

**João Paulo dos Santos**

**AVALIAÇÃO DO INFILTRADO DE MACRÓFAGOS NA PAREDE  
ARTERIAL DE PACIENTES COM ARTERITE DE TAKAYASU**

Dissertação apresentada a Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

São Paulo  
2019

**João Paulo dos Santos**

**AVALIAÇÃO DO INFILTRADO DE MACRÓFAGOS NA PAREDE  
ARTERIAL DE PACIENTES COM ARTERITE DE TAKAYASU**

Dissertação apresentada a Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

Orientador:  
Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva de  
Souza

Coordenador:  
Prof. Dr. Charles Helden de Moura  
Castro

São Paulo

2019

Santos, João Paulo dos

**Avaliação do infiltrado de macrófagos na parede arterial de pacientes com arterite de Takayasu** / João Paulo dos santos. – São Paulo, 2019.

x, 102f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Aplicadas à Reumatologia.

Título em inglês: Evaluation of the macrophage infiltrate in the arterial wall of patients with Takayasu's arteritis.

1. Arterite de Takayasu. 2. Macrófagos. 3. Imunidade inata. 4. Células T. 5. Atividade da doença.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**  
**Aplicadas à Reumatologia**

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Ana Luisa Godoy Fernandes

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação: Prof. Dr. Charles Helden de Moura  
Castro

**João Paulo dos Santos**

**AVALIAÇÃO DO INFILTRADO DE MACRÓFAGOS NA PAREDE  
ARTERIAL DE PACIENTES COM ARTERITE DE TAKAYASU**

**Presidente da banca:**

Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva de Souza

**Banca examinadora:**

Profa. Dra. Ana Luísa Garcia Calich

Prof. Dr. Cristóvão Luis Pitangueiras Mangureira

Prof. Dr. Ricardo Artigiani Neto

**Suplente:**

Profa. Dra. Karina Ramalho Bortoluci

***“Nunca é tarde para tentar o desconhecido, nunca é tarde para ir mais além.”***

**(Gabrielle D’ Annunzio)**

## **Dedicatória**

Aos meus pais Cícero José Barbosa dos Santos (in memoriam) e Girleide dos Santos por todo o amor, exemplo e confiança.

## **Agradecimentos**

Ao **Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva de Souza** - Cordenador do Setor de Vasculites da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Escola Paulista de Medicina (EPM), por ser exemplo de professor, na mais completa acepção da palavra. Quis a gentileza de Dr. Alexandre honrar-me com o privilégio de escrever a dissertação “Avaliação do infiltrado de macrófagos na parede arterial de pacientes com arterite de Takayasu” que ora vem a público.

Aos meus irmãos, **Guilherme, Ademir, Ramon, Bianca e Theonice** por terem me ensinado a amizade.

A **Aline Martinez Pieroni**, que ao longo de nossas vidas, proporcionou-me a melhor das felicidades, e que acompanha em mais esta etapa dando “apoio e refúgio” nas horas em que mais precisei.

A **Deusdete Bispo, Zezé Bispo, Zelito, Aita, Névio Pieroni, Clotilde Martinez, Juliana Martinez Pieroni, Lívia Martinez Pieroni, Eduardo M. Motta, Filipe Freire de Mattos, Juliana Bispo, Bruno Valentim, Valmir Bispo, Neuza Bispo**, por todo carinho, paciência e apoio em São Paulo. Muito obrigado!

A **José Carlos Tamashiro**, pela amizade, apoio e incentivo em todos os momentos.

Aos amigos pós-graduandos da Unifesp, em especial, **Bruna Savioli Lopez Fernandez, Joice Moraes Faria Monteiro Belém, Frederico Pinheiro, Mariana Freitas, Cíntia Maso, Washington Oliveira, Céu Tristão e Talita Cardoso Gazzito**, pela amizade, apoio científico, humano e profissional.

A **Eni Pavan** pela atenção, assistência e carinho durante a minha trajetória na Disciplina de Reumatologia.



Aos integrantes do laboratório: **Maria Teresa Costa, Rogério Quintiliano Amaral e Silvia Helena** pela convivência e colaboração.

Aos integrantes do laboratório de Patologia do Incor FMUSP, do Departamento de Patologia da Unifesp-EPM, cuja ajuda foi imprescindível na realização deste trabalho.

Aos integrantes do Departamento de Patologia Clínica e Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein, pelas experiências durante este caminho, além de toda dedicação, auxílio, paciência e disposição em me ajudar a qualquer momento nos exames de imunohistoquímica.

Ao **CAPES** pelo auxílio financeiro durante o período do curso de pós-graduação.

## Sumário

Banca examinadora	
Epígrafe	
Dedicatória	
Agradecimentos	
Sumário.....	i
Lista de Figuras .....	iii
Lista de Tabelas .....	iv
Lista de Quadros .....	v
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	vi
Resumo .....	vii
Abstract.....	ix
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1 Mikito Takayasu.....	12
1.2 Arterite de Takayasu .....	12
1.3 Fisiopatologia da arterite de Takayasu.....	13
1.4 Manifestações clínicas da arterite de Takayasu.....	16
1.5 Diagnóstico da arterite de Takayasu.....	18
1.6 Atividade de doença na arterite de Takayasu.....	20
1.7 Macrófagos.....	22
<b>2 HIPÓTESE .....</b>	<b>27</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>29</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
4.1 Objetivo Geral .....	32
4.2 Objetivos Específicos .....	32
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
5.1 Pacientes e controles .....	34

5.2	Implicações éticas .....	34
5.3	Variáveis do estudo .....	34
5.4	Imunohistoquímica .....	35
5.5	Análise estatística .....	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
6.1	Pacientes e controles .....	45
6.2	Características da arterite de Takayasu .....	45
6.3	Comparação da imunexpressão de cada marcador celular entre os grupos do estudo .....	46
6.4	Marcadores celulares na arterite de Takayasu .....	49
6.5	Localização do infiltrado de macrófagos na aorta de pacientes com arterite de Takayasu .....	50
6.6	Infiltrado inflamatório na parede da aorta e parâmetros clínicos e histológicos na arterite de Takayasu .....	52
6.7	Influência da terapia com prednisona e a imunexpressão de cada marcador celular na parede da aorta de pacientes com arterite de Takayasu .....	54
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

## **ANEXOS**

## Lista de Figuras e Quadros

Figura 1	Campos de análise da imunoexpressão de marcadores na parede da aorta .....	38
Figura 2	Imunohistoquímica da parede da aorta de paciente com arterite de Takayasu .....	39
Figura 3	Células gigantes multinucleadas em paciente com arterite de Takayasu .....	40
Figura 4	Macrófagos na adventícia da aorta torácica na arterite de Takayasu .....	41
Figura 5	Imunohistoquímica da parede da aorta de paciente com doença aterosclerótica .....	42
Figura 6	Imunohistoquímica da parede da aorta de indivíduo do grupo controle .....	42
Figura 7	Comparação entre os grupos quanto à imunoexpressão de marcadores de macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células NK na aorta .....	48
Figura 8	Imunoexpressão de marcadores celulares na aorta de pacientes com arterite de Takayasu .....	49
Figura 9	Comparação entre subpopulações de macrófagos na aorta de pacientes com arterite de Takayasu .....	50
Figura 10	Marcadores de macrófagos e camadas da parede da aorta .....	51
Figura 11	Linfócitos T e atividade histológica na arterite de Takayasu .....	53
Figura 12	Influência da prednisona na imunoexpressão de CD3 na aorta de pacientes com arterite de Takayasu .....	55

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Dados demográficos e aorta avaliada em participantes do estudo	45
Tabela 2	Informações sobre atividade de doença e terapia em pacientes com arterite de Takayasu .....	46
Tabela 3	Imunoexpressão de marcadores celulares entre grupos participantes do estudo .....	47
Tabela 4	Imunoexpressão de marcadores de macrófagos nas diferentes camadas da parede da aorta de pacientes com arterite de Takayasu .....	50
Tabela 5	Infiltrado inflamatório na aorta e atividade clínica em pacientes com arterite de Takayasu .....	52
Tabela 6	Atividade histológica e marcadores celulares em pacientes com arterite de Takayasu .....	53
Tabela 7	Marcadores celulares e lesões ateroscleróticas em pacientes com arterite de Takayasu .....	54
Tabela 8	Terapia com prednisona e marcadores celulares na aorta de pacientes com arterite de Takayasu .....	55

## Lista de Quadros

Quadro 1	Critérios de classificação do ACR para arterite de Takayasu de 1990 .....	19
Quadro 2	Critérios de Ishikawa modificados por Sharma para o diagnóstico de arterite de Takayasu .....	20
Quadro 3	Critérios de Kerr et al para avaliar atividade de doença na arterite de Takayasu .....	21
Quadro 4	Anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica .....	36

## Lista de Abreviaturas

<b>ACR</b>	<i>American College of Rheumatology.</i>
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AT</b>	Arterite de Takayasu
<b>BAFF</b>	Fator de ativação das células
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation (designação de grupos)</i>
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitário humano
<b>HSP</b>	Proteínas de choque tóxico
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IGF</b>	Fator de crescimento semelhantes à insulina
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MICA</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe I Moléculas Relacionadas à Cadeia A
<b>MMP</b>	Metaloproteinases de matriz
<b>NK</b>	Natural killer
<b>PCR</b>	Proteína C reativa
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformante $\beta$
<b>TLR</b>	Receptores do tipo Toll
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UNIFESP- EPM</b>	Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular
<b>VHS</b>	Velocidade de hemossedimentação

## Resumo

**Introdução** – A arterite de Takayasu (AT) é uma vasculite sistêmica de etiologia desconhecida que afeta grandes artérias, como a aorta e seus principais ramos. O infiltrado inflamatório da parede arterial é composto por macrófagos, células gigantes multinucleadas, células NK (natural killer), neutrófilos e linfócitos T CD4+, linfócitos CD8+ e linfócitos T  $\gamma\delta$ . Não há estudos avaliando os fenótipos de macrófagos presentes no infiltrado inflamatório da parede arterial em pacientes com AT.

**Objetivos** – O objetivo primário foi avaliar qual fenótipo dos macrófagos M1 / M2 é predominante no infiltrado inflamatório na aorta de pacientes com AT. Os objetivos secundários foram: comparar a frequência de macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e de células NK na aorta de pacientes com AT, indivíduos com doença aterosclerótica (DA) da aorta e doadores cadavéricos (DC) de transplante cardíaco descrever a localização preferencial da infiltrado de macrófagos nas camadas da parede da aorta em pacientes com AT e analisar associações entre a frequência de macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células NK na aorta com atividade clínica de doença, atividade histológica, lesões ateroscleróticas e uso de prednisona.

**Material e Métodos** – Foi realizado estudo transversal utilizando a técnica de imunohistoquímica para avaliar a imunoexpressão de CD68 (macrófagos), CD3 (linfócitos T), CD20 (linfócitos B), CD56 (células NK) e de CD86 e CD206, marcadores de macrófagos M1 e M2 em infiltrados inflamatórios na aorta de pacientes com AT (n = 22), AD (n = 9) e DC (n = 8).

**Resultados** – A aorta torácica foi avaliada em 86,4% dos pacientes com AT, em 77,8% dos pacientes com DA e em 100% dos DC. A aorta abdominal foi avaliada nos demais casos. O procedimento cirúrgico foi realizado no momento do diagnóstico em 54,5% dos pacientes com AT. Atividade clínica da doença foi observada em 54,5% dos casos, atividade histológica em 40,9% e lesões ateroscleróticas em 27,3% dos pacientes com AT. Apenas 36,3% dos pacientes com AT estavam em terapia com glicocorticoides, imunossuppressores e/ou agentes biológicos. A frequência de macrófagos, macrófagos M1, linfócitos T, linfócitos B e de células NK foi significativamente maior na aorta de pacientes com AT e DA em relação a DC, mas não houve diferença entre os grupos em relação ao macrófago M2. Macrófagos e linfócitos T foram as células mais frequentemente



encontradas na aorta de pacientes com AT, enquanto os macrófagos M2 foram mais frequentes que os M1. Não foram observadas diferenças significativas quanto a imunoexpressão de marcadores de macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e de células NK quanto a atividade de doença ou quanto à presença de lesões ateroscleróticas concomitantes na AT. A frequência de linfócitos T é significativamente maior em pacientes com atividade histológica da AT, em comparação àqueles que apresentam apenas lesões fibróticas, mas nenhuma diferença foi observada quanto a frequência de macrófagos e de suas subpopulações. O uso de prednisona se associou a menor frequência de linfócitos T na aorta de pacientes com AT. **Conclusões** – Os macrófagos M2 são mais frequentes na parede da aorta de pacientes com AT, em relação aos macrófagos M1. Macrófagos e linfócitos T são as células mais encontradas no infiltrado inflamatório na aorta de pacientes com AT. Atividade histológica se associa a maior frequência de linfócitos T, enquanto o uso de prednisona leva à redução significativa de linfócitos T na parede arterial de pacientes com AT.

**Palavras-chave** – Arterite de Takayasu, macrófagos, imunidade inata, linfócitos T, atividade de doença.

## Abstract

**Introduction** – Takayasu's arteritis (TA) is a systemic vasculitis of unknown etiology that affects large arteries, such as the aorta and its main branches. The inflammatory infiltrate of the arterial wall consists of macrophages, multinucleated giant cells, natural killer (NK) cells, neutrophils and CD4+ T cells, CD8+ T cells and  $\gamma\delta$  T cells. No studies have evaluated macrophage phenotypes present in the inflammatory infiltrate of the arterial walls in patients with TA. **Objective** – The primary aim of this study was to evaluate which macrophage phenotype is predominant in the inflammatory infiltration in the aorta of patients with TA. Secondary study aims were to compare the frequency of macrophages, T cells, B cells and NK cells in the aorta from TA patients, patients with atherosclerotic disease (AD) and heart transplant donors (HTD); to describe the predominant localization of macrophages in the aorta from TA patients; to analyze associations between infiltration of macrophages and T cells, B cells and NK cells in the arterial wall and clinical disease activity, histological disease activity, concomitant atherosclerotic lesions and prednisone use. **Materials and Methods** – We performed a cross-sectional study using immunohistochemistry to evaluate the expression of macrophages (CD68), T cells (CD3), B cells (CD20), NK cells (CD56), as well as M1 (CD86) and M2 (CD206) macrophages in inflammatory infiltration in the aorta from TA patients (n = 22), patients with AD of the aorta (n = 9) and HTD (n = 8). **Results** – The thoracic aorta was assessed in 86.4% of TA patients, in 77.8% of patients with atherosclerotic disease and in 100% of HTD. The abdominal aorta was evaluated in remainder. The surgical procedure was performed at the time of diagnosis in 54.5% of patients with TA. Clinical activity of the disease was observed in 54.5% of cases, histological activity in 40.9% and atherosclerotic lesions in 27.3% of patients with TA. Only 36.3% of the patients with TA were on glucocorticoid, immunosuppressive and/or biologic agents. The frequency of macrophages, M1 macrophages, T cells, B cells and NK cells was higher in the aorta from TA and AD patients compared with HTD, but no differences were found among all groups for M2 macrophages. In TA, macrophages and T cells were the most abundant cells in the aorta while M2 macrophages were more frequently found than M1 macrophages. No differences were found concerning macrophages,

T cells, B cells or NK cells between TA patients presenting active disease and those in remission nor between TA patients with and without concomitant atherosclerotic lesions in the aorta. T cells were more frequent in the aorta of TA patients with active disease based on histological evaluation compared with those presenting chronic fibrotic lesions, but no differences were found in the expression of macrophage markers. The use of prednisone was associated with a significantly lower T cell count in the aorta of TA patients whereas no differences were observed for other cell markers. **Conclusions** – M2 macrophages are more frequently found in the aorta of TA patients than M1 macrophages. Macrophages and T cells are the most frequent cells in the inflammatory infiltrate in the aorta of TA patients. T cells were associated with histological disease activity and with prednisone use in TAK but not macrophages.

**Keywords** – Takayasu arteritis, macrophages, innate immunity, T cell, disease activity.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## **1.1 Mikito Takayasu**

Mikito Takayasu (nascido em Saga, no Japão no dia 19 de julho de 1860 e falecido em Beppu, no Japão, dia 20 de novembro de 1938) foi um oftalmologista japonês, creditado como o primeiro a descrever a arterite de Takayasu (AT) em 1908, quando apresentou um caso no 12º Encontro Anual da Sociedade de Oftalmologia do Japão, realizado em Fukuoka (1). Mikito Takayasu formou-se médico na Universidade Imperial de Tóquio em 1887 e trabalhou como professor de oftalmologia na Faculdade de Medicina em Kanazawa (1,2).

Mikito Takayasu fixou-se na Alemanha por dois anos, onde não cessou de realizar pesquisas no Hospital da Cidade de Berlim, no Hospital Universitário Charité de Berlim e na Universidade de Leipzig. Em Berlim, Mikito Takayasu estudou com o oftalmologista Albrecht von Graefe (1828–1870) e mostrou que o arcus senilis ocorre devido à deposição de gordura na íris. Em seguida, Mikito Takayasu estabeleceu-se em Kanazawa e obteve seu doutorado em 1903 por seu trabalho nesse campo (1,3).

Mikito Takayasu foi professor e diretor da Universidade de Kanazawa. Em 1924, se aposentou da Universidade e abriu sua própria clínica perto do Hospital Universitário. Em 1933, sofreu derrame e mudou-se para Beppu no Japão para recuperação, onde morreu de câncer retal quando tinha 78 anos de idade (1).

## **1.2 Arterite de Takayasu**

A arterite de Takayasu (AT) é uma vasculite sistêmica, que afeta grandes vasos, principalmente a aorta, seus ramos primários e artérias pulmonares, acometendo majoritariamente indivíduos jovens do sexo feminino (4,5). A AT é uma doença crônica, de evolução frequentemente recidivante e com lesões vasculares progressivas do tipo estenose, oclusão, dilatação e aneurisma, que geralmente levam às manifestações clínicas da doença e à alta morbidade (6).

O início das manifestações da AT geralmente ocorre entre 20 e 30 anos de idade e, em todos os grupos populacionais, observa-se predominância de acometimento da doença no sexo feminino (7). Tal predominância feminina é elevada na Turquia e no norte da Europa, observando-se relação sexo feminino:masculino (F:M) de 12:1 e 11:1, respectivamente (8,9). Porém, a predominância feminina diminui em outros países como Japão (9:1), Brasil e França (5:1) e chega até a 3:1 na China

e no Irã (10–14). Em países como a Índia e Israel, a predominância do sexo feminino na AT é muito pequena em relação ao masculino: 1,6:1,0 e 1,8:1,0, respectivamente (15,16).

A AT é encontrada em todos os grupos populacionais, sendo mais frequente no Japão, onde a prevalência estimada é de 40 casos por milhão de habitantes (17). Em diferentes países, a prevalência da AT varia entre 4,7 a 14,7 casos/milhão de habitantes, enquanto sua incidência varia de 0,3 a 3,0 casos/milhão de habitantes por ano (7).

### **1.3 Fisiopatologia da arterite de Takayasu**

Não há uma causa etiológica definida para a AT, acredita-se que haja interação entre predisposição genética do indivíduo, associada à exposição a gatilhos ambientais (18). O principal locus de susceptibilidade para a AT é o alelo do antígeno de histocompatibilidade HLA-B\*52:01, que mantém associação significativa em estudos de GWAS (Genome Wide Association Studies) em diferentes grupos étnicos de pacientes com AT (19). Entretanto, associações isoladas entre AT e outros genes

em diferentes grupos populacionais, foram descritas para outros alelos do locus B e também para o locus C e para o HLA classe II, especialmente os genes HLA-B\*67:01 em japoneses, HLA-B\*13:02 em turcos, europeus e americanos, HLA-Cw\*12:02 em japoneses, turcos e descendentes europeus e americanos, além do HLA-DRB1\*07 em pacientes chineses com AT (20–23). Outros genes fora do HLA foram encontrados como de susceptibilidade para o desenvolvimento da AT incluindo genes que codificam reguladores da resposta imune celular, citocinas pró-inflamatórias e mediadores da resposta humoral: RPS9/LILRB3, IL12B, IL6 e FCGR2A/FCGR3A (19,21).

