atherosclerosis is not yet clear. Undoubtedly, studies involving tests of endothelial function together with structural measures are pivotal to evaluate the mechanisms, triggering and progression of early arterial disease in autoimmune disorders such as RA, LES and AS. Some clinical results have revealed that intima-media thickness measured by high-resolution ultrasonography appears to be limited as a marker of early atherosclerosis, particularly in young individuals with AS. With respect to biomarkers, the results of the published studies have in general shown only mere associations. It is reasonable to assume that the true value of biomarkers will depend on further information regarding the quantitative relationship between endothelial dysfunction measures in patients with AS and cardiovascular outcomes. Clearly, the study sample size, particularly those related to vascular dysfunction in an AS population, is also a limiting factor to a better understanding by scientific community of the possibility of endothelial activation by the disease itself.

It is known that patients with early AS will not perform well according to the modified New York criteria. This refers to the pivotal diagnostic criteria used to select patients with AS for clinical studies; however, there is a lack of suitable criteria for early diagnosis [64]. Consequently, utilizing modified New York criteria to detect early atherosclerosis or vascular dysfunction in patients with AS would not be useful. Furthermore, the dependence on radiographic changes implies that many patients will still experience long delays before the diagnosis is made. A protocol in the early pre-clinical phase of endothelial dysfunction in AS or other spondylarthritides would indeed result in better management and a greater benefit for the patient.

Finally, further studies with larger patient samples are urgently needed to clarify many questions concerning endothelial activation and atherosclerosis related to AS.

**Conflict of interest statement** None.

### References

- Peters MJ, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans BA, Nurmohamed MT (2004) Cardiovascular risk profile of patients with spondylarthropathies, particularly ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 34:585–592
- Radford EP, Doll R, Smith PG (1977) Mortality among patients with ankylosing spondylitis not given X-ray therapy. *N Engl J Med* 297:572–576
- Kaprove RE, Little AH, Graham DC et al (1980) Ankylosing spondylitis: survival in men with and without radiotherapy. *Arthritis Rheum* 23:57–61
- Darby SC, Doll R, Gill SK et al (1987) Long term mortality after a single treatment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylitis. *Br J Cancer* 55:179–190
- Lehtinen K (1993) Mortality and causes of death in 398 patients admitted to hospital with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 52:174–176
- Salmon JE, Roman MJ (2008) Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 121(10 Suppl 1):S3–S8
- Pereira IA, Borba EF (2008) The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Swiss Med Wkly* 138(37–38):534–539
- Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB (2003) Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 108:2957–2963
- Ross R (1999) Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115–126
- Wick G, Knoflach M, Xu Q (2004) Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Ann Rev Immunol* 22:361–403
- Doria A, Sherer Y, Meroni PT, Schoenfeld Y (2005) Inflammation and accelerated atherosclerosis. Basic mechanisms. *Rheum Dis N Am* 31:355–362
- Maksimowicz-McKinnon K, Bhatt DL, Calabrese LH (2004) Recent advances in vascular inflammation: C-reactive protein and other inflammatory biomarkers. *Curr Opin Rheumatol* 16(1):18–24
- Hahn BH, Grossman J, Chen W, McMahon M (2007) The pathogenesis of atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia. *J Autoimmun* 28(2–3):69–75
- Han C, Robinson DW Jr, Hackett MV, Paramore LC, Fraeman KH, Bala MV (2006) Cardiovascular disease and risk factors in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 33(11):2167–2172
- Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA et al (2001) Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Circulation* 104:1108–1113
- Rosenson RS (2005) Low high-density lipoprotein cholesterol disorders and cardiovascular risk: contribution of associated low-density lipoprotein subclass abnormalities. *Curr Opin Cardiol* 20:313–317
- Rader DJ (2002) High density lipoproteins and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 90(suppl):i62–i70
- Rossmor S (1978) Further studies on serum lipoproteins in connective tissue diseases. *Atherosclerosis* 31:93–99
- Joven J, Rubies-Prat J, Ras MR, de la Figuera M, Lience E, Masdeu S (1984) High density lipoprotein cholesterol subfractions and apolipoprotein A-I in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 27:1199–2000
- Divecha H, Sattar N, Rumley A, Cherry L, Lowe GDO, Sturrock R (2005) Cardiovascular risk parameters in men with ankylosing

- spondylitis in comparison with non-inflammatory control subjects: relevance of systemic inflammation. *Clin Sci (Lond)* 109(2):171–176
21. Malesci D, Niglio A, Mennillo GA, Buono R, Valentini G, La Montagna G (2007) High prevalence of metabolic syndrome in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 26(5):710–714
  22. van Halm VP, van Denderen JC, Peters MJ, Twisk JW, van der Paardt M, van der Horst-Bruinsma IE, van de Stadt RJ, de Koning MH, Dijkmans BA, Nurmohamed MT (2006) Increased disease activity is associated with a deteriorated lipid profile in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 65(11):1473–1477
  23. Masi AT, Aldag JC, Mohan PC, Murugan TSR (1999) Determinants of significantly lower serum total cholesterol levels in ankylosing spondylitis patients than age-, gender-, and medical service-matched control patients: results of multivariate analysis. *Arthritis Rheum* 42(Suppl):S300
  24. Masi AT, Aldag JC, Mohan PC, Murugan TSR (2000) Significantly lower serum triglyceride levels in ankylosing spondylitis patients than age-, gender-, and medical service-matched controls: results of multivariate analysis. *Arthritis Rheum* 43(Suppl):S104
  25. Burger D, Dayer JM (2002) High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev* 1:111–117
  26. Hulthe J, Fagerberg B (2002) Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1162–1167
  27. Tabas I, Williams KJ, Borén J (2007) Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis. Update and therapeutic implications. *Circulation* 116:1832–1844
  28. Marcora S, Casanova F, Williams E et al (2006) Preliminary evidence for cachexia in patients with well established ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 45:1385–1388
  29. Engvall IL, Elkan AC, Tengstrand B, Cederholm T, Brismar K, Hafstrom I (2008) Cachexia in rheumatoid arthritis is associated with inflammatory activity, physical disability, and low bioavailable insulin-like growth factor. *Scand J Rheumatol* 37(5):321–328
  30. Hennekens CH (2000) Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 101:1767–1772
  31. Luc G, Bard JM, Juhan-Vague I et al (2003) C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen as predictors of coronary heart disease: the PRIME study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:55–1261
  32. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V (2000) Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148:209–214
  33. Pepine CJ (1998) Clinical implications of endothelial dysfunction. *Clin Cardiol* 21:795–799
  34. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (2007) Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 115(10):1285–1295
  35. Ganz P, Vita JA (2003) Testing endothelial vasomotor function. Nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation* 108:2049–2053
  36. Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2004) Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 109(suppl II):II-27–II-33
  37. Widlansky ME, Gokce NL, Keane JF Jr, Vita JA (2003) The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 42:1149–1160
  38. Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM (2007) Vasa vasorum and atherosclerosis—Quid novi? *Thromb Haemost* 97(6):873–879
  39. Amoroso A, Del Porto F, Di Monaco C, Manfredini P, Afeltra A (1997) Vascular endothelial growth factor: a key mediator of neoangiogenesis. A review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 1:17–25
  40. Ballara SC, Miotla JM, Paleolog EM (1999) New vessels, new approaches: angiogenesis as a therapeutic target in musculoskeletal disorders. *Int J Exp Pathol* 80:235–250
  41. Benjamin M, Toumi H, Suzuki D, Hayashi K, McGonagle D (2008) Evidence for a distinctive pattern of bone formation in enthesophytes. *Ann Rheum Dis*. 2008 Jul 14. [Epub ahead of print]
  42. Goldberger C, Dulak J, Duftner C, Weidinger F, Falkenbach A, Schirmer M (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) in ankylosing spondylitis—a pilot study. *Wien Med Wochenschr* 152(9–10):223–225
  43. Drouart M, Saas P, Billot M, Cedoz J-P, Tiberghien P, Wendling D, Toussiot É (2003) High serum vascular endothelial growth factor correlates with disease activity of spondylarthropathies. *Clin Exp Immunol* 132:158–162
  44. Taylor HG, Weiss JB, McLaughlin B, Dawes PT (1993) Raised endothelial cell stimulating angiogenesis factor in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 11(5):537–539
  45. Jones PB, Makki RJ, Weiss JB (1994) Endothelial cell stimulating angiogenesis factor—a new biological marker for disease activity in ankylosing spondylitis? *Br J Rheumatol* 33(4):332–335
  46. Karoli NA, Rebrov AP (2007) Vascular wall lesion and disorder of endothelial vasoregulating function in patients with ankylosing spondylitis. *Klin Med (Mosk)* 85(6):54–57
  47. Poddubnyĭ DA, Rebrov AP (2007) Endothelial dysfunction in patients with Bechterew's disease (ankylosing spondylitis). *Klin Med (Mosk)* 85(7):66–69
  48. George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Ambrosi P, Klein-Soyer C, Cazenave JP, Sampol J (1992) Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost* 67:147–153
  49. Braun J, Sieper J, Breban M, Collantes-Estevez E, Davis J, Inman R et al (2002) Anti-tumour necrosis factor alpha therapy for ankylosing spondylitis: international experience. *Ann Rheum Dis* 61(Suppl 3):iii51–iii60
  50. Gratacos J, Collado A, Filella X, Sanmarti R, Canete J, Llana J et al (1994) Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity. *Br J Rheumatol* 33(10):927–931
  51. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399(6736):601–605
  52. Caliskan M, Erdogan D, Gullu H, Yilmaz S, Gursoy Y, Yildirim A et al (2008) Impaired coronary microvascular and left ventricular diastolic functions in patients with ankylosing spondylitis. *Atherosclerosis* 196(1):306–312
  53. Choe JY, Lee MY, Rheem I, Rhee MY, Park SH, Kim SK (2008) No differences of carotid intima-media thickness between young patients with ankylosing spondylitis and healthy controls. *Joint Bone Spine* 75(5):548–553
  54. de Jongh RT, Ijzerman RG, Serne EH, Voordouw JJ, Yudkin JS, de Waal HA et al (2006) Visceral and truncal subcutaneous adipose tissue are associated with impaired capillary recruitment in healthy individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 91(12):5100–5106
  55. Ijzerman RG, Voordouw JJ, van Weissenbruch MM, Yudkin JS, Serne EH, Delemarrevande Waal HA et al (2006) TNF-alpha levels are associated with skin capillary recruitment in humans: a