Há várias hipóteses sobre a contribuição de agentes infecciosos para a patogênese da AT, mas até o momento, nenhuma evidência contundente foi observada quanto à associação entre agentes infecciosos específicos e AT (24). A tuberculose foi a infecção mais frequentemente dita como gatilho para a AT, devido à natureza granulomatosa das lesões inflamatórias arteriais, a maior frequência de tuberculose latente na AT em relação a controles saudáveis e a maior prevalência de AT em países endêmicos para a tuberculose pulmonar (18,24). Entretanto, quando se

avaliou tuberculose latente pelo Quantiferon TB-Gold Test e pelo teste intradérmico do PPD (Purified Protein Derivative), nenhuma diferença foi encontrada entre pacientes com AT e controles (25), além disso, não foram detectadas micobactérias em artérias ou no sangue periférico de pacientes com AT por diferentes métodos, incluindo a pesquisa direta, cultura para micobactérias e métodos de biologia molecular (26,27).

A AT é uma pan-arterite com processo inflamatório granulomatoso, distribuído preferencialmente nas camadas média e adventícia de artérias acometidas, na forma de lesões focais ou “skip lesions” (28). Uma grande variedade de tipos celulares foi descrita na parede arterial de pacientes com AT, incluindo macrófagos, células gigantes multinucleadas, neutrófilos, células NK, linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos T  $\gamma\delta$ , linfócitos B e células dendríticas (29,30). A *vasa vasorum* é considerada a porta de entrada para o processo inflamatório arterial que, por sua vez, pode levar à hipertrofia da parede da artéria, hiperplasia da camada íntima, destruição de fibras musculares lisas, neovascularização e deposição de fibras colágenas na parede arterial (31). O processo inflamatório arterial pode resultar em estenose ou oclusão da luz do vaso acometido ou em dilatação arterial ou até na formação de aneurismas. A dilatação arterial ocorre pela ação de metaloproteinases e espécies reativas de oxigênio em artérias elásticas, levando à elastofagia (fragmentação de fibras elásticas) e também pode ser secundária à necrose laminar e à perda de fibras musculares lisas (18,29,31).

O aumento da imunoexpressão da Heat-Shock Protein (HSP) de 65kDa na média e na *vasa vasorum* da aorta pode ser um dos primeiros eventos observados na patogenia da AT (32). A HSP-65 é alvo para células citotóxicas como células NK, linfócitos T  $\gamma\delta$  e linfócitos T citotóxicos, que por sua vez, induzem apoptose de células alvo pela interação da molécula MICA (Major Histoconpatibility Class I Chain-Related A) com o receptor NKG2D. Ambos MICA e o receptor NKG2D têm imunoexpressão aumentada na aorta de pacientes com AT. A imunoexpressão de outras moléculas indutoras de apoptose, como Fas/FasL e 4-1BB/4-1BBL também está aumentada na aorta de pacientes com AT, o que também indica dano arterial em potencial, induzido por células citotóxicas. Além disso, há aumento na imunoexpressão de moléculas co-estimuladoras, envolvidas principalmente na ativação de linfócitos T, como CD80, CD86, CD40, CD27L, CD30L e OX40L na aorta de pacientes com AT (33).

Outra via que, em teoria, poderia dar início ao processo inflamatório arterial na AT é a interação entre receptores Toll-like (TLR) e seus ligantes. Diferentes padrões de imunexpressão de TLR foram descritos em diferentes leitos arteriais de pacientes com vasculites de grandes e médios vasos, incluindo AT, arterite de células gigantes e poliarterite nodosa. Os TLR2 e TLR4 são encontrados de forma ubíqua em todas as artérias avaliadas, enquanto os TLR7 e TLR9 são observados com menor frequência. Porém, padrões seletivos de distribuição em leitos arteriais são observados para os seguintes TLRs: TLR1, TLR3, TLR5, TLR6 e TLR8, ou seja, são encontrados de forma restrita em algumas artérias, enquanto outras não apresentavam nenhuma imunexpressão (34).

Além das evidências de participação de células citotóxicas, majoritariamente da imunidade inata, na patogênese da AT, também há evidências da participação da imunidade adaptativa, especialmente de linfócitos T. Células T CD4+ e CD8+ estão presentes no infiltrado inflamatório da parede arterial na AT (32). Linfócitos T CD4+, quando expressam o fenótipo Th1, produzem interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) que, por sua vez, atua na ativação de macrófagos, no estímulo à formação do granuloma e no desenvolvimento de células gigantes multinucleadas (35). O fenótipo Th17 de linfócitos T CD4+ produz diferentes citocinas, entre elas a interleucina (IL)-17A, IL-17F e IL-21, que induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, a ativação de neutrófilos, produção de quimiocinas que atraem monócitos e neutrófilos aos sítios inflamatórios e aumentam a imunexpressão de moléculas de adesão em células endoteliais (36).

Na AT, o estímulo de células mononucleares do sangue periférico leva a maior produção de citocinas envolvidas na resposta Th1 e Th17, como a IL-12, IFN $\gamma$ , IL-6 e IL-17A, em relação a controles saudáveis e a controles com outras formas de vasculite. Além disso, células CD4+, isoladas de controles saudáveis, produzem altas concentrações de IFN $\gamma$  e de IL-17A em meio de cultura, quando estimuladas com o soro de pacientes com AT em atividade de doença. No infiltrado inflamatório da parede arterial de pacientes com AT, linfócitos T expressam as citocinas IFN $\gamma$ , IL-6 e IL-17A (37). Esses achados indicam a participação das respostas Th1 e Th17, contribuindo para a inflamação arterial na AT.

A concentração sérica de diferentes citocinas tem sido avaliada como biomarcadores da doença ou de atividade de doença na AT em diferentes estudos. A



IL-6 e a IL-18 são as citocinas mais associadas, de forma consistente, ao diagnóstico de AT e à atividade de doença, quando seus níveis séricos são medidos. Porém, níveis séricos de outras citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF) $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-4, IL-12 e IL-23 não são bons biomarcadores na AT (38). Pacientes com AT em remissão e maior extensão do comprometimento arterial ou com histórico de eventos arteriais isquêmicos, apresentam maiores níveis séricos de citocinas que fazem parte da resposta Th17, o que indica a presença de processo inflamatório arterial subclínico em pacientes assintomáticos com perfil predominantemente Th17 (39).

Há, ainda, evidências da participação do braço humoral da imunidade na fisiopatologia da AT. Diversos tipos de autoanticorpos já foram descritos em pacientes com AT, incluindo anticorpos anticélulas endoteliais, antiaorta, antiferritina, antianexina V e anticorpos antimonócitos (40,41). Porém a detecção de tais autoanticorpos não tem utilidade na prática clínica (40). O B-cell activating factor (BAFF) é uma citocina que faz parte da superfamília do TNF e tem papel importante na ativação, proliferação e diferenciação de células B (42). Pacientes com AT em atividade apresentam níveis séricos de BAFF significativamente mais elevados em relação a controles saudáveis e tais níveis diminuem significativamente, quando a remissão da doença é alcançada (43). Outro argumento que fala a favor da participação do braço humoral da imunidade na fisiopatologia da AT é a observação de maior número de plasmablastos recém-formados circulantes no sangue periférico, em pacientes com AT em atividade em relação a controles saudáveis, porém com número semelhante ao observado no lúpus eritematoso sistêmico (44).

#### **1.4 Manifestações clínicas da arterite de Takayasu**

A apresentação clínica da AT é variável e depende dos leitos da árvore arterial acometidos pelo processo inflamatório. As manifestações da AT podem ser divididas em sintomas constitucionais, manifestações musculoesqueléticas, dor vascular, manifestações vasculares e manifestações extravasculares da doença (5).

##### **Sintomas constitucionais:**

Estão presentes ao diagnóstico e em fases de atividade de doença em até 43% dos casos. Os sintomas constitucionais incluem febre, inapetência, perda de peso, fadiga e mal-estar (4,45).

**Manifestações musculoesqueléticas:**

Manifestações como artralguas e mialguas são comumente observadas em pacientes com AT que apresentam sintomas constitucionais, em fases de atividade de doença. Sua frequência descrita é de até 53% dos casos (4).

**Manifestações vasculares:**

Praticamente todos os pacientes com AT apresentam manifestações vasculares, essas manifestações variam de acordo com as artérias acometidas. A dor em trajetos vasculares é manifestação típica da doença e pode ser observada em aproximadamente um terço dos pacientes, especialmente naqueles com a doença ativa. A principal forma de dor vascular observada é a carotidínea, mas também pode-se observar dor torácica ou dor abdominal inespecíficas (4,5,46).

Dor tipo claudicação intermitente, principalmente envolvendo membros superiores, é comumente observada na AT, devido à alta frequência de envolvimento de artérias subclávias, com estenose ou oclusão arterial. Outra complicação observada pelo envolvimento subclávio é a síndrome do roubo de fluxo da subclávia, que ocorre devido ao fluxo sanguíneo retrógrado em artérias vertebrais para suprir colaterais que irrigam o membro superior afetado pela estenose/occlusão de artéria subclávia. A síndrome do roubo de fluxo da subclávia se manifesta por sintomas de isquemia vertebrobasilar do tronco encefálico, com tonturas, ataxia, diplopia, nistagmo e até síncope (5,45).

Estenoses vasculares podem levar à redução ou ao desaparecimento de pulsos periféricos, sopros vasculares e à diferença de pressão arterial entre membros. Outra manifestação vascular observada na AT é a hipertensão renovascular devido a estenose em artéria(s) renal(ais). Angina abdominal também pode ser observada, devido à estenose ou oclusão de artérias viscerais, como artérias mesentéricas superior e inferior, além do tronco celíaco (4,46).

**Manifestações extravasculares:**

Manifestações extra-vasculares envolvendo a pele, coração e rins já foram descritas na AT (47,48). Na pele, vasculite granulomatosa, vasculite necrosante ou paniculite podem levar ao desenvolvimento de nódulos eritematosos de membros inferiores, lesões semelhantes às do pioderma gangrenoso, eritema induratum, lesões papulares ou até mesmo ulcerativas (49). Outras manifestações extravasculares da

AT incluem amiloidose renal, pericardite e miocardite (47).

**Complicações:**

As lesões arteriais da AT podem levar ao desenvolvimento de complicações que têm impacto no prognóstico, devido a disfunção de órgãos alvo. Recidivas da doença podem levar ao acometimento progressivo de leitos vasculares, o que gera o acometimento de novos órgãos e sistemas (6). As principais complicações da doença são dilatação da raiz da aorta com insuficiência aórtica, hipertensão arterial sistêmica grave, retinopatia da AT, acidente vascular encefálico, insuficiência renal e insuficiência cardíaca (50).

### **1.5 Diagnóstico da arterite de Takayasu**

Na prática diária, o diagnóstico de AT é suspeitado quando paciente jovem, frequentemente do sexo feminino, apresenta manifestações vasculares sugestivas do envolvimento de grandes artérias, com ou sem sintomas constitucionais e carotidínea. As manifestações clínicas são geralmente associadas a alterações de provas inflamatórias, como a velocidade de hemossedimentação (VHS) e a proteína C reativa (PCR) (48). O diagnóstico de AT deve ser confirmado com exames de imagem, principalmente exames não invasivos, que incluem angio ressonância magnética (angioRM), angio tomográfica computadorizada (angioTC) e ultrassom Doppler arterial, principalmente de artérias carótidas e vertebrais (5). A arteriografia convencional é reservada para guiar procedimentos vasculares ou para quando há dúvidas sobre alterações vasculares observadas por outros métodos de imagem. As alterações vasculares observadas na AT incluem espessamento concêntrico da parede arterial e lesões focais como estenose, oclusão, ectasias ou aneurismas em artérias de grande calibre (51). O papel da tomografia por emissão de pósitrons (PET) com 18F-FDG (fluorodesoxiglicose) associado ou não à TC ainda não está bem estabelecido para o diagnóstico da AT. Porém, a detecção de áreas de metabolismo aumentado na parede do vaso parece ter alguma relação com atividade da doença na AT (52).

Até o ano de 1988, não existiam critérios de diagnóstico ou de classificação para AT (53). Os primeiros critérios de diagnóstico foram elaborados por Ishikawa et al no Japão. Esses critérios incluem a idade de início de manifestações da doença,

parâmetros clínicos, laboratoriais e angiográficos, divididos em critério obrigatório (idade  $\leq 40$  anos), dois critérios maiores e nove critérios menores. Os critérios de Ishikawa *et al* apresentaram sensibilidade de 84% e especificidade de 100% (54). Posteriormente, em 1990, foram desenvolvidos os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) para AT, para serem utilizados na inclusão de pacientes em estudos de epidemiologia e terapêutica. Para se classificar o paciente como AT, é necessária a presença de 3 dos 6 critérios abaixo, com sensibilidade de 90,5% e especificidade de 97,8% (Quadro 1) (55).

**Quadro 1** – Critérios de classificação do ACR para arterite de Takayasu de 1990 (55).

<b>Critérios</b>
Idade de início da doença < 40 anos
Claudicação de extremidades
Diminuição do pulso da artéria braquial
Diferença de pressão arterial > 10mmHg nos membros superiores
Sopro na artéria subclávia ou na aorta
Alterações arteriográficas típicas

ACR: *American College of Rheumatology*; a presença de três ou mais dos seis critérios permite classificar o paciente com AT.

Entretanto, em países como a Índia, onde pacientes com AT apresentam envolvimento predominante da aorta, a sensibilidade dos critérios de diagnóstico de Ishikawa *et al* e de classificação do ACR cai para 60,4% e 77,4%, respectivamente (53). Em 1995, Sharma *et al* propuseram modificações nos critérios de Ishikawa *et al* para melhorar a sensibilidade para o diagnóstico de AT em pacientes com envolvimento predominante da aorta. Nos critérios de diagnóstico de Ishikawa modificados por Sharma *et al*, foi retirado o critério obrigatório (idade  $\leq 40$  anos), foram acrescentadas manifestações típicas da doença como critérios maiores, foi removida a idade na definição de hipertensão, foi excluída a ausência de lesões aortoilíacas e foram incluídas lesões coronarianas em pacientes com menos de 30 anos, na ausência de fatores de risco (Quadro 2). O diagnóstico de AT é firmado quando dois

critérios maiores estão presentes ou na presença de um critério maior e dois menores ou até na presença de quatro critérios menores. A sensibilidade e a especificidade desse critérios são de 92,5% e 95,0% (56).

**Quadro 2** – Critérios de Ishikawa modificados por Sharma para o diagnóstico de arterite de Takayasu [adaptado de (56)].

<b>Critérios</b>
<i>Critérios maiores</i>
Lesão do terço médio de artéria subclávia esquerda
Lesão do terço médio de artéria subclávia direita
Sinais e sintomas típicos com pelo menos um mês de duração
<i>Critérios menores</i>
Elevação da VHS
Artérias carótidas dolorosas
Hipertensão arterial sistêmica
Insuficiência aórtica ou ectasia do anel valvar aórtico
Lesões de artérias pulmonares
Lesão de terço médio de carótida comum
Lesão distal no tronco braquiocefálico
Lesão de aorta torácica descendente
Lesão de aorta abdominal
Lesão de artérias coronárias

VHS – Velocidade de hemossedimentação.

## 1.6 Atividade de doença na arterite de Takayasu

A AT é uma doença que cursa com períodos de exacerbação e remissão e a doença é considerada em atividade, quando o paciente apresenta novas manifestações clínicas atribuídas à AT, elevação de provas inflamatórias, como a VHS e a PCR, em associação ao desenvolvimento de novas lesões arteriais (6). As novas

manifestações da doença devem ter iniciado há no máximo 3 meses do dia da avaliação do paciente. É importante salientar que novas lesões arteriais são observadas em até 61% dos pacientes considerados em remissão da doença (4).

Alguns instrumentos de avaliação foram desenvolvidos para aferir atividade de doença na AT, entre eles, os critérios de Kerr *et al*, também conhecidos como os critérios do NIH (*National Institutes of Health*), são os mais utilizados (Quadro 3). Nesses critérios de atividade de doença são consideradas as seguintes variáveis: sintomas sistêmicos, elevação da VHS, manifestações de isquemia ou inflamação vascular e alterações angiográficas típicas (4). Posteriormente, os critérios de Kerr *et al* foram modificados para incluir o desenvolvimento de nova lesão arterial, em território previamente livre de lesões, como sinal de atividade de doença, sem a necessidade da presença de outras manifestações clínicas ou alteração da VHS (57).

**Quadro 3** – Critérios de Kerr *et al* para avaliar atividade de doença na arterite de Takayasu (4).

<b>Critérios</b>
Queixas sistêmicas como febre e queixas musculoesqueléticas, sem outras causas identificadas
Elevação da VHS
Manifestações de isquemia ou insuficiência vascular que incluem claudicação de membros, redução ou ausência de pulsos periféricos, sopro, dor vascular (carotidínea), assimetria de pressão arterial em membros superiores ou inferiores
Alterações angiográficas típicas

Manifestação nova ou exacerbação de manifestação preexistente indica doença ativa. VHS – Velocidade de hemossedimentação.

Outro instrumento de avaliação de atividade de doença na AT é o *Indian Takayasu Activity Score* (ITAS2010). Esse instrumento aborda atividade de doença com manifestações que acometem 6 órgãos e sistemas com 44 itens. Cada item só pode ser pontuado se tiver seu início nos últimos 3 meses. O ITAS2010 provê um escore de atividade de doença que tem maior peso nas manifestações vasculares. Resultados de VHS e PCR também podem ser incorporados à pontuação do ITAS2010, mas nesse caso, o instrumento leva o nome de ITAS.A (58).

## **1.7 Macrófagos**

Macrófagos são células heterogêneas que fazem parte da imunidade inata e são encontradas em tecidos de todos os órgãos e sistemas. Os macrófagos são originados a partir da migração de monócitos circulantes no sangue periférico ou, no caso dos macrófagos residentes em tecidos, eles são oriundos de células embrionárias e são auto renováveis nos próprios tecidos (59). Células de Kupffer, macrófagos alveolares, osteoclastos, células de Langerhans e microgliócitos são exemplos de macrófagos residentes em tecidos. Porém, todos os órgãos e sistemas têm macrófagos residentes em seus tecidos (60). Monócitos derivados da medula óssea circulam na corrente sanguínea e se transformam em macrófagos e em células dendríticas nos tecidos, em estados infecciosos e infecciosos, além de distúrbios metabólicos (61).

Macrófagos coordenam a resposta imunitária e atuam na vigilância imunológica combatendo as agressões em geral ao nosso organismo, incluindo infecções e neoplasias. Adicionalmente, essas células são importantes para a homeostase dos tecidos, especialmente na resolução do processo inflamatório e na reparação tecidual e cicatrização (62). Macrófagos patrulham os tecidos, respondendo a estímulos endógenos produzidos após lesão tecidual ou infecção, mas também são influenciados por outras células da imunidade inata, por células da imunidade adaptativa e pelos próprios macrófagos (63).

Macrófagos apresentam grande diversidade e plasticidade influenciadas pelos estímulos presentes no meio, podendo assim assumir diferentes fenótipos. De forma binária, os macrófagos são classificados em dois subtipos distintos: os classicamente ativados, ou macrófagos M1, e os macrófagos alternativamente ativados, ou macrófagos M2 (64). As duas populações celulares se diferenciam pela imunoexpressão de diferentes genes e secreção de diferentes proteínas, incluindo receptores de superfície celular e citocinas (62,63). A plasticidade de macrófagos é um processo dinâmico, seus diferentes subtipos podem inclusive ser evidenciados simultaneamente no mesmo processo patológico, como por exemplo na hanseníase, onde a fase inflamatória e de reparação apresentam diferentes fenótipos M1 e M2 (65).