- potential explanation for the relationship between TNF-alpha and insulin resistance. *Clin Sci (Lond)* 110(3):361-368
56. Wofford J, Kahl F, Howard G, McKinney W, Toole J, Crouse JI (1991) Relation of extent of extracranial carotid artery atherosclerosis as measured by B-mode ultrasound to the extent of coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 11(6):1786-1794
57. Sari I, Okan T, Akar S, Cece H, Altay C, Secil M, Birlik M, Onen F, Akkoc N (2006) Impaired endothelial function in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 45:283-286
58. Mathieu S, Joly H, Baron G, Tournadre A, Dubost J-J, Ristori J-M, Lussan J-R, Soubrier M (2008) Trend towards increased arterial stiffness or intima-media thickness in ankylosing spondylitis patients without clinically evident cardiovascular disease. *Rheumatology* 47:1203-1207
59. Pieringer H (2006) Impaired endothelial function in patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 45(10):1319; author reply 1319-20. Comment on: *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Mar;45(3):283-286
60. Galderisi M, Cicala S, Caso P et al (2002) Coronary flow reserve and myocardial diastolic dysfunction in arterial hypertension. *AmJ Cardiol* 90:860-864
61. Erdogan D, Gullu H, Caliskan M et al (2005) Coronary flow reserve in dipper and non-dipper hypertensive patients. *Blood Press* 14:345-352
62. van Eijk IC, Peters MJL, Serne EH, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans BAC, Smulders YM, Nurmohamed MT (2008) Microvascular function is impaired in ankylosing spondylitis and improves after TNF blockade. *Ann Rheum Dis* 2008 Apr 4. [Epub ahead of print]
63. Braun J, Davis J, Dougados M, Sieper J, van der LS, van der HD (2006) First update of the international ASAS consensus statement for the use of anti-TNF agents in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 65(3):316-320
64. Rudwaleit M, Listing J, Marker-Hermann E et al (2004) Spinal mobility in early ankylosing spondylitis and in axial SpA without definite radiographic sacroiliitis. *Ann Rheum Dis* 63(Suppl 1):400

## B. 1. POSTER APRESENTADO EM CONGRESSO

# Certificado

Certificamos que o trabalho

**AVALIAÇÃO DE ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE LDL MINIMAMENTE MODIFICADA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE E SUA CORRELAÇÃO COM ATIVIDADE DE DOENÇA.**

dos autores: LUDMILA A. RUBIN DE CELIS; FERNANDA TELES CECCON; VALDERÍLIO FEIJÓ AZEVEDO; CARLOS A. ENGELHORN; DULCINÉIA S. P. ABDALLA; TANIZE E. S. FAULIN; ROBERTO PECOITS-FILHO; JOSÉ ROCHA FARIA NETO, foi apresentado, na modalidade Pôster, no XXIX Congresso Brasileiro de Reumatologia ocorrido de 19 a 22 de setembro de 2012 no Centro de Convenções Vitória em Vitória/ES.

Vitória, 22 de setembro de 2012



*Geraldo Castelar*  
**Geraldo Castelar**  
Presidente da Sociedade  
Brasileira de Reumatologia

*José Roberto Pereira Santos*  
**José Roberto Pereira Santos**  
Presidente do XXIX Congresso  
Brasileiro de Reumatologia

*Valéria Valim*  
**Valéria Valim**  
Diretora da Comissão Científica do  
XXIX Congresso Brasileiro de Reumatologia

Realização

**SORES**  
Sociedade de Reumatologia do Espírito Santo

Promoção



Gerenciamento



## B.2 POSTER APRESENTADO EM CONGRESSO

# Certificado

Certificamos que o trabalho

**IL-8, MAS NÃO OUTROS BIOMARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL, ESTÁ ASSOCIADA COM ATIVIDADE DE DOENÇA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE SEM TRATAMENTO COM AGENTES ANTI-TNF**

dos autores: MÁRCIA A. ARANTES MARQUES; VALDERÍLIO F. AZEVEDO; JOSÉ F. ROCHA NETO; ANDREA STINGHEN; LÚCIO F. HYURKO; WAGNER P. MILLER; BEATRIZ P. GONÇALVES; CARLA C. SZYHTA; ROBERTO PECOITS-FILHO, foi apresentado, na modalidade Pôster, no XXIX Congresso Brasileiro de Reumatologia ocorrido de 19 a 22 de setembro de 2012 no Centro de Convenções Vitória em Vitória/ES.

Vitória, 22 de setembro de 2012



**XXIX CONGRESSO  
BRASILEIRO  
DE REUMATOLOGIA**  
Centro de Convenções de VITÓRIA - ES  
19 a 22 de setembro de 2012  
CIÊNCIA E INOVAÇÃO

*Geraldo Castelar*  
Geraldo Castelar  
Presidente da Sociedade  
Brasileira de Reumatologia

*José Roberto Pereira Santos*  
José Roberto Pereira Santos  
Presidente do XXIX Congresso  
Brasileiro de Reumatologia

*Valéria Valim*  
Valéria Valim  
Diretora da Comissão Científica do  
XXIX Congresso Brasileiro de Reumatologia

Realização      Promoção      Gerenciamento

**SORES**            

Sociedade de Reumatologia de Porto Alegre      ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA      CCM Worldwide Medical Congress

## C.CARTA DE APROVAÇÃO CEP

---



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa  
Núcleo de Bioética

Curitiba, 18 de outubro de 2006.

Of. 615/06/CEP-PUCPR

Ref. "Avaliação da LDL oxidada em pacientes com espondilite anquilosante."

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 17 de outubro do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado "Avaliação da LDL oxidada em pacientes com espondilite anquilosante.", pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 1148, e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,

Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra  
Fernanda Teles Ceccon

## D.TERMO DE CONSENTIMENTO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de pesquisa:

AVALIAÇÃO DA LDL OXIDADA EM PACIENTES COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE

Instituição:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Pesquisador Principal:

Dra. Fernanda Teles Ceccon – CRM 18388

Médica Cardiologista

Aluna do curso de Mestrado em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Orientador:

Prof. Dr. José Rocha Faria Neto.

Doutor em Cardiologia pela Faculdade de Medicina da USP

Pós-Doutor em Aterosclerose pelo Cedars Sinai Medical Center (UCLA)

Professor Adjunto de Cardiologia da PUCPR

Este documento é um termo de consentimento livre e esclarecido. Ele informa a você os objetivos, duração, procedimentos, riscos e benefícios sobre o estudo de pesquisa clínica no qual você está sendo convidado a participar. Você precisa ler, entender e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido se concordar em participar deste estudo.

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa por ser portador de Espondilite Anquilosante, uma doença reumatológica que afeta principalmente suas articulações da coluna. Diversos estudos têm demonstrado que portadores de algumas doenças reumatológicas são mais susceptíveis a desenvolver aterosclerose, a doença que causa o “entupimento” das artérias do coração por

placas de gordura. Uma das hipóteses para que isto ocorra é que a própria inflamação da doença poderia tornar a molécula de colesterol ruim (LDL-colesterol) mais agressiva, facilitando o seu acúmulo nas artérias. Isto ocorreria por uma modificação na estrutura da molécula do colesterol ruim, em um processo conhecido como oxidação. Nós não sabemos se isto ocorre nos portadores de Espondilite Anquilosante.

Neste estudo, avaliaremos os seus níveis de LDL oxidada em amostra de sangue, e para avaliar se há algum grau de comprometimento de suas artérias, realizaremos um estudo das artérias carótidas (no pescoço) por ultra-sonografia, um método não invasivo e indolor, que consiste em passar um gel na pele possibilitando que os vasos aonde o sangue circula apareçam em uma tela. Serão feitos também exames de sangue para avaliação de perfil lipídico (“gordura do sangue”), glicemia (“açúcar do sangue”), provas de atividade inflamatória (para medir o “grau de inflamação”) entre outros. Os riscos referentes aos procedimentos do estudo são mínimos. Como realizaremos a dosagem em amostra de sangue, existe a possibilidade de formação de hematomas no local da punção venosa e desconforto. Serão feitos todos os esforços para que tudo seja realizado com o menor desconforto possível. Equipamento necessário e pessoal treinado estarão à disposição.

É uma decisão sua participar deste estudo. Você pode decidir parar a qualquer momento, sem ocorrência de danos ou perda de benefícios aos quais você tenha direito. A participação neste estudo será sem custos para você. Caso você decida não participar deste estudo, continuará a receber o atendimento padrão que qualquer paciente na sua condição receberia. Sua decisão de não participar ou retirar-se do estudo não envolverá nenhuma penalidade ou perda dos benefícios aos quais você tem direito, e não afetarão seu acesso ao atendimento médico.

Você tem direito de fazer perguntas relacionadas a este estudo a qualquer momento. Quaisquer dúvidas decorrentes da metodologia, questionário, realização do exame, entrar em contato com a Dra. Fernanda Ceccon, pelo telefone (41) 9975-3100. Os registros do estudo que o identificam serão mantidos confidenciais conforme exigido por lei. Você deve estar ciente e concordar que, conservando o anonimato de cada indivíduo, os resultados dos exames poderão ser publicados e/ou apresentados em revistas, palestras e congressos.

Compreendo a finalidade deste estudo. Foi permitido que eu fizesse perguntas e minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente. Fui informado sobre quem contatar se tiver perguntas adicionais. Li este consentimento e concordo em estar neste estudo, com o entendimento que posso me retirar a qualquer momento. Fui informado de que receberei uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do participante e RG:

\_\_\_\_\_

Nome do profissional obtendo o consentimento em letra de forma:

\_\_\_\_\_

Assinatura do profissional obtendo o consentimento:

\_\_\_\_\_

**TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Pesquisa de disfunção endotelial em pacientes com Espondilite Anquilosante.**

**Investigador: Valderílio Feijó Azevedo**

**Local da Pesquisa: Ambulatório de Reumatologia (SAM 6) no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná**

**Rua Lamenha Lins 1110 ap. 11A  
Rebouças- Curitiba- PR CEP 80250-020 cel: 041- 99853427**

**PROPÓSITO DA INFORMAÇÃO AO PACIENTE E DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO**

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, coordenada por um profissional de saúde agora denominado pesquisador. Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção. Ele pode conter palavras que você não entende. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você não entenda claramente.

O propósito deste documento é dar a você as informações sobre a pesquisa e, se assinado, dará a sua permissão para participar no estudo. O documento descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e eventuais riscos ou desconfortos caso queira participar. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

**INTRODUÇÃO**

A patogênese da Aterosclerose está intimamente correlacionada com inflamação, autoimunidade, doenças crônicas e dislipidemia. Sugere-se que alterações ateroscleróticas estão envolvidas no aumento de mortalidade por doença cardiovascular em pacientes com EA, estando presente também um perfil lipídico aterogênico e distúrbios na função dos linfócitos T-Helper, acarretando disfunção endotelial e função microvascular coronariana defeituosas. Porém até o momento as evidências que explicam de maneira concreta a relação de aterosclerose e EA ainda são fracas. Mesmo que perfil de pacientes portadores espondilite anquilosante que estão mais sujeitos a aterosclerose ainda não está esclarecido O diagnóstico é baseado em avaliações clínicas, de imagem e na análise de fatores pró-inflamatórios como as citocinas e moléculas de adesão que estão sabidamente relacionados ao dano endotelial.