O fenótipo M1 de macrófagos é induzido por estímulos específicos, isoladamente ou em conjunto, que incluem exposição ao interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) produzido por células Th1, a produtos bacterianos, como lipopolissacárides (LPS) com estímulo a TLR (*Toll-like receptors*), e após a exposição a citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (66).

O fenótipo M1 de macrófagos, em contrapartida, produz citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-6, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , e ajuda a induzir as respostas Th1 e Th17 com a secreção de IL-12 e IL-23, respectivamente (67,68). Esse fenótipo M1 produz quimiocinas (por exemplo: CX3CL1, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11 e CXCL16) que são ligantes dos receptores de quimiocinas CX3CR1, CCR5, CXCR3 e CXCR6, e atraem células CD4<sup>+</sup> Th1, células CD8<sup>+</sup> Tc1 e células NK aos tecidos envolvidos no processo inflamatório (69). Macrófagos M1 ainda secretam espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e têm maior atividade microbicida, especialmente contra patógenos intracelulares e atividade tumoricida (64). Os principais marcadores do fenótipo M1 de macrófagos são CD80, CD86, MHC classe II, receptor da IL-1, óxido nítrico sintase induzida, TLR-2 e TLR-4. Além disso, macrófagos M1 têm alta imunexpressão de IL-12 e baixa imunexpressão de IL-10 (70). Em processos infecciosos agudos, a indução do fenótipo M1 de macrófagos é benéfica. Porém, a indução desse fenótipo cronicamente pode resultar em dano tecidual e dificultar o processo de reparação, principalmente na inflamação estéril (63).

O fenótipo M2 em macrófagos, também conhecido como macrófagos ativados de forma alternativa ou macrófagos anti-inflamatórios, contrapõe-se à atividade inflamatória sustentada pelos macrófagos M1. O termo M2 é derivado da resposta Th2, pois a mudança de macrófagos M0 para macrófagos M2 foi inicialmente atribuída à exposição de macrófagos a citocinas que fazem parte da resposta Th2 como a IL-4 e IL-13 (63,64,66,71).

De uma forma geral, macrófagos M2 atuam na defesa contra parasitas, na reparação tecidual, na cicatrização de feridas e na regulação da resposta imune, além de apresentarem maior capacidade fagocítica (64). A melhora no conhecimento sobre o fenótipo M2 com estudos *in vitro* levou à subdivisão desse fenótipo em quatro categorias: M2a, M2b, M2c e M2d, de acordo com o estímulo que os macrófagos são expostos, também segundo os marcadores celulares expressos e as citocinas, quimiocinas e outros mediadores produzidos (66).



Macrófagos M2a são induzidos quando há exposição do macrófago M0 às citocinas IL-4 e IL-13. Eles são conhecidos como macrófagos reparadores por produzirem altos níveis de fatores pró-fibróticos como IGF (*Insulin-like Growth Factor*), fibronectina, IL10 e TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) que têm efeito anti-inflamatório e pró-fibrótico (66,72). As seguintes quimiocinas também são produzidas por macrófagos M2a: CCL17, CCL18, CCL22 e CCL24. Os principais marcadores de macrófagos M2a são CD206, IL-1ra e IL-1R II (70).

O fenótipo M2b tem o perfil mais pró-inflamatório entre os macrófagos M2, eles são induzidos pela exposição simultânea a imunocomplexos, ligantes de TLR e IL-1 $\beta$ .

Macrófagos M2b produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, além da quimiocina CCL1 (62). O fenótipo M2b expressa CD86 e IL-10, mas não tem boa imunoexpressão de CD206 (70).

A exposição de macrófagos a IL-10 e a glicocorticoides leva ao desenvolvimento do fenótipo M2c que também é conhecido como macrófago regulador, que produz, em contrapartida, altos níveis de IL-10, TGF $\beta$  e das quimiocinas CCL16, CCL18 e CXCL13, além de baixos níveis de IL-12 (62,67). O fenótipo M2c tem efeito anti-inflamatório e de realizar a fagocitose de células apoptóticas, evitando a ativação de processo inflamatório com o processo apoptótico. Macrófagos M2c expressam CD206, TLR-1 e TLR-8 (70).

O fenótipo M2d é induzido quando agonistas de TLR se ligam a receptores A<sub>2A</sub> de adenosina. Essa ligação leva à supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias e à secreção de citocinas anti-inflamatórias, com altos níveis de IL-10 e de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), mas, em contrapartida, macrófagos M2d não expressam CD206 e produzem baixos níveis de TNF $\alpha$  e de IL-12 (73,74). Quanto aos ligantes de receptores de quimiocinas produzidos por macrófagos M2, há diferentes expressões desses ligantes em diferentes subpopulações desse fenótipo. O fenótipo M2a produz CCL17, CCL18, CCL22 e CCL24 que se ligam aos receptores CCR3 e CCR4 em basófilos, eosinófilos, células Th2, células Tc2, células T regulatórias e em células T naïve. O fenótipo M2b produz apenas CCL1, que se liga ao receptor CCR8 e atrai eosinófilos, células Th2, células Tc2 e células T regulatórias aos tecidos. Por último, o macrófago M2c produz CXCL13, CCL16 e CCL18 que se ligam a receptores CCR1, CXCR5 e/ou H4, atraindo linfócitos T e linfócitos B para os tecidos (69).

A exposição de macrófagos M0 à quimiocina CXCL4, liberada por plaquetas, leva ao desenvolvimento de fenótipo distinto do M1 e M2. Essa nova população de macrófagos foi inicialmente descrita em placas ateroscleróticas e passou a ser conhecida como macrófago M4 (75). Essa subpopulação de macrófagos expressa CD68 e S100A8 (MRP-8) e produz altos níveis de IL-6, TNF $\alpha$  e as metaloproteases de matriz (MMP)7 e MMP12. Porém, esse fenótipo tem imunexpressão nula de CD163 e menor imunexpressão do receptor *scavenger* CD36/SR-A. Em placas ateroscleróticas, macrófagos M4 estão associados a maior instabilidade e maior risco de rotura da placa (75–77).

Em diferentes doenças, dependendo do processo fisiopatológico, pode-se observar predomínio de macrófagos M1 ou M2 no infiltrado celular de tecidos acometidos. O predomínio de macrófagos M1 é observado na esteatose hepática, obesidade, glomerulonefrite, diabetes, doença aterosclerótica e em infecções por vírus e microbactérias. Predomínio de macrófagos M2, por sua vez, é observado na asma brônquica, dermatite atópica, pneumopatia intersticial, na sarcoidose e em infecções parasitárias (64).

Em relação a vasculites sistêmicas, na glomerulonefrite necrosante pauci-imune, associada aos anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), observa-se um aumento no número de macrófagos M2 (CD68<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>) em torno de áreas de necrose fibrinoide em fase inicial (78). De fato, pacientes com vasculites associadas ao ANCA e glomerulonefrite ativa apresentam níveis aumentados de CD163 (marcador de macrófagos M2) solúvel na urina em relação àqueles em remissão. Nesse estudo, níveis urinários de CD163 solúvel se mostraram como bom biomarcador de vasculite renal ativa (79).

Achado interessante foi observado em estudo *in vitro*, no qual o soro de pacientes com vasculites associadas ao ANCA em atividade induziu o fenótipo M2c, quando adicionado à cultura de monócitos isolados a partir de *sorting* de células mononucleares de sangue periférico, enquanto o soro de controles saudáveis induziu o fenótipo M0 (80). Em estudo realizado por nosso grupo, observamos predomínio de macrófagos M2 e linfócitos Th2 em relação a macrófagos M1 e a células Th1 nas vias aéreas de pacientes com granulomatose com poliangiíte em atividade de doença. Nesse estudo, o CD163 foi utilizado como marcador de macrófagos M2. O uso de imunossupressores se associou à maior imunexpressão de CD163 e a dose diária

de prednisona se correlacionou a todos os marcadores macrofágicos: CD68, CD86 e CD163 (81).

## **2. HIPÓTESE**

Em pacientes com AT, há predomínio de macrófagos no infiltrado inflamatório da parede da aorta em relação a outras células que participam da resposta inflamatória como linfócitos T, linfócitos B e células NK. O fenótipo M1 de macrófagos deve ser o predominante na AT, principalmente devido à natureza inflamatória da doença, com participação das respostas Th1 e Th17 da imunidade adaptativa na sua fisiopatologia. Também levantamos a hipótese de que macrófagos são observados mais frequentemente na adventícia da aorta, devido à proximidade com sua porta de entrada, a *vasa vasorum*.

### **3. JUSTIFICATIVA**

---

A AT é classificada como uma vasculite granulomatosa que afeta artérias de grande calibre, apresentando células gigantes multinucleadas em meio ao infiltrado inflamatório na parede arterial. Apesar da grande importância da participação de macrófagos na fisiopatologia da AT, com células CD68+ presentes no infiltrado inflamatório da parede arterial, não há estudos que tenham avaliado subpopulações de macrófagos com fenótipos M1 e M2 em pacientes com AT.

#### **4. OBJETIVOS**

---



#### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar o perfil de macrófagos no infiltrado inflamatório da parede da aorta de pacientes com AT.

#### **4.2 Objetivos específicos**

Quantificar a imunoexpressão de marcadores de macrófagos no infiltrado inflamatório da parede da aorta de pacientes com AT e comparar a marcadores de outras células relevantes no processo inflamatório, incluindo linfócitos T, linfócitos B e células NK, em pacientes com AT, pacientes com doença aterosclerótica (DA) e doadores cadavéricos de transplante cardíaco;

Comparar a imunoexpressão de marcadores de macrófagos M1 a de macrófagos M2 na parede da aorta de pacientes com AT;

Descrever a localização preferencial do infiltrado de macrófagos na parede arterial em pacientes com AT, se na íntima, média ou adventícia;

Avaliar relações entre a imunoexpressão de marcadores de macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células NK na aorta de pacientes com AT com aterosclerose na aorta, atividade clínica da doença, atividade histológica e uso de glicocorticoides.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## **5.1 Pacientes e controles**

Realizamos estudo transversal, no qual foram incluídas amostras de aorta de 22 pacientes com AT submetidos à cirurgia de revascularização ou à necropsia. Para ingresso no estudo, foram observados os critérios de inclusão: cumprir os critérios de classificação do ACR para AT ou os critérios diagnósticos de Ishikawa modificados por Sharma para AT (55,56) e disponibilidade de espécime de aorta pós cirurgia de revascularização ou pós necropsia. Nos grupos controle, os critérios de inclusão foram os seguintes: DA complicada em aorta torácica e/ou abdominal e espécime disponível para estudo e no presença de espécimes de aorta torácica de doadores cadavéricos de transplante cardíaco, que não apresentavam AT ou doença aterosclerótica.

As amostras de artérias dos participantes do estudo foram obtidas no Laboratório de Patologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), Laboratório de Patologia do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INCOR-FMUSP), Laboratório de Patologia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e do Laboratório Pathos.

## **5.2 Implicações éticas**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP 1210/2015, CAAE: 49602615.3.0000.5505). Os participantes do estudo ou seus familiares, que puderam ser contatados assinaram termo de consentimento livre e esclarecido após leitura e concordância (anexos 3 a 4). A dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido foi aceita pelo CEP-UNIFESP, quando houve impossibilidade de se localizar o participante do estudo ou algum de seus familiares.

## **5.3 Variáveis do estudo**

Foram coletadas informações sobre idade à época do procedimento cirúrgico

ou óbito e gênero para todos os participantes do estudo. Entre os pacientes com AT, foram levantadas informações sobre atividade de doença com base nos critérios de Kerr *et al* (4), que inclui avaliação clínica, alterações da VHS e de exames de imagem realizados na época da obtenção da amostra da aorta. Foram coletadas informações sobre os exames de VHS e PCR realizados no máximo uma semana antes do procedimento cirúrgico ou do óbito. Também foram coletadas informações sobre a terapia utilizada para a AT, incluindo prednisona, imunossupressores ou agentes biológicos.

Os pacientes com AT foram sub-classificados entre aqueles que apresentam ou não atividade histológica e aqueles que apresentam ou não lesões ateroscleróticas concomitantes na aorta, com base nos achados de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina. Atividade histológica foi considerada quando pacientes com AT apresentaram infiltrado inflamatório pan-mural ou inflamação granulomatosa na aorta, enquanto a ausência de atividade histológica da AT foi definida pela presença de fibrose da parede arterial com ou sem raros focos inflamatórios (28,31).

#### **5.4 Imunohistoquímica**

Os exames de imunohistoquímica foram realizados no Departamento de Patologia Clínica e Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein, em amostras da aorta torácica e abdominal fixadas em formalina e embebidas em parafina.

Os blocos de parafina receberam seis cortes histológicos de 4µm cada no micrótomo, em lâminas silanizadas (Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos). As lâminas foram identificadas com etiqueta impressa após cadastro de cada amostra no aparelho Dako Autostainer™ (Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos). As lâminas foram colocadas em estufa com temperatura entre 75-80°C para desparafinização por 30 minutos. As lâminas foram submetidas à re-hidratação em banhos de álcool absoluto e água destilada, seguidas de banho em tampão Buffer Dako (Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos) por 5 minutos cada.

A recuperação antigênica foi realizada no aparelho PTlink (Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos) em solução com pH de acordo

com a especificação do anticorpo primário e as lâminas recebem dois banhos de 97°C por 20 minutos e depois resfriamento até 65°C. Após a etapa de recuperação antigênica, os suportes com as lâminas foram retirados do aparelho PTlink e colocados em tanques com solução tampão de lavagem *EnVision™Flex* (Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos) por 5 minutos. Os suportes com as lâminas foram finalmente colocados no aparelho Dako Autostainer Link 48™ (Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos) para a coloração das lâminas.

Para evitar ressecamento das lâminas, as mesmas foram hidratadas a contagotas com solução tampão de lavagem *EnVision™Flex* (Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos) sempre que necessário. Foi escolhida a programação com o protocolo de imunohistoquímica já previamente inserido no aparelho. A peroxidase endógena foi bloqueada com imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 10 volumes por 10 minutos. Após essa etapa, as lâminas foram imersas em tampão de lavagem por 5 minutos e após essa lavagem, anticorpos primários foram adicionados às lâminas conforme o Quadro 4.

**Quadro 4 – Anticorpos primários utilizados na imunohistoquímica.**

<b>Especificidade</b>	<b>Anticorpo Origem</b>	<b>Empresa/clone</b>	<b>Clonalidade</b>	<b>Diluição</b>
<b>Linfócitos T</b>	Anti-CD3 humano Camundongo	Abcam (ab699) PS1	Monoclonal	1:50
<b>Linfócitos B</b>	Anti-CD20 humano Camundongo	Abcam (ab9475) L26	Monoclonal	1:50
<b>Células NK</b>	Anti-CD56 humano Camundongo	Abcam (ab8233) MEM-188	Monoclonal	1:50
<b>Macrófagos</b>	Anti-CD68 humano Camundongo	Dako - Agilent (IS613) PG-M1	Monoclonal	1:50
<b>Macrófagos M1</b>	Anti-CD86 humano Coelho	Abcam (ab196564) P42081	Policlonal	1:50
<b>Macrófagos M2</b>	Anti-CD206 humano Camundongo	Abcam (ab117644) 5C11	Monoclonal	1:200

A incubação com anticorpos primários durou 30 minutos e, após esse tempo, as lâminas foram lavadas em solução tampão de lavagem por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima *horseradishperoxidase* (HRP) (ab97046) (Abcam, Cambridge, Reino Unido) por 15 minutos e, posteriormente, lavadas com solução tampão de lavagem por 5 minutos.

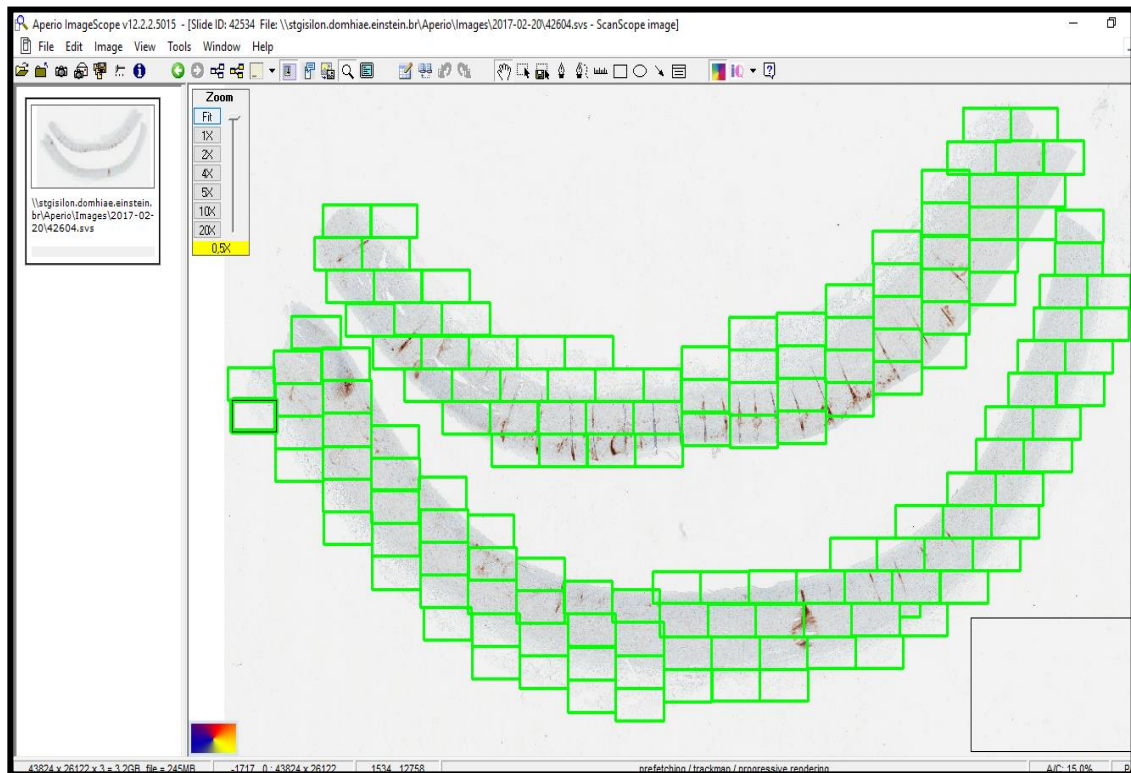
As lâminas foram incubadas com solução de polímero (Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos) por 30 minutos e depois lavadas por 5 minutos com tampão de lavagem. A coloração final das lâminas foi realizada com a solução DAB (diaminobenzidina) (*Evision Flex, Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos*) durante 10 minutos.

As lâminas foram lavadas com água destilada e contracoradas com hematoxilina durante 5 segundos (*Evision Flex Hematoxylin, Dako Agilent Pathology Solutions, Santa Clara, Estados Unidos*). Depois, as lâminas foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas com Entelan e lamínula.

A plataforma de telepatologia foi utilizada para a avaliação da imunoexpressão de cada marcador, as lâminas foram digitalizadas com o aparelho *Nanozoomer Digital Pathology Scanner (NDP Scan U10074-01; Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japão)*. A quantificação da imunoexpressão de cada marcador nas lâminas foi realizada por dois pesquisadores independentes, com o programa *ImageScope Viewer (V11.2.0.780 Aperio; e-Pathology Solution, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha)*.

Foi utilizado método semiquantitativo com escala de cinco pontos (0-4): 0 para ausência de imunoexpressão, 1 para raras células positivas (0-1%), 2 para número moderado de células coradas com o marcador (1-20%), 3 para um grande número de células coradas (20-50%) e 4 para um número muito elevado de células coradas com o marcador (>50%) (82). A quantificação da imunoexpressão de cada marcador foi realizada em **TODOS** os campos da aorta de cada participante do estudo, em aumento de 10x para cada campo, por dois avaliadores (AWSS e JPS) cegos para os grupos de participantes do estudo. A Figura 1 ilustra os campos utilizados durante a quantificação da imunoexpressão de marcadores no estudo. Além da avaliação da

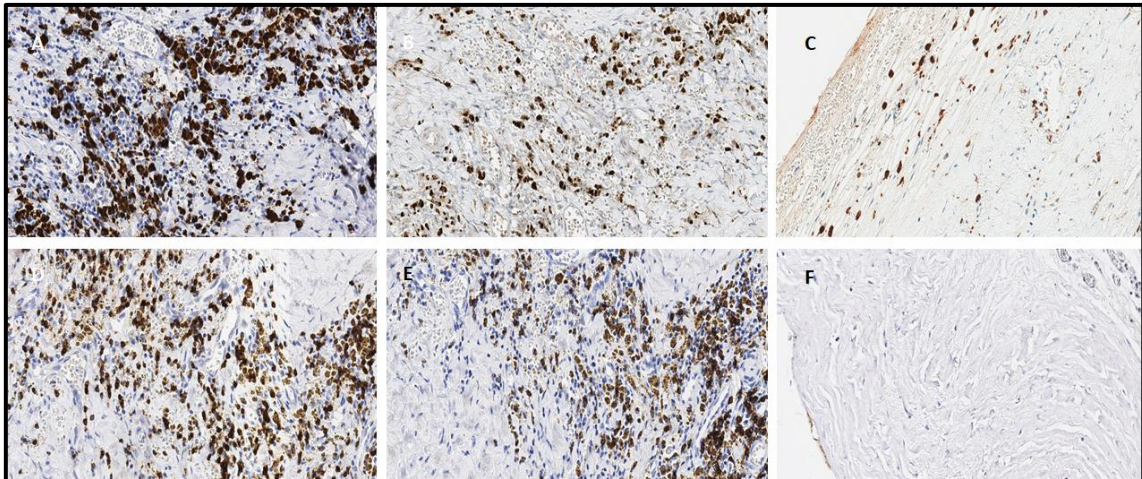
imunoexpressão de marcadores em todas as camadas da aorta, realizamos em pacientes com AT, a avaliação da imunoexpressão de marcadores CD68, CD86 e CD206 nas camadas específicas da aorta: íntima, média e adventícia.



**Figura 1. Campos de análise da imunoexpressão de marcadores na parede da aorta.**

Os campos foram marcados com aumento de 10x na parede da aorta e englobam todas as camadas: íntima, média e adventícia.

A Figura 2 ilustra a imunoexpressão dos seguintes marcadores: pan macrófágico (CD68), macrófagos M1 (CD86), macrófagos M2 (CD206), linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD20) e células NK (CD56) na aorta de paciente com AT.

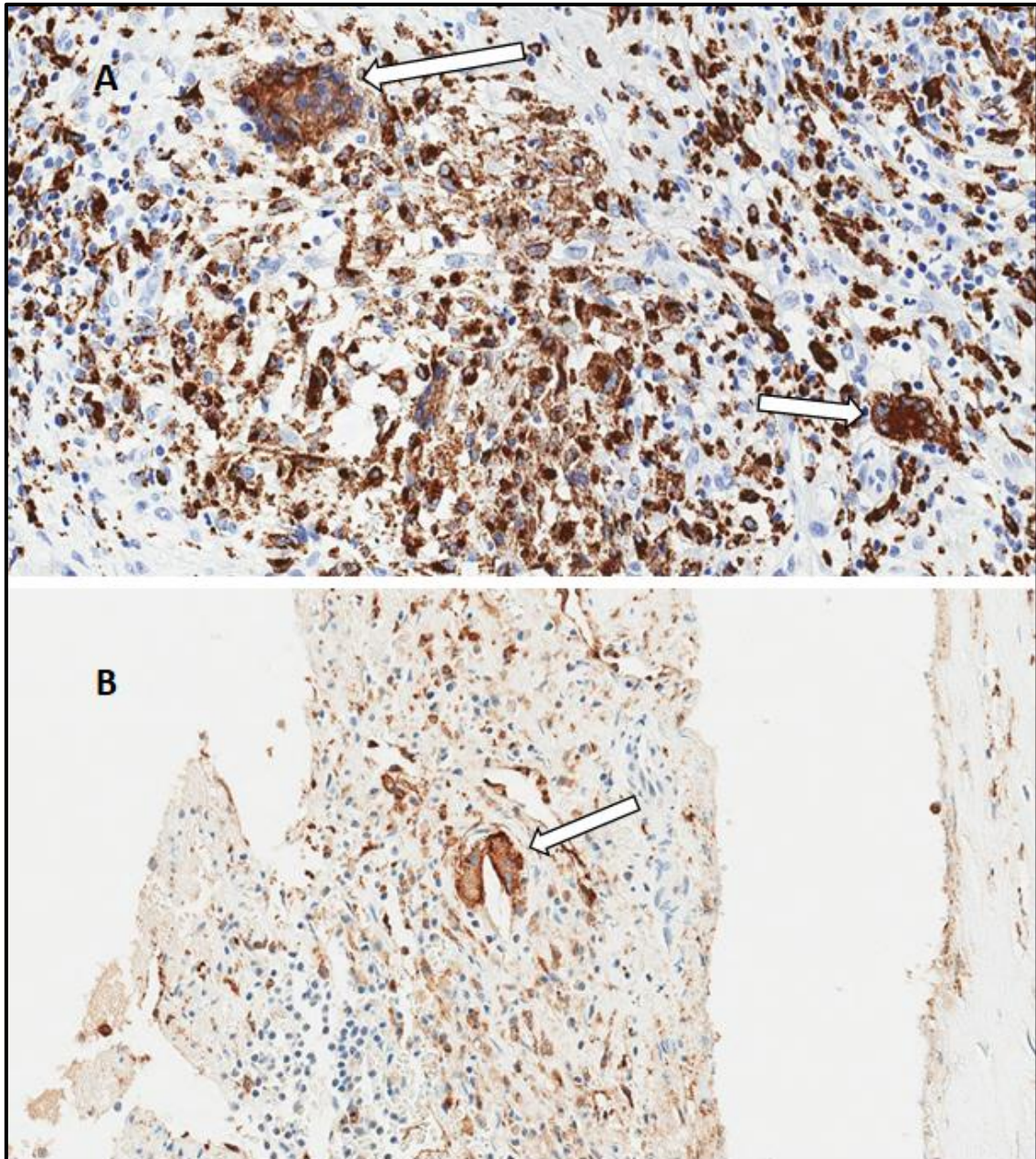


**Figura 2. Imunohistoquímica da parede da aorta de paciente com arterite de Takayasu.**

Imagens representativas dos marcadores pan-macrófago CD68<sup>+</sup> (A), macrófagos M1 CD86<sup>+</sup> (B), macrófagos M2 CD206<sup>+</sup> (C), células T CD3<sup>+</sup> (D), células B CD20<sup>+</sup> (E) e células NK CD56<sup>+</sup> (F) em infiltrado inflamatório da aorta de paciente com arterite de Takayasu, em aumento de 20x. Os núcleos celulares foram corados em azul pela hematoxilina e cada lâmina foi corada com um marcador específico em marrom (anticorpos secundários conjugados com HRP).

A Figura 3A ilustra a presença de células gigantes multinucleadas, coradas pelo marcador pan-macrofágico CD68, em meio ao infiltrado inflamatório da aorta torácica de paciente com AT, que apresenta atividade histológica da doença. Todas as células gigantes multinucleadas, observadas nas aortas de pacientes com AT, expressaram o marcador de macrófagos M2, ou seja, o CD206 à imuno-histoquímica (Figura 3B).

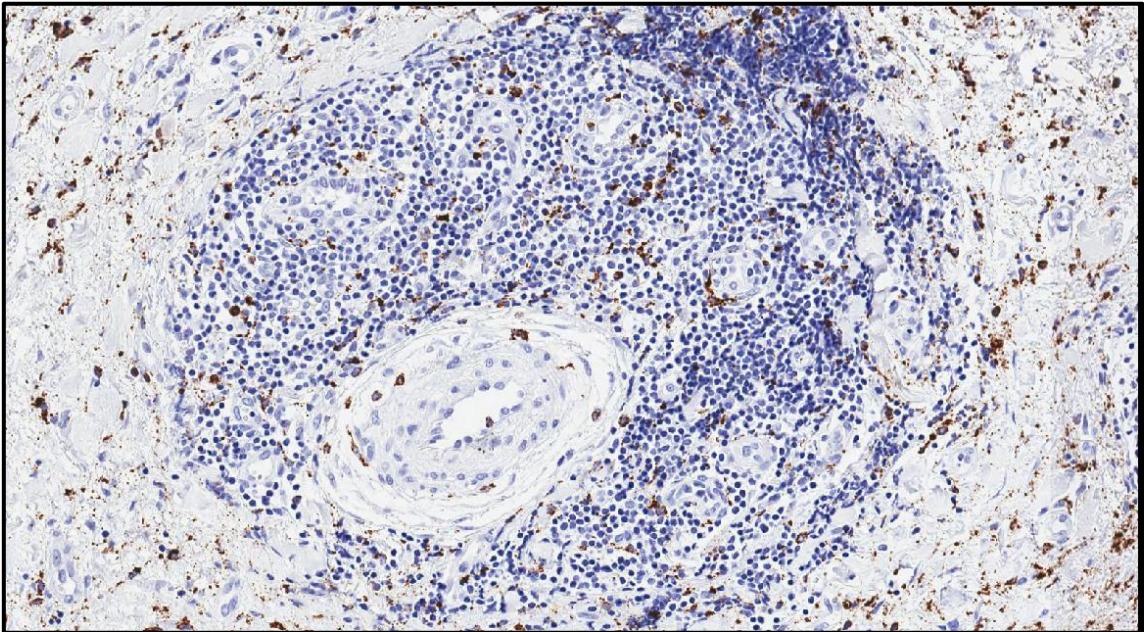




**Figura 3. Células gigantes multinucleadas em paciente com arterite de Takayasu.**

A Figura 3 **A** demonstra células gigantes multinucleadas CD68<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório da aorta torácica de paciente com AT. A Figura 3 **B** demonstra células gigantes multinucleadas observadas nesse estudo apresentaram o marcador CD206 de macrófagos M2, em aumento de 20x. Os núcleos celulares foram corados em azul pela hematoxilina e cada lâmina foi corada com um marcador específico em marrom (anticorpos secundários conjugados com HRP).

Na Figura 4, observamos macrófagos (CD68<sup>+</sup>), em meio à *vasa vasorum*, com infiltrado inflamatório na adventícia de aorta de paciente com AT, que apresenta atividade histológica da doença.

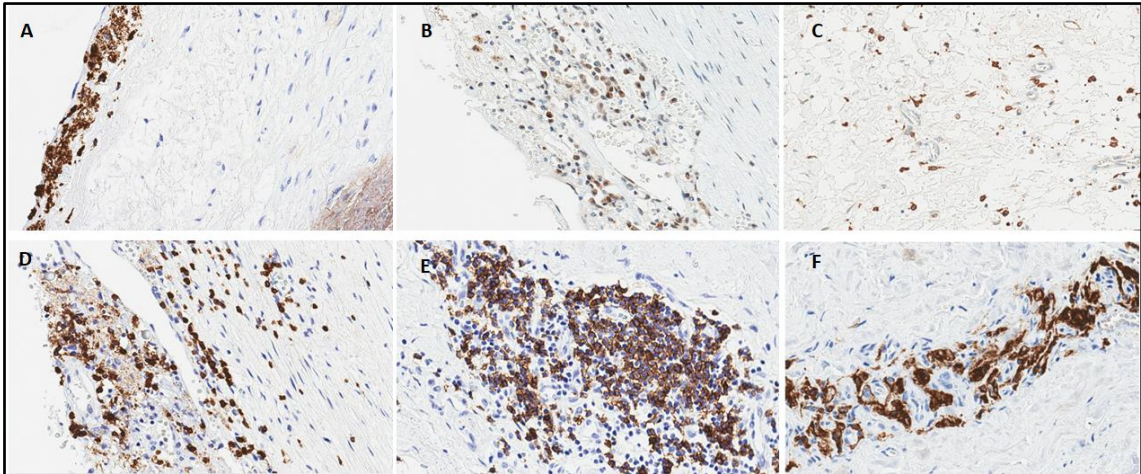


**Figura 4. Macrófagos na adventícia da aorta torácica na arterite de Takayasu.**

Macrófagos (CD68<sup>+</sup>) na adventícia da aorta torácica, em meio à *vasa vasorum*, em aumento de 20x. Os núcleos celulares foram corados em azul pela hematoxilina e cada lâmina foi corada com um marcador específico em marrom (anticorpos secundários conjugados com HRP).

Na Figura 5, observamos a imunoexpressão dos marcadores pan-macrofágico (CD68), macrófagos M1 (CD86), macrófagos M2 (CD206), linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD20) e células NK (CD56) em paciente com DA complicada de aorta torácica.

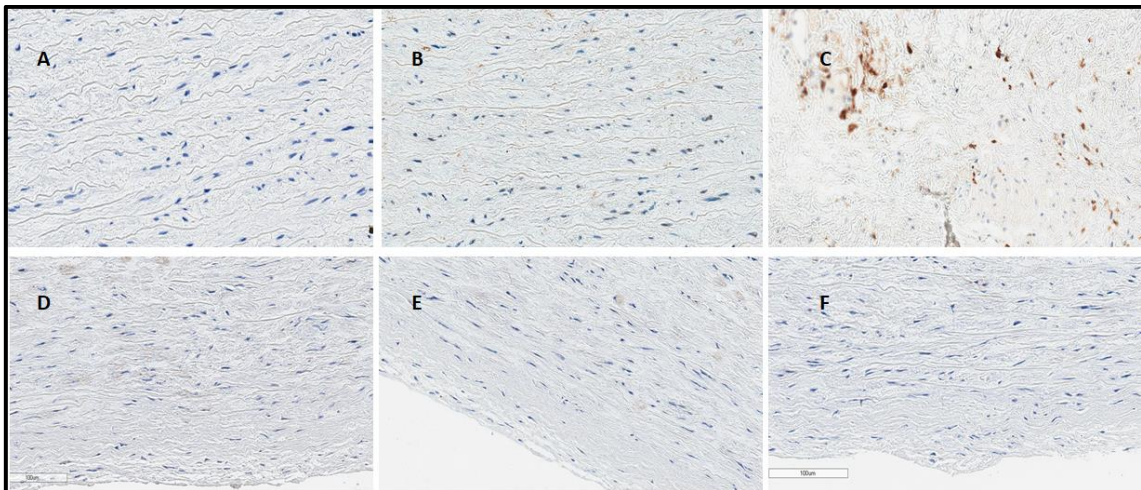




**Figura 5. Imunohistoquímica da parede da aorta de paciente com doença aterosclerótica.**

Imagens representativas dos marcadores pan-macrófago CD68<sup>+</sup> (A), macrófagos M1 CD86<sup>+</sup> (B), macrófagos M2 CD206<sup>+</sup> (C), células T CD3<sup>+</sup> (D), células B CD20<sup>+</sup> (E) e células NK CD56<sup>+</sup> (F) na aorta de paciente com aterosclerose em aumento de 20x. Os núcleos celulares foram corados em azul pela hematoxilina e cada lâmina foi corada com um marcador específico em marrom (anticorpos secundários conjugados com HRP).

A Figura 6 ilustra a baixa imunoexpressão dos marcadores avaliados nesse estudo, em indivíduo do grupo controle. O macrófago M2 foi a subpopulação macrofágica mais comumente observada na aorta torácica de indivíduos do grupo controle.



**Figura 6. Imunohistoquímica da parede da aorta de indivíduo do grupo controle.**

Imagens representativas dos marcadores pan-macrófago CD68<sup>+</sup> (A), macrófagos M1 CD86<sup>+</sup> (B), macrófagos M2 CD206<sup>+</sup> (C), células T CD3<sup>+</sup> (D), células B CD20<sup>+</sup> (E) e células NK CD56<sup>+</sup> (F) na parede da aorta de indivíduo do grupo controle com aumento de 20x. Os núcleos celulares foram corados em azul pela hematoxilina e cada lâmina foi corada com um marcador específico em marrom (anticorpos secundários conjugados com HRP).

## **5.5 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o programa IBM SPSS para Windows, versão 21.0 (Armonk, Estados Unidos) e os gráficos serão construídos utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (La Jolla, Estados Unidos). Variáveis numéricas foram apresentadas como média com desvio padrão ou mediana com intervalo interquartil, de acordo com a distribuição da variável. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado como teste de normalidade. Variáveis categóricas foram apresentadas sob a forma de percentagem e número absoluto. Comparação entre dois grupos, quanto a variáveis numéricas, foi realizada com os testes *t* de Student ou U de Mann-Whitney, enquanto para 3 grupos, as comparações foram realizadas pelos testes ANOVA para um fator ou Kruskal-Walis de acordo com a distribuição das variáveis numéricas. O teste *post hoc* utilizado para o ANOVA com um fator foi o teste de Tukey e para o teste de Kruskal-Walis, utilizamos o teste de Mann-Whitney como teste *post hoc*. Para a comparação entre variáveis categóricas, foram realizados os testes de Fisher ou Qui quadrado. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar correlação entre duas variáveis numéricas. Foram considerados significantes os valores de  $p < 0,05$ .

## **6. RESULTADOS**

---

## 6.1 Pacientes e controles

Informações sobre dados demográficos e artérias avaliadas dos participantes do estudo encontram-se na Tabela 1. Pacientes com DA têm na sua maioria indivíduos do sexo masculino e média de idade superior àqueles com AT, que por sua vez, envolve principalmente mulheres jovens. A aorta torácica foi a artéria predominantemente avaliada nesse estudo, enquanto espécimes de aorta abdominal foram disponibilizados para a minoria dos pacientes com AT e com DA. Não foram incluídas amostras de aorta abdominal de indivíduos doadores cadavéricos de transplante cardíaco.

**Tabela 1. Dados demográficos e aorta avaliada em participantes do estudo.**

Variáveis	Arterite de Takayasu (n = 22)	Doença aterosclerótica (n = 9)	Doadores cadavéricos (n = 8)
Sexo feminino, n (%)	16 (72,7)	2 (22,5)	3 (42,9)
Idade, anos	26,0 (19,0-31,8)	69,0 (61,5-75,0)	64,5 (50,0-70,5)
Aorta torácica, n (%)	19 (86,4)	7 (77,8)	8 (100,0)
Aorta abdominal, n (%)	3 (13,6)	2 (22,2)	--

n – número de participantes; AT – arterite de Takayasu; DA – doença aterosclerótica; dados numéricos apresentados como mediana e intervalo interquartil.

## 6.2 Características da arterite de Takayasu

Entre os pacientes com AT, foram avaliadas variáveis como reagentes de prova inflamatória, atividade clínica de doença, atividade histológica da AT, presença de lesões ateroscleróticas concomitantes e terapia utilizada pelo paciente na época do procedimento cirúrgico ou do óbito (Tabela 2). Em 12 pacientes com AT (54,5%), o procedimento cirúrgico foi realizado na época do diagnóstico da vasculite, antes do início de qualquer terapia com glicocorticoides e ou imunossupressores. O único imunossupressor e agente biológico utilizados pelos pacientes com AT foram metotrexato e tocilizumabe, respectivamente.

**Tabela 2 – Informações sobre atividade de doença e terapia em pacientes com arterite de Takayasu.**

Variáveis	Resultados (n = 22)
Atividade clínica da doença, n (%)	12 (54,5)
Inflamação arterial ativa, n (%)	9 (40,9)
Lesões ateroscleróticas, n (%)	6 (27,3)
Prednisona, n (%)	9 (40,9)
Dose diária de prednisona dose, mg	17,5 (5,0-20,0)
Metotrexato, n (%)	2 (9,1)
Tocilizumabe, n (%)	1 (4,5)
VHS, mm/hora	22,6 ± 16,6
PCR, mg/L	4,8 ± 3,7

n – número de participantes; PCR – proteína C reativa; VHS – velocidade de hemossedimentação. Variáveis numéricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil ou como média e desvio padrão.