**PROPÓSITO DO ESTUDO**

Pesquisar disfunção endotelial e alterações vasculares em portadores de Espondilite Anquilosante para melhor acompanhamento e tratamento dos pacientes.

**SELEÇÃO**

Participarão do estudo pacientes em acompanhamento no ambulatório de Reumatologia do Hospital de Clínicas com o diagnóstico confirmado de Espondilite Anquilosante. Serão incluídos no estudo mesmos aqueles pacientes que apresentarem outras doenças crônicas cardiovasculares.

**PROCEDIMENTOS**

A pesquisa será realizada através da coleta de 5ml sanguíneos, esse material será examinado para a pesquisa de moléculas de adesão e fatores pró-inflamatórios sabidamente correlacionados a disfunção endotelial. O procedimento é rápido e simples e praticamente livre de complicações.

**PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:**

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar no estudo. Uma vez que você decidiu participar do estudo, você pode retirar seu consentimento e participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido ou perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

**CUSTOS**

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos previstos no estudo.

**PAGAMENTO PELA PARTICIPAÇÃO**

Sua participação é voluntária, portanto você não será pago por sua participação neste estudo.

**PERMISSÃO PARA REVISÃO DE REGISTROS, CONFIDENCIALIDADE E ACESSO AOS REGISTROS:**

O Investigador responsável pelo estudo e equipe irá coletar informações sobre você. Em todos esses registros um código substituirá seu nome. Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo, membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética, podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Você tem direito de acesso aos seus dados. Você pode discutir esta questão mais adiante com seu médico do estudo.

**CONTATO PARA PERGUNTAS**

Se você ou seus parentes tiver (em) alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Investigador do estudo ou sua equipe VALDERILIO FEIJÓ AZEVEDO/ 99853427 . Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone: 3360-1896. O CEP trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE:**

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito

Eu entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

_____	_____	_____
NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO RESPONSÁVEL (Se menor ou incapacitado)	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR (Pessoa que aplicou o TCLE)	ASSINATURA	DATA

## E.AVALIAÇÃO DO PACIENTE COM ESPONDILITE ANQUILOSANTE

### **Critérios do ESSG (Grupo Europeu de Estudo das Espondiloartropatias)**

#### Grupo A

1. Dor vertebral inflamatória. (\*)
2. Sinovite assimétrica (atual ou anterior). (\*\*)
3. Sinovite predominante em membros inferiores. (\*\*)

#### Grupo B

1. Familiares de 1º ou 2º grau com espondilite anquilosante, psoríase, uveíte anterior, artrite reativa ou doença inflamatória intestinal.
  2. Psoríase atual ou anterior, diagnosticada por médico.
  3. Doença de Crohn ou colite ulcerativa atual ou anterior, diagnosticada por médico e confirmada por exame de imagem ou endoscopia.
  4. Uretrite não gonocócica ou cervicite no mês anterior à artrite.
  5. Diarréia aguda no mês anterior à artrite.
  6. Dor alternante em nádega (atual ou anterior).
  7. Entesopatia (dor espontânea - atual ou anterior- ou à palpação em inserção do tendão de Aquiles ou fáschia plantar).
  8. Sacroiliite: bilateral grau 2-4 ou unilateral grau 3-4 segundo convenção 0 = normal, 1 = possível, 2 = mínima, 3 = moderada, 4 = anquilose.
- 

(\*) **Dor vertebral inflamatória: história ou presença de dor em região lombar, dorsal ou cervical, com pelo menos 4 das seguintes características:**

- (a) idade de início da dor antes dos 45 anos de idade.
- (b) início insidioso.
- (c) melhora com exercício.
- (d) rigidez matinal.
- (e) duração mínima de 3 meses.

(\*\*) **Dactilite pode ser considerada artrite, e monoartrite pode ser considerada artrite assimétrica (segundo comunicação pessoal de Dougados – 30/01/04).**

**O paciente cumpre os critérios se apresenta: 1 ou mais critérios do grupo A E 1 ou mais critérios do grupo B.**

**[Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, Amor B, Calin A, Cats A, Dijkmans B, Olivieri I, Pasero G, Veys E, Zeidler H. The European Spondyloarthritis Study Group Preliminary Criteria for the Classification of Spondyloarthritis. Arthritis Rheum 1991; 34 (10): 1218-27].**

## **Mobilidade da coluna vertebral**

### **Distância occipício-parede**

Calcanhares e, se possível, escápulas contra a parede. Medir a distância em cm (com margem de erro de  $\pm 0,1$  cm) desde a região occipital até a parede durante o máximo esforço para tocar a cabeça na parede sem mover o queixo além de sua posição normal.

### **Teste de Schober modificado**

Este teste é realizado assinalando um ponto sobre a apófise espinhosa de L5 (a primeira apófise que se encontra abaixo da linha projetada ao nível da parte superior da crista ilíaca, embora o ponto exato não seja indispensável). Marca-se um segundo ponto 10 cm acima do primeiro com o paciente ereto em posição neutra. O paciente deve flexionar o tronco o máximo possível sem flexionar os joelhos e mede-se o quanto aumentou. Normalmente é maior do que 5 cm.