Entre os 12 pacientes com AT considerados clinicamente em atividade, 7 (58,3%) também apresentavam atividade histológica ao exame histopatológico em comparação a 5 (41,7%) que não apresentavam indícios de atividade histológica da AT ( $p = 0,099$ ). Entre os 9 pacientes com atividade histológica da AT, apenas 2 (22,2%) apresentaram lesões ateroscleróticas enquanto 7 (77,8%) não apresentaram indícios de aterosclerose em artéria avaliada ( $p = 1,000$ ).

### **6.3 Comparação da imunoexpressão de cada marcador celular entre os grupos do estudo.**

A Tabela 3 detalha as comparações entre pacientes com AT, pacientes com DA e dos doadores cadavéricos de transplante cardíaco quanto à imunoexpressão na parede da aorta dos marcadores de macrófagos (CD68), macrófagos M1 (CD86), macrófagos M2 (CD206), linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD20) e de células NK (CD56). Em relação ao grupo controle, pacientes com AT e indivíduos com DA apresentam a imunoexpressão significativamente aumentada dos marcadores CD68, CD86, CD3, CD20 e CD56 na aorta ( $p < 0,05$ ). Destaca-se, no entanto, que não foram observadas diferenças significantes quanto a imunoexpressão de macrófagos M2 entre os grupos.

Tabela 3. Imunoexpressão de marcadores celulares entre grupos participantes do estudo.

Variáveis	Arterite de Takayasu (n = 22)	Doença aterosclerótica (n = 9)	Doadores cadavéricos (n = 8)	p
CD68	2,216 ± 0,664	1,844 ± 0,408	0,893 ± 0,603	<0,0001*
CD86	0,663 ± 0,376	0,775 ± 0,350	0,271 ± 0,141	0,009*
CD206	1,671 (0,667-2,229)	1,364 (1,279-1,729)	1,278 (0,324-1,468)	0,273
CD3	0,943 (0,562-1,749)	0,930 (0,634-1,177)	0,462 (0,153-0,784)	0,033*
CD20	0,176 (0,077-0,687)	0,242 (0,202-0,299)	0,047 (0,025-1,002)	0,004*
CD56	0,305 (0,139-0,637)	0,283 (0,134-0,454)	0,072 (0,002-0,268)	0,016*

n – número de pacientes; resultados apresentados na forma de mediana e intervalo interquartil ou média e desvio padrão; \* - resultados estatisticamente significantes.

A análise *post hoc* foi realizada para avaliar diferenças na imunoexpressão de cada marcador entre cada grupo de pacientes com AT, pacientes com DA e doadores cadavéricos de transplante cardíaco (Figura 7). A imunoexpressão de CD68, CD86, CD3, CD20 e CD56 na aorta foi semelhante entre pacientes com AT e pacientes com DA, porém a imunoexpressão desses marcadores foi significativamente maior em pacientes com AT e em pacientes com DA em relação aos doadores cadavéricos. Nenhuma diferença quanto à imunoexpressão de CD206 foi observada entre os grupos AT, DA e doadores cadavéricos de transplante cardíaco.



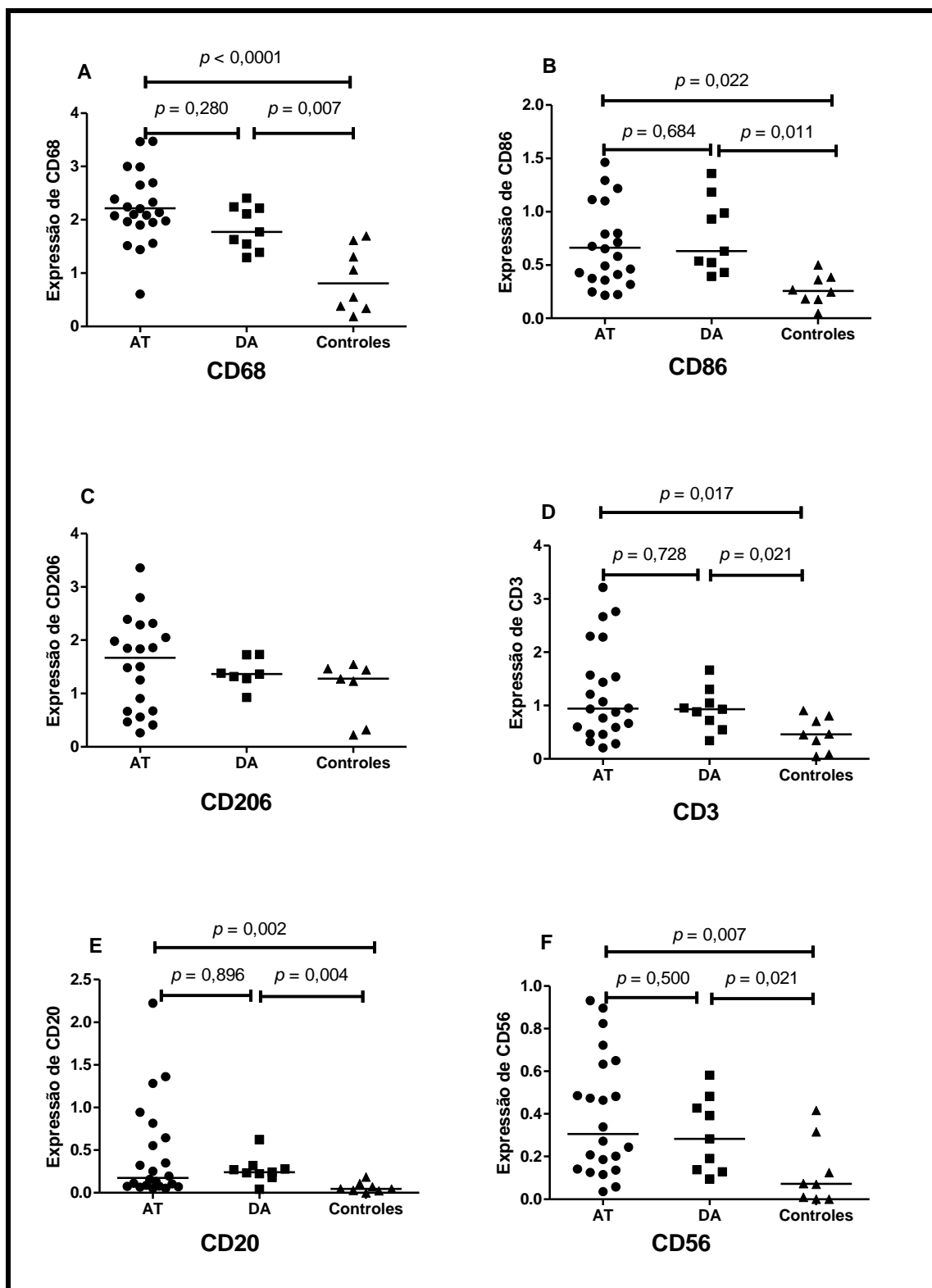
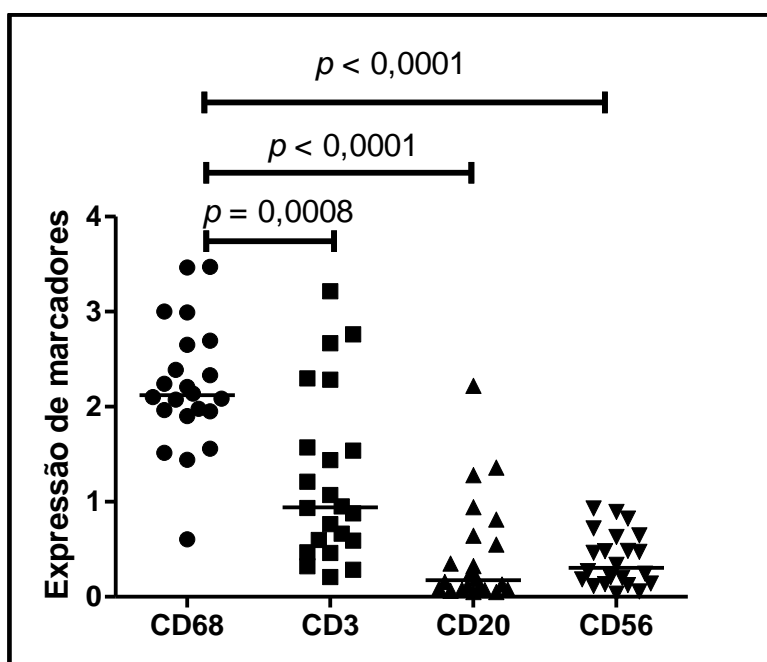


Figura 7. Comparação entre os grupos quanto à imunoexpressão de marcadores de macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e células NK na aorta.

AT – arterite de Takayasu; DA – doença aterosclerótica. Barra transversal representa a média para os marcadores CD68 e CD86, e a mediana para os marcadores CD206, CD3, CD20 e CD56.

#### 6.4 Marcadores celulares na arterite de Takayasu

A quantificação da imunexpressão de marcadores celulares demonstrou que macrófagos são as células mais frequentemente observadas na aorta de pacientes com AT, seguidos por linfócitos T, enquanto linfócitos B e células NK são menos frequentemente observadas (Figura 8).



**Figura 8. Imunoexpressão de marcadores celulares na aorta de pacientes com arterite de Takayasu**

Barras transversais expressam a mediana. Teste de Kruskal-Wallis com  $p < 0,0001$ . Linfócitos T são encontrados em maior frequência em relação a linfócitos B ( $p = 0,0002$ ) e a células NK ( $p = 0,0001$ ), mas nenhuma diferença foi observada entre a imunoexpressão de CD20 e CD56 ( $p = 0,404$ ).

Em relação às subpopulações de macrófagos, os macrófagos M2 são mais frequentemente encontrados em relação a macrófagos M1 ( $1,546 \pm 0,874$  vs.  $0,663 \pm 0,376$ ;  $p = 0,0001$ ) na aorta de pacientes com AT (Figura 9).

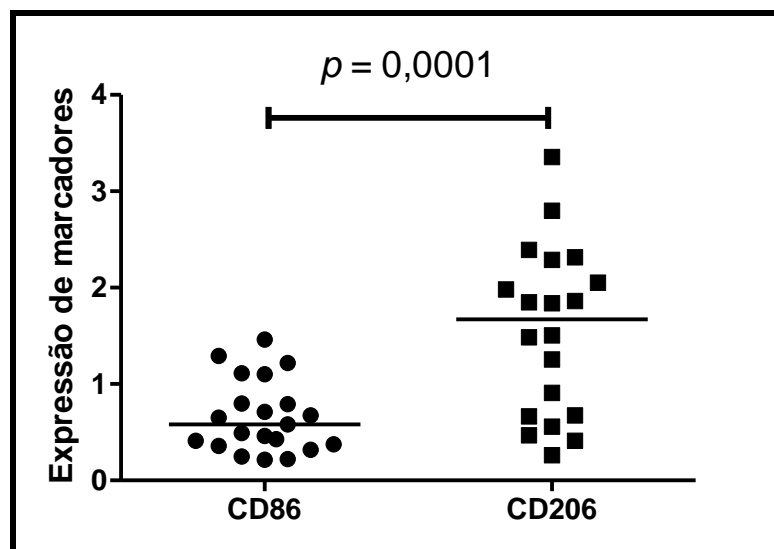


Figura 9. Comparação entre subpopulações de macrófagos na aorta de pacientes com arterite de Takayasu.

Barra transversal representa a média.

### 6.5 Localização do infiltrado de macrófagos na aorta de pacientes com arterite de Takayasu.

Os macrófagos foram encontrados em todas as camadas da parede da aorta de pacientes com AT: íntima, média e adventícia. Não houve diferença significativa quanto à imunoexpressão de marcadores de macrófagos nas diferentes camadas da aorta, mas observamos que a mediana da imunoexpressão dos marcadores CD68, CD86 e CD206 foi ligeiramente superior na camada adventícia, em relação às camadas média e íntima (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 4. Imunoexpressão de marcadores de macrófagos nas diferentes camadas da parede da aorta de pacientes com arterite de Takayasu.

Variáveis	Íntima	Média	Adventícia	<i>p</i>
CD68	1,174 (0,963-1,316)	1,253 (0,697-1,522)	1,720 (1,129-2,776)	0,224
CD86	0,676 (0,223-0,980)	0,746 (0,316-1,513)	0,947 (0,358-1,353)	0,700
CD206	1,222 (0,658-1,918)	1,095 (0,793-1,510)	2,204 (1,107-2,454)	0,326

Resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil.

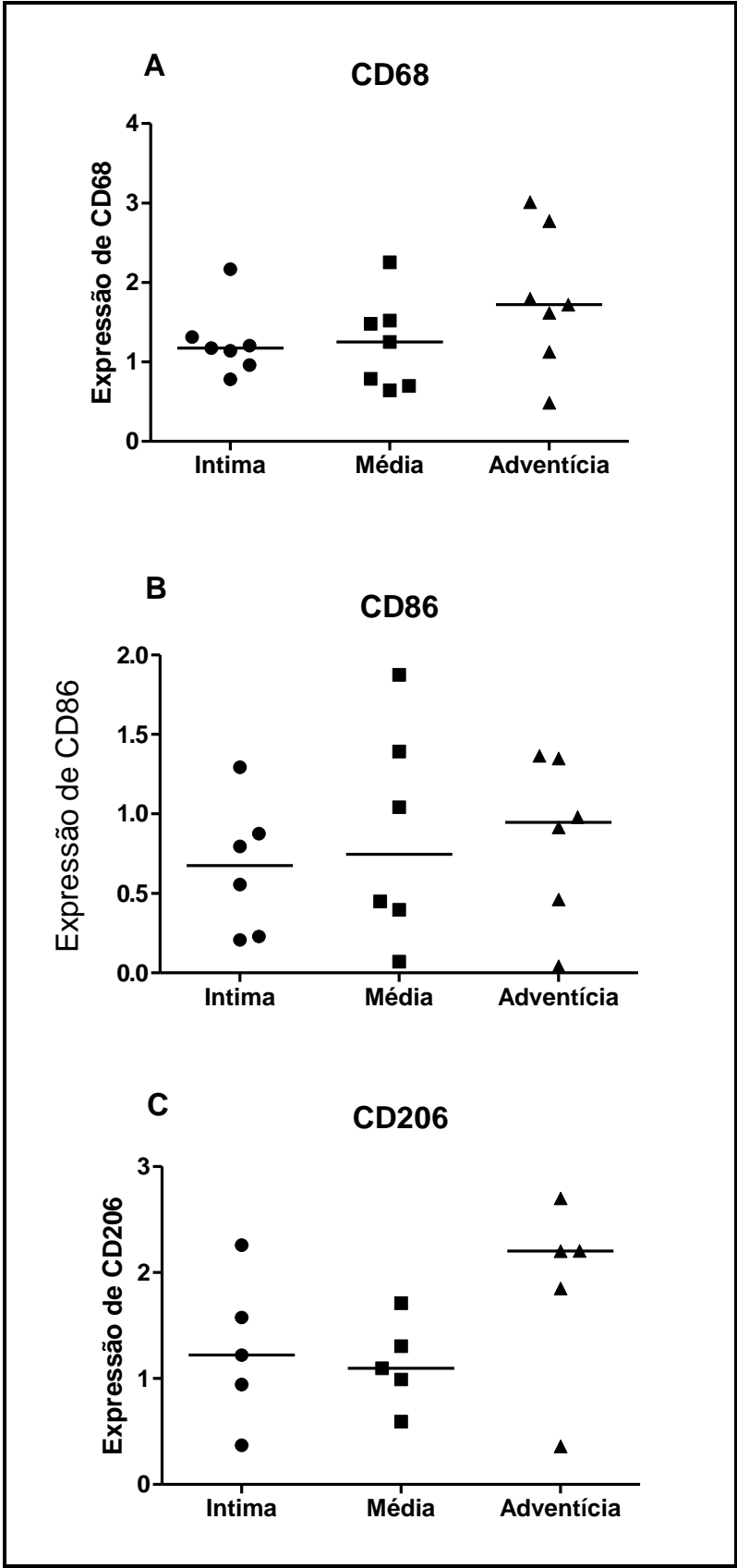


Figura 10. Marcadores de macrófagos e camadas da parede da aorta.

Barra transversal representa a mediana.

## 6.6 Infiltrado inflamatório na parede da aorta e parâmetros clínicos e histológicos na arterite de Takayasu.

Pacientes com AT que apresentaram atividade de doença, com base na avaliação clínica, foram comparados aqueles considerados em remissão. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas em relação à atividade de doença e imunexpressão dos marcadores: CD68, CD86, CD206, CD3, CD20 e CD56, na parede da aorta (Tabela 5).

**Tabela 5. Infiltrado inflamatório na aorta e atividade clínica em pacientes com arterite de Takayasu.**

Variáveis	Atividade clínica (N=12)	Remissão (N=10)	<i>p</i>
CD68	2,173 (1,612-2,917)	2,093 (1,960-2,345)	0,947
CD86	0,427 (0,318-0,713)	0,721 (0,462-1,149)	0,181
CD206	1,706 ± 0,916	1,350 ± 0,828	0,379
CD3	0,914 (0,594-2,575)	1,003 (0,427-1,547)	0,598
CD20	0,205 (0,093-0,912)	0,164 (0,075-0,425)	0,598
CD56	0,416 ± 0,272	0,362 ± 0,303	0,665

Resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil ou como média e desvio padrão. N – número de pacientes.

Na comparação de diferentes marcadores celulares em pacientes com e sem atividade histológica em aorta torácica e/ou abdominal na AT, observou-se maior frequência de linfócitos T naqueles com infiltrado inflamatório ativo na parede da aorta, em comparação a pacientes com AT que apresentaram lesões fibróticas (Tabela 6 e Figura 11). Entretanto, não foram observadas diferenças quanto a marcadores de macrófagos, linfócitos B ou de células NK.

Tabela 6. Atividade histológica e marcadores celulares em pacientes com arterite de Takayasu.

Variáveis	Atividade histológica (N=9)	Remissão (N=13)	p
CD68	2,428 ± 0,588	2,068 ± 0,696	0,220
CD86	0,756 ± 0,454	0,593 ± 0,308	0,339
CD206	1,778 ± 0,957	1,355 ± 0,794	0,294
CD3	1,540 (0,808-2,483)	0,764 (0,392-1,255)	0,030*
CD20	0,325 (0,109-1,152)	0,132 (0,074-0,498)	0,193
CD56	0,202 (0,133-0,377)	0,474 (0,172-0,773)	0,133

Resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil ou como média e desvio padrão; \* - resultados estatisticamente significantes; N – número de pacientes.

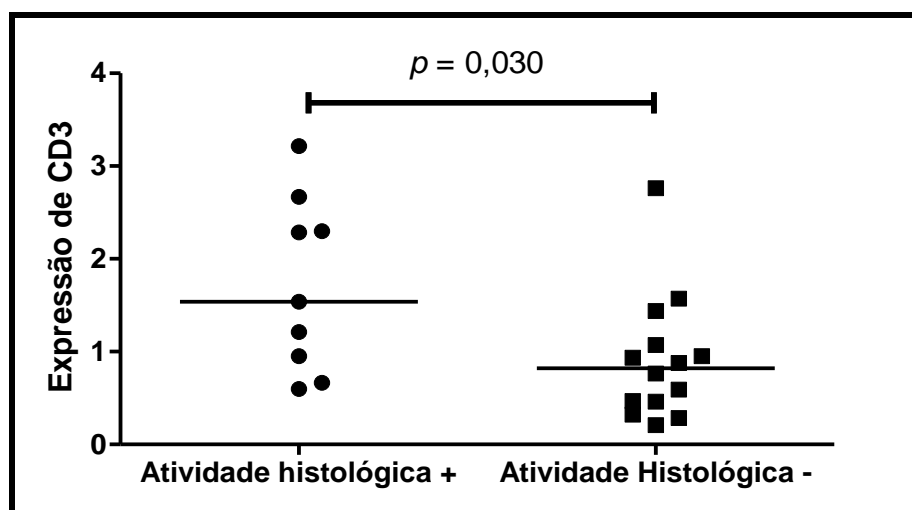


Figura 11. Linfócitos T e atividade histológica na arterite de Takayasu.

Barra transversal representa a mediana.