### **Flexão lateral da coluna**

O paciente estará de pé tão próximo da parede quanto possível ao nível dos ombros. Mede-se em cm a distância entre o 3º dedo e o solo. Pede-se ao paciente que incline lateralmente o tronco mantendo os ombros no mesmo plano e sem flexionar os joelhos nem erguer os calcanhares. Faz-se nova medição e calcula-se a diferença entre ambas. Repetem-se os movimentos laterais uma vez e o resultado é a média das duas medidas (margem de erro  $\pm 0,1$  cm).

### **Expansibilidade torácica**

Diferença em cm entre expiração máxima e inspiração máxima, medida ao nível do quarto espaço intercostal em homens e imediatamente abaixo dos seios nas mulheres (margem de erro  $\pm 0,1$  cm). Duas medidas, valendo o melhor desempenho.

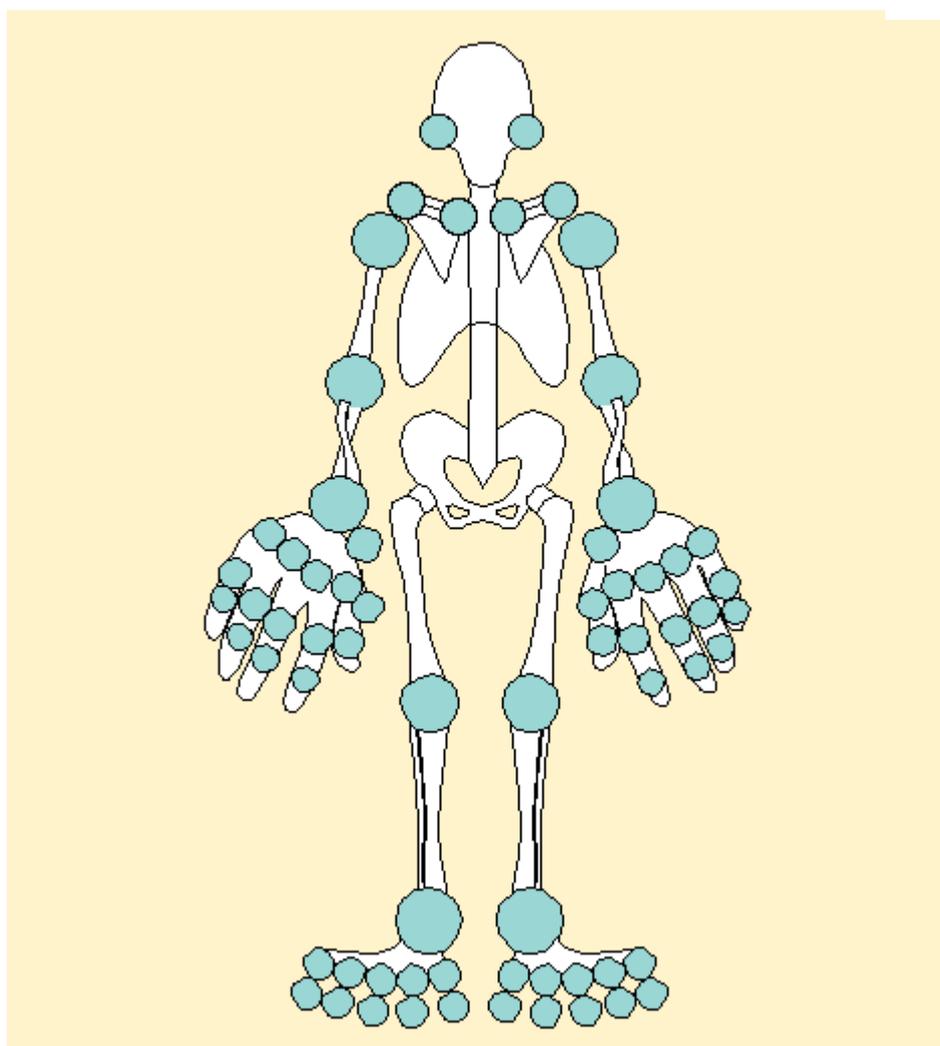
### **Rotação cervical**

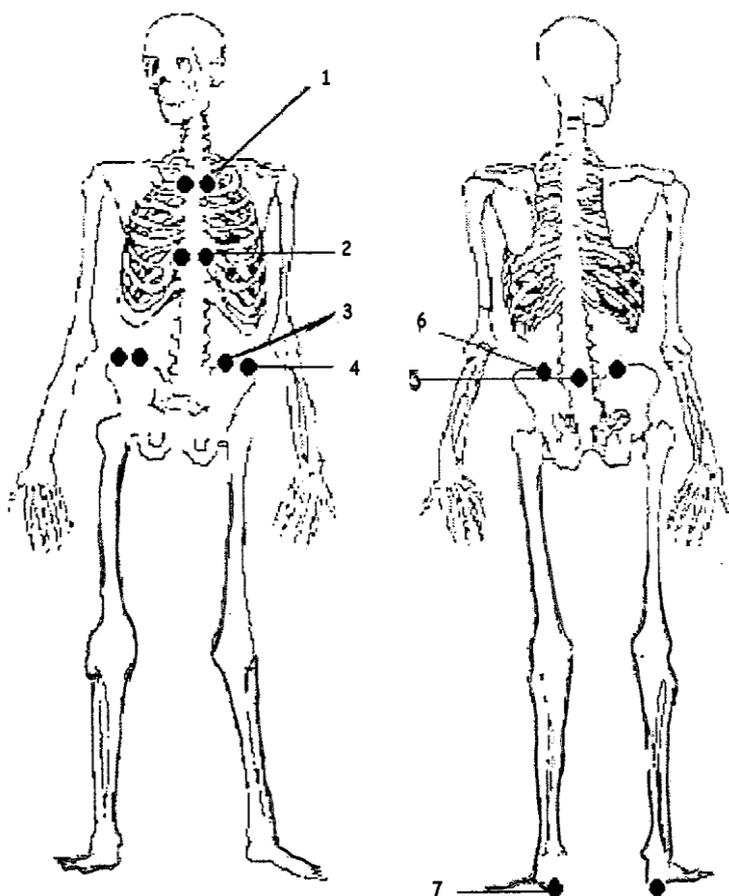
Medido com goniômetro. Coloca-se o goniômetro centralmente sobre a cabeça estando o paciente em posição supina. Pede-se ao paciente que gire a cabeça o máximo possível para a direita e para a esquerda. A média de ambos é o resultado final em graus.

**Contagem articular: número de articulações inflamadas (marcar  $\times$ )  
e dolorosas (marcar  $\pm$ )**

Articulações incluídas:

- esternoclaviculares
- acromioclaviculares
- temporomandibulares
- ombros, cotovelos, punhos
- coxofemorais, joelhos, tornozelos
- 10 metacarpofalangeanas
- 10 interfalangeanas proximais das mãos - 8 interfalangeanas distais das mãos
- 10 metatarsofalangeanas - 10 interfalangeanas proximais dos pés
- 8 interfalangeanas distais dos pés





### Índice MASES (Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesitis Score)

Locais marcados no manequim:

1. 1ª condrocostal direita/esquerda
2. 7ª condrocostal direita/esquerda
3. crista ilíaca direita/esquerda
4. espinha ilíaca ântero-superior direita/esquerda
5. processo espinhoso L5
6. espinha ilíaca póstero-superior direita/esquerda
7. inserção do tendão de Aquiles direita/esquerda

[Heuft-Dorenbosch L, Spoorenberg A, van Tubergen A, Landewe R, van der Tempel H, Mielants H, Dougados M, van der Heijde D. Assessment of enthesitis in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(2): 127-32.]

### Avaliação radiológica da coluna vertebral e coxofemurais: BASRI

<b>Articulações sacroilíacas (Critérios de New York)</b>		
Pontos	Grau	Descrição
0	0- Normal	Sem alterações