Os pacientes com AT foram divididos em dois grupos, de acordo com a presença ou ausência de lesões ateroscleróticas concomitantes, com a finalidade de avaliar a influência desse achado sobre a imunoexpressão dos marcadores: CD68, CD3, CD20, CD56, CD86 e CD206 na parede arterial. Entretanto, não houve diferenças significativas quanto aos marcadores estudados entre pacientes com AT com e sem lesões ateroscleróticas na parede da aorta, observamos apenas uma

tendência à maior imunexpressão de CD206 em pacientes com AT que apresentavam lesões ateroscleróticas (Tabela 10).

**Tabela 7. Marcadores celulares e lesões ateroscleróticas em pacientes com arterite de Takayasu.**

Variáveis	Aterosclerose	Aterosclerose	p
	presente (N=6)	ausente (N=16)	
CD68	2,545 ± 0,558	2,092 ± 0,674	0,159
CD86	0,949 (0,240-1,158)	0,492 (0,374-0,713)	0,484
CD206	1,922 (1,845-2,146)	1,081 (0,536-2,116)	0,070
CD3	1,012 (0,752-1,845)	0,820 (0,500-2,105)	0,712
CD20	0,164 (0,098-0,564)	0,205 (0,077-0,773)	0,883
CD56	0,368 (0,102-0,518)	0,291 (0,152-0,699)	0,555

Resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil ou como média e desvio padrão; N – número de pacientes.

### 6.7 Influência da terapia com prednisona e a imunexpressão de cada marcador celular na parede da aorta de pacientes com arterite de Takayasu.

Os pacientes com AT foram divididos em dois grupos, de acordo com o uso de prednisona, com a finalidade de avaliar a influência dessa medicação na imunexpressão dos marcadores: CD68, CD3, CD20, CD56, CD86 e CD206 na parede da aorta. Foi observada imunexpressão significativamente menor de CD3 na aorta de pacientes em uso de prednisona. Não houve diferenças significantes quanto ao uso de prednisona e a imunexpressão de outros marcadores celulares na parede da aorta (Tabela 8 e Figura 12). Entretanto, não houve correlação entre dose diária de prednisona e a imunexpressão de CD3 na aorta de pacientes com AT ( $\rho = 0,196$ ;  $p = 0,642$ ).

Tabela 8. Terapia com prednisona e marcadores celulares na aorta de pacientes com arterite de Takayasu.

Variáveis	Prednisona (N=9)	Sem prednisona (N=13)	p
CD68	2,108 ± 0,756	2,290 ± 0,614	0,542
CD86	0,660 ± 0,401	0,664 ± 0,376	0,983
CD206	1,382 ± 0,822	1,654 ± 0,926	0,510
CD3	0,470 (0,303-1,306)	1,211 (0,714-2,483)	0,035*
CD20	0,132 (0,065-0,289)	0,352 (0,097-1,113)	0,117
CD56	0,392 ± 0,314	0,391 ± 0,269	0,990

Resultados apresentados como mediana e intervalo interquartil ou como média e desvio padrão; \* - resultados estatisticamente significantes; N – número de pacientes.

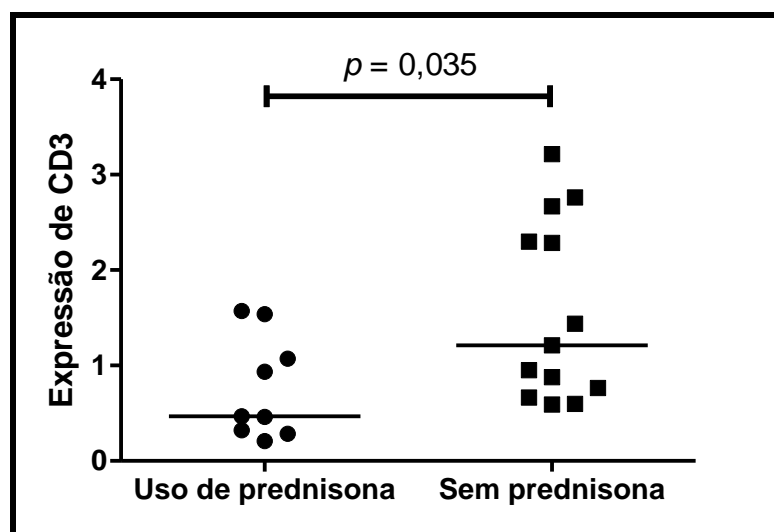


Figura 12. Influência da prednisona na imunoexpressão de CD3 na aorta de pacientes com arterite de Takayasu.

Barra transversal representa a mediana.





Nesse estudo, observamos que pacientes com AT e indivíduos com DA apresentam frequência aumentada de macrófagos, especialmente a subpopulação M1, de linfócitos T, linfócitos B e de células NK na aorta, em relação a doadores cadavéricos de transplante cardíaco. Macrófagos M2 são a única subpopulação que apresentam imunexpressão semelhante de seu marcador CD206 entre pacientes com AT, pacientes com DA e controles. Entre pacientes com AT, o macrófago é a célula mais frequentemente encontrada na aorta, seguidos por linfócitos T, linfócitos B e células NK. A imunexpressão do marcador CD206 de macrófagos M2 é significativamente maior em pacientes com AT, em relação ao marcador CD86 de macrófagos M1. Macrófagos e suas subpopulações são encontradas em todas as camadas da aorta e apesar da mediana da imunexpressão dos marcadores CD68, CD86 e CD206 ter sido maior na adventícia, essa diferença não foi significativa. Lesões ateroscleróticas na aorta levam à uma tendência à maior imunexpressão de macrófagos M2 na aorta em comparação a pacientes com AT que não apresentam lesões ateroscleróticas concomitantes. Atividade histológica da doença e uso de prednisona influenciam a frequência de linfócitos T na parede da aorta de pacientes com AT, mas não influenciam a imunexpressão de marcadores de macrófagos.

A escolha de dois grupos controles no estudo se deve ao fato de poder comparar a imunexpressão de marcadores na AT com uma doença de caráter inflamatório (83), ou seja, a DA e com indivíduos doadores de transplante cardíaco, sem evidências de doença da aorta. Além disso, a inclusão apenas de amostras da aorta torácica e ou abdominal nos grupos avaliados nesse estudo, excluindo outros leitos arteriais, teve o objetivo de tornar a avaliação da imunexpressão de cada marcador celular mais homogênea, pois cada leito arterial apresenta características próprias com diversas respostas observadas ao mesmo estímulo (84). Mesmo na aorta torácica e abdominal, apesar de serem artérias elásticas e com estruturas relativamente semelhantes, elas apresentam diferenças quanto à origem embrionária, propriedades bioquímicas e doenças que as afetam (85).

Conforme esperado e devido à natureza inflamatória da AT e da DA, a imunexpressão dos marcadores CD68, CD86, CD3, CD20 e CD56 foi significativamente maior em pacientes com AT e em pacientes com DA em relação a doadores cadavéricos de transplante cardíaco, porém o marcador CD206 de macrófagos M2 teve imunexpressão semelhante na aorta de indivíduos dos três grupos. Macrófagos residentes em artérias normais são observados principalmente

na adventícia e têm origem de precursores embrionários

CX3CR1<sup>+</sup> e de monócitos, apenas imediatamente após o nascimento, sendo auto renováveis ao longo da vida (86).

Contudo, esses achados podem sinalizar que macrófagos residentes em aorta de controle sem doença inflamatória expressam CD206 ou sinalizam a presença de algum estímulo alhures para transformação de fenótipo M0 para M2 em indivíduo doador de transplante cardíaco, em morte encefálica por outra causa, que não a inflamação arterial.

Nesse estudo, macrófagos e linfócitos T foram as células mais frequentemente encontradas na aorta de pacientes com AT, em comparação a linfócitos B e células NK. Tais achados sinalizam a importância de ambas as células para a fisiopatologia da AT que se caracteriza por vasculite crônica e granulomatosa, com linfócitos T CD4<sup>+</sup> iniciando e mantendo a inflamação granulomatosa e a formação de células gigantes multinucleadas, com a produção local de interferon (IFN) $\gamma$  pelo fenótipo Th1 (87). De fato, células mononucleares do sangue periférico de pacientes com AT produzem maiores níveis de IFN $\gamma$  quando estimuladas *in vitro*, em comparação a controles saudáveis e a pacientes com arterite de células gigante. Além disso, linfócitos T CD4<sup>+</sup> isolados de células mononucleares de sangue periférico de controles e em cultura, quando exposto ao soro de pacientes com AT em atividade, apresentam maior frequência de células que expressam IFN $\gamma$  em comparação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> expostos ao soro de pacientes com AT em remissão. Forte imunoexpressão de IFN $\gamma$  é observada no infiltrado inflamatório da aorta de pacientes com AT (37). Essas evidências falam a favor do perfil Th1 entre linfócitos T CD4<sup>+</sup> infiltrando a parede da artéria de pacientes com AT, o que nos levou a levantar a hipótese de que o fenótipo de macrófago predominantemente encontrado na aorta de pacientes com AT seria o fenótipo M1, pois os fenótipos M1/M2 de macrófagos são espelho dos fenótipos Th1/Th2 de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (88).

O achado do predomínio de macrófagos M2 em relação ao M1 na aorta de pacientes com AT foi uma grande surpresa nesse estudo, pela expectativa gerada de encontrar macrófagos, com as evidências de participação do perfil Th1 de resposta imune na fisiopatologia da AT e pelo fato da resposta Th2 ser menos relevante para a fisiopatologia da doença (18). Entretanto, marcadores fenotípicos de macrófagos M2 predominam em tecidos envolvidos pelo processo inflamatório de diferentes

vasculites sistêmicas incluindo arterite de células gigantes, vasculite por IgA e na inflamação granulomatosa de vias aéreas de pacientes com granulomatose com poliangiíte (78,81,89,90), apesar de grandes diferenças na fisiopatologia dessas vasculites sistêmicas. Além disso, a forma solúvel de CD163, receptor *scavenger* de macrófagos M2, se mostrou marcador de atividade de doença na arterite de células gigantes e na glomerulonefrite de vasculites associadas ao ANCA (79,91). A resposta Th2 está bem caracterizada em pacientes com granulomatose com poliangiíte, com um aumento na imunexpressão do fator de transcrição GATA-3, em relação ao Tbet (81) e na arterite de células gigantes, há alta frequência de linfócitos B na parede da artéria de pacientes com envolvimento de grandes vasos, em comparação a pacientes com o fenótipo craniano (92). Porém, na AT não há evidências de imunexpressão de GATA-3 ou de citocinas envolvidas na resposta Th2 na parede da aorta, incluindo IL-4 e IL13, como um possível espelho da presença de macrófagos M2; há apenas evidência de aumento de plasmablastos recém-formados em sangue periféricos, em pacientes com doença ativa (44).

Na AT, o processo inflamatório se inicia na adventícia com a chegada de células inflamatórias via *vasa vasorum* e se dissemina para todas as camadas da artéria (28). Por isso, avaliamos se haveria predomínio, em alguma das camadas da aorta, da imunexpressão do marcador pan-macrofágico CD68 e dos marcadores CD86 e CD206 para macrófagos M1 e M2, respectivamente. Esse foi o primeiro estudo que avaliou a distribuição de subpopulações de macrófagos nas diferentes camadas da aorta de pacientes com AT. Para todos os marcadores, especialmente para o CD206, a mediana da imunexpressão foi maior na adventícia em relação à média e à íntima, porém sem significância estatística, o que fala a favor de que nossos pacientes apresentaram maior tempo de processo inflamatório, já com distribuição de macrófagos por todas as camadas da aorta. Apesar da percepção de maior imunexpressão de marcadores de macrófagos na adventícia, a falta de diferenças significantes em relação à média e à íntima, pode ter sido causada pelo método escolhido para a quantificação da imunexpressão de cada marcador ou ser fruto do pequeno número de artérias avaliadas para esse fim, apenas cinco a seis aortas foram elegíveis para tal avaliação, por apresentarem distinção clara das três camadas.

Lesões ateroscleróticas são comumente observadas em artérias de pacientes com AT, especialmente na aorta torácica e em carótidas, e tais lesões ateroscleróticas

habitualmente se desenvolvem em sítios previamente afetados pelo processo

vasculítico (93). Na AT, a aterosclerose acelerada é atribuída à associação de fatores de risco tradicionais para doença coronariana e ao processo inflamatório da parede arterial (94,95). Em nosso estudo, a aorta de 27,3% dos pacientes com AT apresentaram lesões ateroscleróticas concomitantes, o que nos levou a avaliar se a presença de lesões ateroscleróticas exercia alguma influência sobre a imunoexpressão de marcadores de macrófagos. Observamos a presença de aterosclerose concomitante não teve influência sobre a imunoexpressão de marcadores macrofágicos na aorta de pacientes com AT, sendo observada apenas uma tendência à maior imunoexpressão do marcador CD206 de macrófagos M2 em pacientes com AT que apresentaram lesões ateroscleróticas, em comparação àqueles sem lesões ateroscleróticas na aorta. Na doença aterosclerótica tradicional, ambas as subpopulações de macrófagos M1 e M2 são encontradas. Macrófagos M2 são observados em regiões mais estáveis das lesões ateroscleróticas, enquanto macrófagos M1 se associam à progressão da lesão e a eventos cardiovasculares (96). De fato, eventos isquêmicos na AT envolvem mais frequentemente a circulação cerebral e de coronárias (94), mas nossos achados de tendência à maior imunoexpressão de marcador M2 na aorta de pacientes com AT não permitem concluir se tais lesões ateroscleróticas de aorta tendem à maior estabilidade ou não.

Nesse estudo, atividade de doença com base na avaliação clínica, não teve associação com o processo inflamatório ativo na parede da aorta. Essa dissociação entre inflamação sistêmica e inflamação na parede do vaso é bem conhecida na literatura, sendo comum na AT a persistência da inflamação vascular, mesmo após a supressão da atividade de doença clinicamente perceptível (97). Inflamação arterial ativa é observada em 44% dos pacientes com AT submetidos à cirurgia de revascularização, quando considerados em remissão da doença (4). Outro motivo para a discrepância entre atividade clínica e histológica observada em nosso estudo é a localização do processo inflamatório, que em pacientes com atividade clínica, o infiltrado inflamatório pode ser localizado em outra artéria que não a aorta. Nenhum marcador avaliado nesse estudo apresentou maior imunoexpressão em pacientes com atividade clínica da doença.

A análise da associação entre a imunoexpressão de marcadores celulares na aorta e atividade histológica na AT demonstrou maior imunoexpressão de CD3,

marcador pan-T, em pacientes com inflamação ativa na parede da aorta em comparação àqueles sem lesões inflamatórias ativas na aorta, enquanto nenhuma diferença significativa foi observada para os outros marcadores, inclusive de macrófagos. Esse achado denota a importância do linfócito T na patogênese da AT, o que já foi demonstrado em outro estudo, com aproximadamente 30% das células no infiltrado inflamatório compostas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em artérias de pacientes com AT (32) e, de fato, linfócitos T têm a tarefa de orquestrar o processo inflamatório e de atuar como células efetoras na parede arterial (18). Entretanto, não há estudos demonstrando quais subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> predominam na parede da aorta de pacientes com AT. Outros marcadores de macrófagos, macrófagos M1 e M2, linfócitos B e de células NK não apresentaram relações significantes com inflamação ativa na parede da aorta de pacientes com AT, o que poderia ser esperado para macrófagos, devido a seu papel importante tanto no processo inflamatório ativo, quanto no processo de reparação e cicatrização (63).

A maioria dos pacientes com AT incluídos no estudo estavam sem tratamento imunossupressor e/ou com agente biológico. Além disso, a mediana da dose diária de prednisona foi relativamente baixa, o que permite uma avaliação mais fidedigna do infiltrado inflamatório na parede arterial de pacientes com AT, com menor influência da terapia. Portanto, pelo pequeno número de pacientes em tratamento, foi possível apenas a influência da prednisona sobre os grupos celulares avaliados na aorta de pacientes com AT. A prednisona afeta seletivamente a população de células CD3<sup>+</sup>, mas sem alterações significativas em células CD68<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> e CD206<sup>+</sup>. Esses achados vão contra a expectativa de influência esperada do glicocorticoide na diferenciação de macrófagos M2, principalmente a subpopulação M2c, cujo fenótipo é induzido pela exposição de macrófagos a glicocorticoides, à IL-10 e ao TGFβ (70). Em vasculites associadas ao ANCA, o uso de prednisona se associou ao aumento da imunexpressão de células CD68<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> e CD163<sup>+</sup>, mas imunossupressores levaram ao aumento da imunexpressão do CD163 em vias aéreas superiores de pacientes com granulomatose com poliangiíte (81). Em outro estudo, o soro de pacientes com vasculites associadas ao ANCA, induziu o fenótipo M2c *in vitro*, em cultura de macrófagos de doadores saudáveis, entretanto, esse achado foi independente do uso de prednisona (80).

O efeito da prednisona sobre subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetores é bem conhecido em pacientes com vasculites de grandes vasos. Na arterite de células

gigantes, o uso de prednisona está associado à supressão de células T CD4<sup>+</sup> Th17 em artérias temporais superficiais, com persistência de células T CD4<sup>+</sup> Th1 (98). Na AT, dois estudos abordaram este tópico e apresentaram resultados opostos. A produção *in vitro* de citocinas ligadas à resposta Th1 é menor em células mononucleares de pacientes com AT tratados com prednisona em relação àqueles sem nenhum tratamento com prednisona, enquanto nenhuma diferença foi observada em relação à produção de citocinas ligadas à resposta Th1 (37). Contudo, o efeito do glicocorticoide *in vivo* foi diferente em outro estudo, onde observou-se que pacientes com AT em uso de prednisona apresentaram menores níveis circulantes de citocinas ligadas à resposta Th17 em relação àqueles sem tratamento com glicocorticoides, enquanto nenhum efeito foi observado com o uso de prednisona em relação à concentração sérica de citocinas ligadas à resposta Th1 (39).

Apesar da imunoexpressão dos marcadores de linfócitos B e de células NK ter sido significativamente maior na AT e na DA em relação a controles, esses dois tipos celulares foram os menos observados em artérias de pacientes com AT, em relação a macrófagos e a linfócitos T. Além disso, nenhuma associação foi observada entre linfócitos B ou células NK com atividade clínica ou histológica de doença, com aterosclerose concomitante ou com uso de prednisona na AT. Tais achados podem indicar menor relevância dessas células na patogênese da doença.

A imunoexpressão de marcadores de linfócitos B e de células NK em infiltrado inflamatório de artérias de pacientes com AT já foi descrita por outros autores na literatura (30,99). Linfócitos B são células efetoras da imunidade adaptativa que expressam imunoglobulinas de superfície, de forma clonal, que têm o objetivo de reconhecer e apresentar antígenos específicos. Além disso, linfócitos B produzem citocinas pró e anti-inflamatórias e se diferenciam em células secretoras de anticorpos como plasmablastos e plasmócitos de longa vida (100). Os linfócitos B não são abundantes na aorta de pacientes com AT, como observado na arterite de células gigantes, mas há autores que admitem que há um papel da resposta humoral na patogenia da AT (30,92). As evidências da produção de auto anticorpos anti células endoteliais, anticorpos anticardiolipina, antiferritina e antiaorta em pacientes com AT falam a favor de ativação humoral na AT (40). Além disso, o número aumentado de plasmablastos recém-formados na AT em atividade e a resposta de alguns pacientes com AT ao tratamento com o anticorpo monoclonal anti-CD20, em série de casos, apontam para alguma participação das células B na patogênese da AT (44).

As células NK têm importante função como linfócitos efetores da imunidade inata, com atividade antiviral e antineoplásica. Essas células produzem grandes quantidades de IFN $\gamma$  e têm a capacidade de destruir células alvo (101). Embora o marcador CD56 de células NK ter apresentado baixa imunoexpressão em aorta de pacientes com AT em nosso estudo, um estudo prévio de Seko *et al* descreveu infiltrado inflamatório na parede da artéria de pacientes com AT composto principalmente por linfócitos T  $\gamma\delta$ , células NK, macrófagos, linfócitos T citotóxicos e auxiliares. As células citotóxicas, especialmente células NK, produziam grande quantidade de perforina, juntamente com linfócitos T citotóxicos e linfócitos T  $\gamma\delta$ , direcionada a células vasculares, causando potencial dano à parede arterial (32).

As principais limitações do estudo incluem grupo controle com idade superior à de pacientes com AT, a falta de informações sobre reagentes fase aguda de alguns pacientes e o uso de terapia para a AT por alguns pacientes. A idade mais avançada do grupo controle, ou seja, de indivíduos aparentemente saudáveis e doadores de transplante cardíaco, pode estar associada ao maior número de co-morbidades e até a aterosclerose subclínica, o que aumentaria a chance da presença de células inflamatórias na aorta. A não avaliação de neutrófilos também pode ser considerada outra limitação do estudo, pois apesar da inflamação granulomatosa da AT ser considerada crônica, neutrófilos também foram observados na parede da aorta de pacientes com AT (dados não relatados), o que indica provável papel relevante de neutrófilos na AT. Além disso, neutrófilos expressam marcadores observados em macrófagos M1, como óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e o CD86 (102,103). A avaliação da correlação entre a imunoexpressão de marcadores celulares na aorta e reagentes de fase aguda (VHS e PCR) foi prejudicada, pela falta de informações sobre essas variáveis na AT, especialmente em pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico em outros serviços. Alguns pacientes aparentemente em remissão, foram avaliados no estudo, porém já estavam em uso de terapia imunossupressora ou de agentes imunobiológicos, resultando em possível influência na imunoexpressão das células mensuradas.



## **8. CONCLUSÃO**

---

Os resultados obtidos nesse estudo descrevem o perfil de macrófagos na aorta de pacientes com AT. Diante disso, os principais resultados observados foram:

- A quantificação da imunexpressão de marcadores celulares demonstrou que pacientes com AT e aqueles com DA apresentam maior imunexpressão de marcadores de macrófagos, macrófagos M1, linfócitos T, linfócitos B e células NK em relação aos doadores cadavéricos de transplante cardíaco. Mas, a imunexpressão do CD206, marcador de macrófagos M2 foi semelhante nos três grupos avaliados.
- Na aorta de pacientes com AT, observa-se maior imunexpressão do CD206, marcador de macrófagos M2, em comparação à imunexpressão de CD86, marcador de macrófagos M1. Porém, o marcador do macrófago M1 tem maior imunexpressão na aorta de pacientes com AT em relação a doadores cadavéricos de transplante cardíaco.
- Macrófagos foram observados em todas as camadas da parede da aorta de pacientes com AT: íntima, média e adventícia. Não houve diferença significativa quanto à imunexpressão de marcadores de macrófagos nas diferentes camadas, mas observamos que a mediana da imunexpressão dos marcadores CD68, CD86 e CD206 foi ligeiramente superior na camada adventícia, em relação às camadas média e íntima.
- A presença de doença aterosclerótica concomitante na aorta de pacientes com AT não influenciou, de forma significativa, a imunexpressão de marcadores de macrófagos e suas subpopulações, linfócitos T, linfócitos B e células NK.
- Atividade clínica de doença na AT também não influenciou, de forma significativa, a imunexpressão de marcadores de macrófagos e suas subpopulações, linfócitos T, linfócitos B e células NK.
- A presença de infiltrado inflamatório ativo, ou seja, atividade histológica na aorta de pacientes com AT, foi associada à maior imunexpressão do marcador CD3 de linfócitos T na parede da aorta, mas não influenciou marcadores de macrófagos e de seus subtipos.

- A terapia com prednisona levou à redução, de forma significativa, da imunoexpressão do marcador CD3<sup>+</sup> de linfócitos T na parede da aorta de pacientes com AT, mas não influenciou marcadores de macrófagos e de seus subtipos.

## **9. REFERÊNCIAS**

---

1. Terao C. History of Takayasu arteritis and Dr. Mikito Takayasu. *Int J Rheum Dis*. 2014;17(8):931–5.
2. Matsubara J. Mikito Takayasu and Jokichi Takamine, Two Famous Japanese Doctors Who Were from Kanazawa, Japan. *Japanese J Vasc Surgery*. 2003;12(Mm):563–569.
3. Bersohn I, Politzer WM, Blumsohn D. Arcus senilis corneae--its relationship to serum lipids in the South African Bantu. *South African Med J*. 1969;43(33):1025–7.
4. Kerr GS, Hallahan CW, Giordano J, Leavitt RY, Fauci AS, Rottem M HG. Takayasu arteritis. *Ann Intern Med*. 1994;120(11):919-29. 1994. p. 919-29.
5. Mason JC. Takayasu arteritis advances in diagnosis and management. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(7):406–15.
6. Maksimowicz-McKinnon K, Hoffman GS. Takayasu Arteritis: What is the Long-Term Prognosis? *Rheum Dis Clin North Am*. 2007;33(4):777–86.
7. Onen F AN. Epidemiology of Takayasu arteritis. *Press Med*. 2017;46((7-8 Pt 2)):e197–203.
8. Birlik M, Kücükayas Y, Aksu K, Solmaz D, Can G, Taylan A, Akar S SI, Keser G, Onen F AN. Epidemiology of Takayasu's arteritis in Turkey. *Clin Exp Rheumatol*. 2016;34(3 Suppl 97):S33–9.
9. Gudbrandsson B, Molberg Ø, Garen T PØ. Prevalence, Incidence, and Disease Characteristics of Takayasu Arteritis by Ethnic Background: Data From a Large, Population-Based Cohort Resident in Southern Norway. *Arthritis Care Res*. 2017;69(2):278–85.
10. Sato EI, Hatta FS, Levy-Neto M FS. Demographic, clinical, and angiographic data of patients with Takayasu arteritis in Brazil. *Int J Cardiol*. 1998;66(Suppl 1):S67–70.
11. Koide K. Takayasu arteritis in Japan. *Hear Vessel Suppl*. 1992;7:48–54.
12. Arnaud L, Haroche J, Limal N, Toledano D, Gambotti L CCN, Le Thi Huong Boutin D, Cacoub P, Cluzel P, Koskas F, Kieffer E, Piette JC A, Z. Takayasu arteritis in France: a single-center retrospective study of 82 cases comparing white, North African, and black patients. *Med*. 2010;89(1):1–17.

13. Li J, Sun F, Chen Z, Yang Y, Zhao J, Li M, Tian X ZX. The clinical characteristics of Chinese Takayasu's arteritis patients: a retrospective study of 411 patients over 24 years. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):107.
14. Sheikhzadeh A, Tettenborn I, Noohi F, Eftekharzadeh M SA. Occlusive thromboaropathy (Takayasu disease): clinical and angiographic features and a brief review of literature. *Angiology.* 2002;53(1):29–40.
15. Sharma BK, Sagar S, Singh AP SS. Takayasu arteritis in India. *Hear Vessel Suppl.* 1992;7:37–43.
16. Rosenthal T, Morag B, Rubinstein Z IY. Takayasu arteritis in Israel--update. *Int J Cardiol.* 1996;54(Suppl):S137–40.
17. Toshihiko N. Current status of large and small vessel vasculitis in Japan. *Int J Cardiol.* 1996;54(Suppl):91–8.
18. Arnaud L, Haroche J, Mathian A, Gorochov G, Amoura Z. Pathogenesis of Takayasu's arteritis: A 2011 update. *Autoimmun Rev.* 2011;11(1):61–7.
19. Renauer P SA. The genetics of Takayasu arteritis. *Press Med.* 2017;46(7-8 2):e179–87.
20. Terao C, Yoshifuji H, Ohmura K, Murakami K, Kawabata D, Yurugi K TJ, Kinoshita H, Kimura A, Akizuki M, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Miura Y MT, Saji H, Mimori T MF. Association of Takayasu arteritis with HLA-B 67:01 and two amino acids in HLA-B protein. *Rheumatol.* 2013;52(10):1769–74.
21. Saruhan-Direskeneli G, Hughes T, Aksu K, Keser G, Coit P, Aydin SZ, et al. Identification of multiple genetic susceptibility loci in Takayasu arteritis. *Am J Hum Genet.* 2013;93(2):298–305.
22. Takamura C, Ohhigashi H, Ebana Y IM. New human leukocyte antigen risk allele in Japanese patients with Takayasu arteritis. *Circ J.* 2012;76(7):1697–702.
23. Lv N, Wang Z, Dang A, Zhu X, Liu Y, Zheng D LG. HLA-DQA1, DQB1 and DRB1 alleles associated with Takayasu arteritis in the Chinese Han population. *Hum Immunol.* 2015;76(4):241-244.
24. Espinoza J, Ai S, Matsumura I. New Insights on the Pathogenesis of Takayasu Arteritis: Revisiting the Microbial Theory. *Pathogens.* 2018;7(3):73.
25. Karadag O, Aksu K, Sahin A, Zihni FY, Sener B, Inanc N, Kalyoncu U, Aydin SZ,

- Ascioglu S, Ocakci PT, Bilgen SA, Keser G, Inal V, Direskeneli H, Calguneri M, Ertenli I KS. Assessment of latent tuberculosis infection in Takayasu arteritis with tuberculin skin test and Quantiferon-TB Gold test. *Rheumatol Int.* 2010;30(11):1483–7.
26. Arnaud L, Cambau E, Brocheriou I, Koskas F, Kieffer E, Piette JC AZ. Absence of *Mycobacterium tuberculosis* in arterial lesions from patients with Takayasu's arteritis. *J Rheumatol.* 2009;36(8):1682–5.
27. Carvalho ES, de Souza AWS, Leão SC, Levy-Neto M, de Oliveira RS, Drake W, et al. Absence of mycobacterial DNA in peripheral blood and artery specimens in patients with Takayasu arteritis. *Clin Rheumatol.* 2017;36(1):205–8.
28. Hotchi M. Pathological studies on Takayasu arteritis. *Heart Vessel Suppl.* 1992;7:11–7.
29. Y. S. Takayasu arteritis: insights into immunopathology. *Jpn Heart J.* 2000;41(1):15–26.
30. Inder SJ, Bobryshev YV, Cherian SM, Wang AY, Lord RS, Masuda K YC. Immunophenotypic analysis of the aortic wall in Takayasu's arteritis: involvement of lymphocytes, dendritic cells and granulocytes in immuno-inflammatory reactions. *Cardiovasc Surg.* 2000;8(2):141–8.
31. Vaideeswar P DJ. Pathology of Takayasu arteritis: A brief review. *Ann Pediatr Cardiol.* 2013;6(1):52–8.
32. Y Seko, S Minota, A Kawasaki, Y Shinkai, K Maeda, H Yagita, K Okumura, O Sato, A Takagi YT. Perforin-secreting killer cell infiltration and expression of a 65-kD heat-shock protein in aortic tissue of patients with Takayasu's arteritis. *J Clin Invest.* 1994;93(2):750–8.
33. Seko Y, Sugishita K, Sato O, Takagi A, Tada Y, Matsuo H, Yagita H, Okumura K NR. Expression of costimulatory molecules (4-1BBL and Fas) and major histocompatibility class I chain-related A (MICA) in aortic tissue with Takayasu's arteritis. *J Vasc Res.* 2004;41(1):84–90.
34. Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ WC. Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. *Circulation.* 2008;118(12):1276–84.

35. Weyand CM GJ. Medium- and large-vessel vasculitis. *N Engl J Med.* 2003;349(2):160–9.
36. Waite JC SD. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int J Inflam.* 2012;2012(819467).
37. Saadoun D, Garrido M, Comarmond C, Desbois AC, Domont F, Savey L, et al. Th1 and Th17 cytokines drive inflammation in takayasu arteritis. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(5):1353–60.
38. Savioli B, Abdulahad WH, Brouwer E, Kallenberg CGM, de Souza AWS. Are cytokines and chemokines suitable biomarkers for Takayasu arteritis? *Autoimmun Rev.* 2017;16(10).
39. Savioli B, Salu BR, De Brito MV, Oliva MLV, De Souza AWS. Silent arterial inflammation during the apparent remission state of Takayasu's arteritis. What do cytokines tell us? *Clin Exp Rheumatol.* 2018;36.
40. Silva De Souza AW. Autoantibodies in systemic vasculitis. *Front Immunol.* 2015;6(APR).
41. Wang H, Ma J, Wu Q, Luo X, Chen Z, Kou L. Circulating B lymphocytes producing autoantibodies to endothelial cells play a role in the pathogenesis of Takayasu arteritis. *J Vasc Surg.* 2011;53(1):174–80.
42. Mackay F, Schneider P, Rennert P BJ. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:231–64.
43. Nishino Y, Tamai M, Kawakami A, Koga T, Makiyama J, Maeda Y JY, Miyashita T, Izumi Y, Eguchi K MK. Serum levels of BAFF for assessing the disease activity of Takayasu arteritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(1 Suppl 57):14-17.
44. Hoyer BF, Mumtaz IM, Loddenkemper K, Bruns A, Sengler C, Hermann KG, et al. Takayasu arteritis is characterised by disturbances of B cell homeostasis and responds to B cell depletion therapy with rituximab. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(1):75–9.
45. Maksimowicz-McKinnon K, Clark TM HG. Limitations of Therapy and a Guarded Prognosis in an American Cohort of Takayasu Arteritis Patients. *Arthritis Rheum.* 2007;56(3):1000–9.
46. Numano F, Okawara M, Inomata H KY. Takayasu's arteritis. *Lancet.*



- 2000;356(9234):1023–5.
47. Sharma BK, Jain S, Sagar S. Systemic manifestations of Takayasu arteritis: The expanding spectrum. *Int J Cardiol.* 1996;54(SUPPL.):S149–54.
  48. De Souza AWS, de Carvalho JF. Diagnostic and classification criteria of Takayasu arteritis. *J Autoimmun.* 2014;48–49:79–83.
  49. Pascual-López M, Hernández-Núñez A, Aragüés-Montañés M, Daudén E FJ, A G-D. Takayasu's Disease with Cutaneous Involvement. *Dermatology.* 2004;208(1):10–5.
  50. Comarmond C, Biard L, Lambert M, Mekinian A, Ferfar Y, Kahn JE BY, Chiche L, Koskas F, Cluzel P, Hachulla E, Messas E, Resche-Rigon M CP, Mirault T SDFTN. Long-Term Outcomes and Prognostic Factors of Complications in Takayasu Arteritis: A Multicenter Study of 318 Patients. *Circulation.* 2017;136(12):1114–22.
  51. Andrews J MJ. Takayasu's arteritis--recent advances in imaging offer promise. *Rheumatol.* 2007;46(1):6–15.
  52. Barra L, Kanji T, Malette J PCC. Imaging modalities for the diagnosis and disease activity assessment of Takayasu's arteritis: A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev.* 2018;17(2):175-187.
  53. De Souza AWS, de Carvalho JF. Diagnostic and classification criteria of Takayasu arteritis. *J Autoimmun.* 2014;48–49.
  54. Ishikawa K. Diagnostic approach and proposed criteria for the clinical diagnosis of Takayasu's arteriopathy. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12(4):964–72.
  55. Arend WP, Michel BA, Bloch DA, Hunder GG, Calabrese LH, Edworthy SM, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum.* 1990 Aug;33(8):1129–34.
  56. Sharma BK, Jain S, Suri S NF. Diagnostic criteria for Takayasu arteritis. *Int J Cardiol.* 1996;54(Suppl):S141-7.
  57. Hoffman GS, Merkel PA, Brasington RD, Lenschow DJ LP. Anti-tumor necrosis factor therapy in patients with difficult to treat Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(7):2296–304.
  58. Misra R, Danda D, Rajappa SM, Ghosh A, Gupta R, Mahendranath KM, et al.

- Development and initial validation of the Indian Takayasu Clinical Activity Score (ITAS2010). *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Oct;52(10):1795–801.
59. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE TP. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013;14(10):986–895.
60. Wynn TA, Chawla A PJ. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*. 2013;496(7446):445–55.
61. Shi C PE. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762–74.
62. Mosser DM EJ. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958–69.
63. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A LM. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229(2):176–85.
64. Sica A MA. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787–95.
65. de Sousa JR, Sotto MN SQJ. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. *Front Immunol*. 2017;8(1635).
66. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G SB. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev*. 2014;262(1):153–66.
67. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 2003;73(2):209–12.
68. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M VE, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R OT. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4560–5.
69. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A LM. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-686.
70. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M ES, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT SA. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018;233(9):6425–40.

71. Murray PJ WT. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723–37.
72. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, Shipley JM G, P, Noble P, Chen Q, Senior RM EJ. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med.* 2001;194(6):809–21.
73. Grinberg S, Hasko G, Wu D LS. Suppression of PLCbeta2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype. *Am J Pathol.* 2009;175(6):2439–53.
74. Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Cronstein BN, Hasko G OS, SJ. L. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R $\alpha$ ) signaling. *Inflammation.* 2013;36(4):921–31.
75. Gleissner CA. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front Physiol.* 2012;3(1).
76. de Sousa JR, Lucena Neto FD, Sotto MN QJ. Immunohistochemical characterization of the M4 macrophage population in leprosy skin lesions. *BMC Infect Dis.* 2018;18(1):576.
77. Erbel C, Wolf A, Lasitschka F, Linden F, Domschke G, Akhavanpoor M DA, Katus HA GC. Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability. *Int J Cardiol.* 2015;186:219–25.
78. Zhao L, David MZ, Hyjek E, Chang A MS. M2 macrophage infiltrates in the early stages of ANCA-associated pauci-immune necrotizing GN. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(1):54–62.
79. O'Reilly VP, Wong L, Kennedy C, Elliot LA, O'Meachair S, Coughlan AM O, EC, Ryan MM, Sandoval D, Connolly E, Dekkema GJ, Lau J, Abdulahad WH SJ, Heeringa P, Buckley C, O'Brien C, Finn S, Cohen CD, Lindemeyer MT HF, O'Hara PV, Feighery C, Moran SM, Mellotte G, Clarkson MR, Dorman AJ MP, MA. L. Urinary Soluble CD163 in Active Renal Vasculitis. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(9):2906–1916.