1	I- Possível	Sem anormalidades específicas
2	II- Leve	Indefinição dos limites da articulação e mínima esclerose ou erosões
3	III- Moderada	Esclerose definida, erosões e início de pontes ósseas ou sinostoses
4	IV- Grave	Fusão articular ou anquilose
<b><i>AP e lateral da coluna lombar e lateral da coluna cervical</i></b>		
Pontos	Grau	Descrição
0	0- Normal	Sem alterações
1	I- Possível	Sem anormalidades específicas
2	II- Leve	Qualquer número de erosões, quadraturas, escleroses com ou sem sindesmófitos em $\leq 2$ vértebras
3	III- Moderada	Sindesmófitos em $\geq 3$ vértebras com ou sem fusão comprometendo 2 vértebras
4	IV- Grave	Fusão comprometendo $\geq 3$ vértebras
<b><i>Coxofemorais</i></b>		
Pontos	Grau	Descrição
0	0- Normal	Sem alterações
1	I- Possível	Diminuição focal do espaço articular
2	II- Leve	Diminuição global do espaço articular $> 2$ mm
3	III- Moderada	Diminuição do espaço articular $\leq 2$ mm ou aposição de osso com osso com $< 1$ cm
4	IV- Grave	Deformidade do osso ou aposição osso com osso $\geq 1$ cm

**Aumentar os graus I e II em 1 ponto se 2 ou 3 das seguintes alterações nos ossos estão presentes: erosões, osteófitos ou protrusão.**

**BASRI – coluna = BASRI (sacroilíacas) + BASRI (AP e lateral da coluna lombar) + BASRI (lateral da coluna cervical). Máximo = 12.**

**BASRI – total = BASRI – coluna + BASRI (coxofemorais). Máximo= 16.**

**The Bath Ankylosing Spondylitis Radiology Index (BASRI). Arthritis Rheum 1998; 41(12): 2263-70.**

## **Avaliação da atividade da doença**

### **BASDAI ( Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index)**

É um índice combinado que avalia em uma escala de 0 a 10:

- A- Fadiga
- B- Dor axial
- C- Comprometimento articular periférico
- D- Entesopatia
- E- Rigidez matinal
- F- Duração da rigidez matinal

BASDAI – 0 = sem atividade, 10 = atividade máxima

[Calin A, Nakache JP, Gueguen M, Zeidler H, Mielants H, Dougados M. Defining disease activity in ankylosing spondylitis: is a combination of variables (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) an appropriate instrument? *J Rheumatol* 1999; 38(9): 878-82].

## **Avaliação da capacidade física**

### **BASFI ( Bath Ankylosing Spondylitis Function Index)**

É a média de 10 questões (em escala de 0 a 10) das quais 8 estão relacionadas com a capacidade física do paciente e 2 se referem à capacidade de realizar atividades na vida cotidiana.

[Calin A, Garrett S, Whitelock H, et al. A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Function Index. *J Rheumatol* 1994; 21: 2281-5]

## **Avaliação da dor**

### **Dor vertebral noturna**

Dor na coluna experimentada pelo paciente à noite durante a última semana.

0 = sem dor; 10 = dor muito intensa.

### **Dor vertebral total**

Dor na coluna experimentada pelo paciente ( dia e noite ) durante a última semana.

0 = sem dor; 10 = dor muito intensa.

O BASDAI contém 3 itens que avaliam a dor: item B mede o grau global de dor cervical, dorsal e lombar; o item C refere-se ao grau global de dor/edema em outras articulações e o item D está relacionado com o grau de desconforto que o paciente sente nas zonas dolorosas à palpação.

## **Avaliação da qualidade de vida**

### **ASQoL**

Instrumento específico para avaliar a qualidade de vida em pacientes com espondilite anquilosante. Consta de 18 itens baseados nas afirmações dos pacientes sobre seu estado.

[Doward LC, Spoorenberg A, Cook AS, Whalley D, et al. Development of the ASQoL: a quality of life instrument specific to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(1): 20-6].

### **Short-Format Health Survey-12**

O SF-12 é a versão reduzida do questionário de Saúde SF-36. A partir dos 12 itens são construídas 2 pontuações: a medida referente ao componente físico (mínima = 6 e máxima = 20) e a mental (mínima = 6 e máxima = 27). Valores mais altos indicam melhor qualidade de vida.

[Ware JE et al. A 12-Item Short-Forma Health Survey. Construction of scales and preliminary tests of reliability and validity. *Med Care* 1996; 34(3): 220-33]

### **Crítérios de melhora e remissão.**

**Melhora clínica** é definida como uma melhora relativa de pelo menos 20% e absoluta de pelo menos 10 unidades ( em uma escala de 0 a 100 mm ) em 3 dos seguintes domínios:

1. Avaliação global da doença pelo paciente em escala visual analógica (EVA) de 0 a 100, sendo 0 = ausente e 100 = muito intensa.
2. Avaliação da dor pelo paciente em EVA de 0 a 100 mm.
3. Avaliação da capacidade física com o índice BASFI (0 a 100 mm).
4. Avaliação da inflamação (0 = ausente, 100 = muito intensa) medida pela média dos itens do BASDAI relacionados com rigidez matinal.

e ausência de piora no domínio restante.

**Piora clínica** é considerada quando ocorre uma queda percentual igual ou superior a 20% ou 10 unidades em uma escala de 0 a 100 mm.

**Remissão clínica** é considerada se há um valor inferior a 20 mm em escala de 0 a 100 mm nos quatro domínios anteriores.

[Anderson JJ et al. Ankylosing Spondylitis Assessment Group Preliminary Definition of Short-Term Improvement in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis Rheum* 2001, 44 (8): 1876-86]

**1.ARQUIVO DE DADOS DE ESPONDILITE ANQUILOSANTE**DATA:    1ª VISITA:  REVISÃO: 

CENTRO: \_\_\_\_\_

MÉDICO INVESTIGADOR: \_\_\_\_\_

Cole a etiqueta

**DADOS DO PACIENTE**

TELEFONE: \_\_\_\_\_

CELULAR: \_\_\_\_\_

TELEFONE DE UM FAMILIAR: \_\_\_\_\_

SEXO: M  F DATA DE NASCIMENTO:   TRABALHA: NÃO  SIM  EM CASA  PROFISSÃO: \_\_\_\_\_

INCAPACIDADE LABORAL: 0) não 1) transitória 2) parcial 3) total

COR  1) Branca  2) Negra  3) Parda  4) Amarela  5) Outra EXERCÍCIO FÍSICO: NÃO  SIM  Horas por semana \_\_\_\_ANO\* DOS PRIMEIROS SINAIS/SINTOMAS DE SpA ( aparelho locomotor ): INDICAR QUAL (pode marcar mais de um): 1) lombalgia  2) dor nádegas 3) cervicalgia  4) coxalgia  5) artrite de MMII  6) artrite de MMSS 7) entesite  8) dactilite 

ANO\* DO PRIMEIRO EPISÓDIO DE AFECÇÃO EXTRA-ARTICULAR: (\*se é desconhecido=9999)

1) uveíte  2) doença inflamatória intestinal  3) psoríase  4) uretrite CRITÉRIOS DO ESSG\*\* (marque com um X)  
um X)

MANIFESTAÇÕES ASSOCIADAS (marque com um X)

Anterior ou atual	sim	?	Anteriores ou atuais (com diagnóstico)	sim	?
1A- dor axial inflamatória**			1- irite/uveíte anterior		
2A- sinovite assimétrica ou predominantemente em MMII			2- dactilite		
1B- história familiar positiva			3- pustulose palmo-plantar		
2B- psoríase			4- acne conglobata		
3B- doença inflamatória intestinal			5- balanite		
4B- uretrite, cervicite, diarreia no mês anterior à artrite			6- prostatite		
5B- dor alternante nas nádegas			7- comprometimento cardíaco		
6B- entesopatia			8- comprometimento renal		
7B- sacroiliíte			9- comprometimento do sistema nervoso		
			10- comprometimento pulmonar		
			11- comprometimento ungueal		