80. Ohlsson SM, Linge CP, Gullstrand B, Lood C, Johansson A, Ohlsson S L, A, Bengtsson AA, Carlsson F HT. Serum from patients with systemic vasculitis induces alternatively activated macrophage M2c polarization. *Clin Immunol.* 2014;152(1–2):10–9.
81. de Souza AWS, van Timmeren M, Sanders J-S, Stegeman C, Heeringa P, Kallenberg CGM, et al. M2 macrophage is the predominant phenotype in airways inflammatory lesions in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1).
82. van der Geest KS, Abdulahad WH, Chalan P, Rutgers A, Horst G HM, Roffel MP, Roozendaal C, Kluin PM, Bos NA, Boots AM BE. Disturbed B cell homeostasis in newly diagnosed giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(7):1927–38.
83. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-1695.
84. Rosenberg RD AW. Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med.* 1999;340(20):1555–64.
85. Kau T, Sinzig M, Gasser J, Lesnik G, Rabitsch E, Celedin S, Eicher W I, H HK. Aortic development and anomalies. *Semin Interv Radiol.* 2007;24(2):141–52.
86. Ensan S, Li A, Besla R, Degousee N, Cosme J, Roufaiel M SE, El-Maklizi M, Williams JW, Robins L, Li C, Lewis B, Yun TJ, Lee JS WP, Khattar R, Farrokhi K, Byrne J, Ouzounian M, Zavitz CC, Levy GA, Bauer CM L, P, Husain M, Swirski FK, Cheong C, Prinz M, Hilgendorf I, Randolph GJ ES, Gramolini AO, Cybulsky MI, Rubin BB RC. Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat Immunol.* 2016;17(2):159–68.
87. Sneller MC. Granuloma formation, implications for the pathogenesis of vasculitis. *Cleve Clin J Med.* 2002;69(Suppl 2):S1140-S1143.
88. Biswas SK MA. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010;2010(11):10.
89. Kim J, Choi SE, Lee KH, Jeong HJ, Shin JI LB. Tubulointerstitial Infiltration of M2 Macrophages in Henoch-Schönlein Purpura Nephritis Indicates the

- Presence of Glomerular Crescents and Bad Clinical Parameters. *Biomed Res Int.* 2019;8579619.
90. Albano-Aluquin S, Malysz J, Kidacki M, Ratnam M ON. An Immunohistopathologic Study to Profile the Folate Receptor Beta Macrophage and Vascular Immune Microenvironment in Giant Cell Arteritis. *J Vis Exp.* 2019;144.
  91. van Sleen Y, Sandovici M, Abdulahad WH, Bijzet J, van der Geest KSM, Boots AMH BE. Markers of angiogenesis and macrophage products for predicting disease course and monitoring vascular inflammation in giant cell arteritis. *Rheumatol.* 2019;
  92. Graver JC, Boots AMH, Haacke EA, Diepstra A, Brouwer E SM. Massive B-Cell Infiltration and Organization Into Artery Tertiary Lymphoid Organs in the Aorta of Large Vessel Giant Cell Arteritis. *Front Immunol.* 2019;10(83).
  93. Seyahi E, Ucgul A, Cebi Olgun D, Ugurlu S, Akman C, Tutar O YS, H. Y. Aortic and coronary calcifications in Takayasu arteritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43(1):96–104.
  94. Alibaz-Oner F, Koster MJ, Unal AU, Yildirim HG, Çikikçi C, Schmidt J C, CS, Makol A, Ytterberg SR, Matteson EL, Direskeneli H WK. Assessment of the frequency of cardiovascular risk factors in patients with Takayasu's arteritis. *Rheumatol.* 2017;56(11):1939-1944.
  95. De Souza AWS, Serrano De Lima C, Oliveira ACD, Machado LSG, Pinheiro FAG, Hix S, et al. Homocysteine levels in takayasu arteritis-A risk factor for arterial ischemic events. *J Rheumatol.* 2013;40(3).
  96. de Gaetano M, Crean D, Barry M BO. M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis. *Front Immunol.* 2016;7(275).
  97. Keser G, Aksu K DH. Discrepancies between vascular and systemic inflammation in large vessel vasculitis: an important problem revisited. *Rheumatol.* 2018;57(5):785–90.
  98. Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ WC. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation.* 2010;121(7):906–15.

99. Inder SJ, Bobryshev YV, Cherian SM, Lord RS, Masuda K YC. Accumulation of lymphocytes, dendritic cells, and granulocytes in the aortic wall affected by Takayasu's disease. *Angiology*. 2000;51(7):565–79.
100. LeBien TW TT. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570–80.
101. O'Brien KL FD. Immunometabolism and natural killer cell responses. *Nat Rev Immunol*. 2019;
102. Sandilands GP, Ahmed Z, Perry N, Davison M, Lupton A YB. Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology*. 2005;114(3):354–68.
103. Saini R SS. Inducible nitric oxide synthase: An asset to neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2019;105(1):49-61.



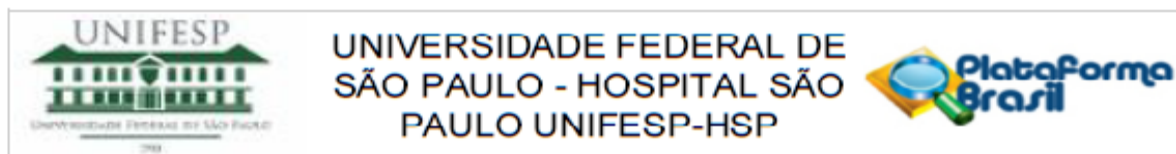
## Anexo 1 – Critérios de Ishikawa modificados por Sharma (8)

Critérios	Definição
<b>Critérios major</b>	
1. Lesão na porção média da artéria subclávia esquerda	A estenose ou oclusão mais severa surge na porção média da distância compreendida entre o ponto situado a 1 cm proximalmente em relação ao orifício da artéria vertebral até ao ponto situado a 3 cm distalmente em relação ao orifício determinado pela angiografia
2. Lesão na porção média da artéria subclávia direita	A estenose ou oclusão mais severa surge na porção média da distância compreendida entre o orifício da artéria vertebral direita até ao ponto situado a 3 cm distalmente em relação ao orifício determinado pela > angiografia
3. Sinais e sintomas característicos com pelo menos um mês de duração	Estes incluem claudicação dos membros, ausência de pulso ou diferença entre pulsos, tensão arterial não mensurável ou com uma diferença > a 10 mmHg na sistólica, febre, cervicálgia, amaurose transitória, visão turva, síncope, dispneia ou palpitações
<b>Critérios minor</b>	
1. Velocidade de sedimentação elevada	VS persistentemente elevada e de forma inexplicada (> 20 mm/h) na altura do diagnóstico ou presença da evidência na história do doente
2. Artéria carótida sensível à palpação	Sensibilidade à palpação das artérias, uni ou bilateralmente. Sensibilidade dos músculos do pescoço não é aceitável
3. Hipertensão	Tensão arterial persistentemente > 140/mmHg na braquial ou > 160/90 mmHg na poplítea
4. Regurgitação aórtica ou ectasia anuloaórtica	Por auscultação ou ecocardiograma com doppler ou angiografia Por angiografia ou ecocardiograma bidimensional
5. Lesão da artéria pulmonar	Oclusão ou equivalente da artéria lobar ou segmentar determinada por angiografia ou cintigrafia de perfusão, ou presença de estenose, aneurisma, irregularidade luminal ou qualquer combinação no tronco pulmonar ou numa ou ambas as artérias pulmonares determinada por angiografia
6. Lesão na porção média da artéria carótida primitiva esquerda	Presença de estenose ou oclusão mais severa na porção média dos 5 cm de comprimento compreendidos entre o ponto situado 2 cm distalmente em relação ao orifício determinado por angiografia
7. Lesão do tronco braquiocefálico distal	Presença da estenose ou oclusão mais severa no terço distal determinada por angiografia
8. Lesão da artéria torácica descendente	Estreitamento, dilatação ou aneurisma, irregularidade luminal ou qualquer combinação determinada por angiografia; tortuosidade sozinha não é aceitável
9. Lesão da aorta abdominal	Estreitamento, dilatação ou aneurisma, irregularidade luminal ou combinação com aneurisma
10. Lesão de artéria coronária	Documentada na angiografia em indivíduos com menos de 30 anos na ausência de factores de risco como hiperlipidemia ou diabetes mellitus

Para o diagnóstico de arterite de Takayasu são necessários 2 critérios major ou 1 critério major e 2 minor ou 4 critérios minor.



## Anexo 2 – Parecer consubstanciado do CEP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do infiltrado de macrófagos na parede arterial de pacientes com arterite de Takayasu

**Pesquisador:** João Paulo dos Santos

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 49602615.3.0000.5505

**Instituição Proponente:** Instituto Paulista de Reumatologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.373.136

**Apresentação do Projeto:**

CEP UNIFESP: 1210/2015

Estudo transversal para analisar espécimes de artérias de pacientes com arterite de Takayasu e controles com doença aterosclerótica e sem arteriopatia.

Será realizado um estudo transversal utilizando a técnica de imunohistoquímica para avaliar o infiltrado de linfócitos T e linfócitos B, células NK e de macrófagos M1 e M2 na parede de artérias de pacientes com AT previamente submetidos à cirurgia de revascularização ou que faleceram e foram submetidos à necropsia. Como grupo controle, serão utilizados indivíduos submetidos à cirurgia de revascularização por doença aterosclerótica e controles submetidos à autópsia devido ao óbito por outra causa que não AT ou doença aterosclerótica.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar qual o fenótipo de macrófagos M1/M2 predomina no infiltrado inflamatório da parede arterial de pacientes com AT.

**Objetivo Secundário:**

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

**Bairro:** VILA CLEMENTINO

**CEP:** 04.023-061

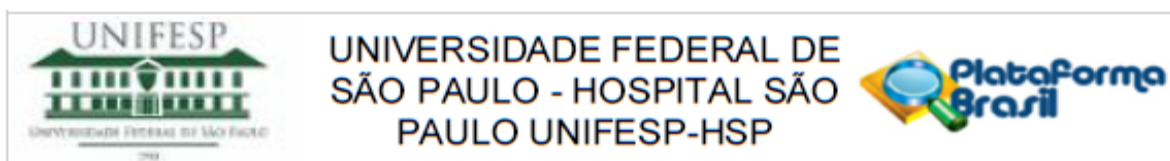
**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)5571-1062

**Fax:** (11)5539-7162

**E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.373.136

Descrever a localização do infiltrado de macrófagos na parede arterial em pacientes com AT.

Analisar associações entre o infiltrado de macrófagos e de linfócitos T, linfócitos B e células NK na parede arterial.

Comparar o infiltrado de macrófagos M1/M2 na parede arterial de pacientes com AT ao observado em doença aterosclerótica e em indivíduos que não apresentam AT ou aterosclerose.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Não há.

Benefícios:

Melhor conhecimento sobre a fisiopatologia da doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa retrospectiva a ser realizada com amostras biológicas emblocadas em parafina, arquivadas no Departamento de Patologia da UNIFESP

**Considerações sobre os Temos de apresentação obrigatória:**

Apresentados os documentos obrigatórios

**Recomendações:**

Incluir o nome do pesquisador principal também no TCLE

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

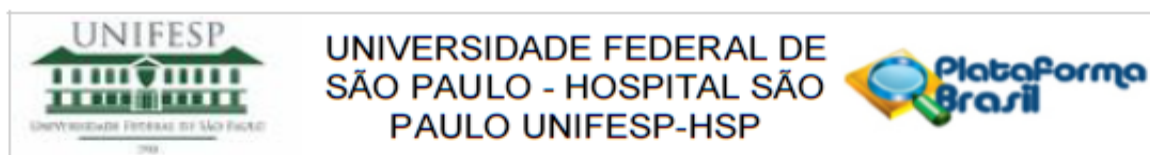
O pesquisador apresentou de forma adequada, respostas aos questionamentos emitidos como pendências:

Pendência 1- Pesquisador apresentou carta de concordância do chefe do Departamento de Patologia para o uso das amostras nesta pesquisa. No entanto, observamos que o mesmo faz parte da equipe de pesquisa, configurando conflito de interesses. Apresentar outra carta assinada por outro representante do Departamento.

Resposta: Incluímos carta de concordância assinada pela vice-chefe do Departamento de Patologia (Profa. Dra. Thais Heinke) a qual não participará do estudo.

Análise: pendência atendida

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.373.136

**Pendência 2** - A utilização de material armazenado no Departamento de Patologia, seja obtido de procedimento cirúrgico ou de autópsia, implica na obtenção de autorização do paciente para uso do material na pesquisa, ou justificativa da impossibilidade de contato com o paciente para obtenção do TCLE. Apresenta TCLEs para amostras coletadas de procedimento cirúrgico e que podem estar ainda em acompanhamento no hospital. Apresentar TCLE para uso do material de autópsia (dirigido ao familiar) ou justificativa da impossibilidade de obtenção do TCLE. Lembramos que a carta apresentada, do Departamento de Patologia, é para o uso de amostras coletadas até 2005.

**Resposta:** Elaboramos dois TCLEs, um para assinatura de familiares de pacientes falecidos e submetidos à autópsia e outro para pacientes ainda em acompanhamento submetidos ao procedimento cirúrgico (anexos no projeto de pesquisa). Para os casos de impossibilidade de obtenção do TCLE, elaboramos um documento de justificativa da dispensa do TCLE.

**Análise:** Pendência atendida com recomendação- incluir o nome do pesquisador principal também no TCLE

#### Considerações Finais a critério do CEP:

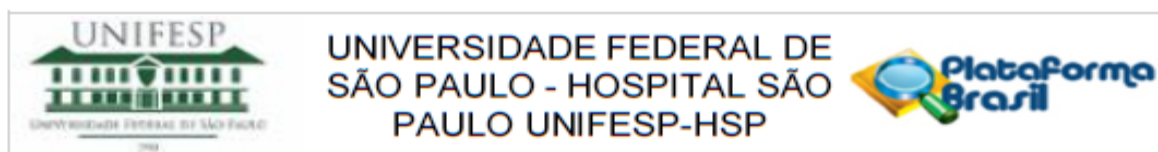
CEP - não consta da lista de documentos, os pareceres anteriores.

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_587644.pdf	30/11/2015 20:45:04		Aceito
Outros	Carta_de_concordancia_2.pdf	30/11/2015 20:43:24	João Paulo dos Santos	Aceito
Outros	Projeto_Macrofagos_Takayasu_CEP3.docx	30/11/2015 20:38:08	João Paulo dos Santos	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP2.doc	30/11/2015 20:36:54	João Paulo dos Santos	Aceito
Outros	DISPENSA_DO_TCLE.pdf	30/11/2015 20:35:21	João Paulo dos Santos	Aceito

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.373.136

Outros	TCLE_Controles.doc	27/10/2015 12:14:08	João Paulo dos Santos	Aceito
Outros	TCLE_pacientes.doc	27/10/2015 12:13:19	João Paulo dos Santos	Aceito
Outros	Projeto_Macrofagos_Takayasu_CEP2.docx	27/10/2015 12:12:25	João Paulo dos Santos	Aceito
Outros	carta_concordancia.pdf	27/10/2015 12:09:53	João Paulo dos Santos	Aceito
Outros	carta_resposta_pdf.pdf	27/10/2015 12:09:19	João Paulo dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	09/09/2015 19:57:48	João Paulo dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Macrofagos_Takayasu_CEP.docx	09/09/2015 10:37:12	João Paulo dos Santos	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 17 de Dezembro de 2015

---

**Assinado por:**  
**Miguel Roberto Jorge**  
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

### Anexo 3 – Comissão Científica - INCOR

MEMO 0074/16

São Paulo, 05 de abril de 2016.

Ao  
Prof. Dr. Alexandre Wagner S. de Souza

A Comissão Científica do Instituto do Coração, **tomou ciência** da obtenção de 10 espécimes de aorta torácica proximal de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica, disponíveis em blocos de parafina no setor de Patologia do InCor FMUSP. Os mesmos serão utilizados no projeto de pesquisa "**Avaliação do Infiltrado de Macrófagos na Parede Arterial de Pacientes com Arterite de Takayasu**" que será utilizado como tese de mestrado da aluna João Paulo dos Santos, e devolvidos após seu uso, ao laboratório de Patologia do INCOR. Este projeto encontra-se devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – Hospital São Paulo UNIFESP - HSP, CAAE 49802615.3.00005505, sob o parecer 1.373.136, relatoria em 17/12/2015.

Atenciosamente,

  
**Prof. Dr. José Eduardo Krieger**  
Coordenação Administrativa dos Laboratórios de Pesquisa  
do InCor - HCFMUSP



## Anexo 4 – Termos de consentimento livre e esclarecido de pacientes

### AVALIAÇÃO DO INFILTRADO DE MACRÓFAGOS NA PAREDE ARTERIAL DE PACIENTES COM ARTERITE DE TAKAYASU

Nome do (a) paciente: \_\_\_\_\_

Registro hospitalar: \_\_\_\_\_

Este é um trabalho de pesquisa científica. Você deve ler atentamente esse termo e assinar, ou não, segundo seu julgamento a fim de participar do projeto. Damos a seguir todos os esclarecimentos sobre o referido estudo e pedimos sua atenção e cuidado na leitura para que não fique qualquer dúvida. Solicitamos que faça todas as perguntas que achar necessário para seu total entendimento.

A arterite de Takayasu é uma vasculite que leva à inflamação de grandes artérias (por exemplo: aorta e carótidas) e manifesta por pulsos diminuídos ou ausentes nos braços e nas pernas, pressão arterial maior em um braço do que no outro e sintomas de má circulação, tais como dores musculares com o esforço ou até derrame, quando as artérias cerebrais estão fechadas. Ao longo do tempo, a arterite de Takayasu pode levar à formação de cicatrizes, estreitamentos e dilatações anormais nas artérias inflamadas. Embora a causa da arterite de Takayasu seja desconhecida, acredita-se que nossas defesas, ou seja nosso sistema imunológico, ataque as próprias células do organismo, nesse caso as artérias, em vez de as protegerem dos invasores externos.

Este trabalho procura avaliar as células do sistema imunológico que levam à inflamação das artérias na arterite de Takayasu, especialmente os macrófagos, que são células de defesa do nosso organismo. Estudos anteriores mostraram que existem muitos macrófagos inflamando as artérias de pacientes com arterite de Takayasu, mas até o momento, não se sabe quais os tipos de macrófagos presentes nas artérias. Nesse estudo, procuraremos esclarecer quais os tipos de macrófagos que participam da inflamação na arterite de Takayasu e sua relação com outras células do sistema imunológico, incluindo linfócitos T, linfócitos B e células NK (sigla do inglês "natural killers" que significa células matadoras naturais, ou seja, células do sistema imune que matam nossas células infectadas por vírus). Serão avaliadas também artérias de

pacientes com doença aterosclerótica, ou seja, placas de gordura nas artérias, e artérias normais de indivíduos submetidos à retirada da artéria por outras causas.

Esclarecemos que a participação neste estudo não oferece **riscos** ao indivíduo, apenas serão realizados cortes microscópicos no material de biópsia, nesse caso a artéria que se encontra armazenada no laboratório de patologia. Todos os procedimentos técnicos deste trabalho serão realizados exclusivamente no laboratório do Departamento de Patologia da Unifesp-EPM.

Não há **benefício** direto para o participante. Trata-se de estudo experimental que busca entender melhor como ocorre a inflamação das artérias nos pacientes com arterite de Takayasu. Somente ao final do estudo poderemos concluir qual o tipo de macrófago é mais encontrado na parede das artérias de pacientes com arterite de Takayasu e sua relação com as outras células imunológicas.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Alexandre Wagner Silva de Souza que pode ser encontrado na Rua Botucatu, 740 – 3º andar. Telefone: (11) 5576-4239. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Os dados e materiais coletados serão utilizados somente para esta pesquisa. O paciente tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Avaliação do**

**infiltrado de macrófagos na parede arterial de pacientes com arterite de Takayasu”.**

Eu discuti com o biomédico João Paulo dos Santos sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente/representante legal. São Paulo, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha. São Paulo, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo. São Paulo, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_



**Anexo 5 – Termo de consentimento livre e esclarecido de controles**

**AValiação DO INFILTRADO DE MACRÓFAGOS NA PAREDE ARTERIAL DE  
PACIENTES COM ARTERITE DE TAKAYASU**

**Nome do (a) participante:** \_\_\_\_\_

**Registro hospitalar:** \_\_\_\_\_

Este é um trabalho de pesquisa científica. Você deve ler atentamente esse termo e assinar, ou não, segundo seu julgamento a fim de participar do projeto. Damos a seguir todos os esclarecimentos sobre o referido estudo e pedimos sua atenção e cuidado na leitura para que não fique qualquer dúvida. Solicitamos que faça todas as perguntas que achar necessário para seu total entendimento.

A arterite de Takayasu é uma vasculite que leva à inflamação de grandes artérias (por exemplo: aorta e carótidas) e manifesta por pulsos diminuídos ou ausentes nos braços e nas pernas, pressão arterial maior em um braço do que no outro e sintomas de má circulação, tais como dores musculares com o esforço ou até derrame, quando as artérias cerebrais estão fechadas. Ao longo do tempo, a arterite de Takayasu pode levar à formação de cicatrizes, estreitamentos e dilatações anormais nas artérias inflamadas. Embora a causa da arterite de Takayasu seja desconhecida, acredita-se que nossas defesas, ou seja nosso sistema imunológico, ataque as próprias células do organismo, nesse caso as artérias, em vez de as protegerem dos invasores externos.

Este trabalho procura avaliar as células do sistema imunológico que levam à inflamação das artérias na arterite de Takayasu, especialmente os macrófagos, que são células de defesa do nosso organismo. Estudos anteriores mostraram que existem muitos macrófagos inflamando as artérias de pacientes com arterite de Takayasu, mas até o momento, não se sabe quais os tipos de macrófagos presentes nas artérias. Nesse estudo, procuraremos esclarecer quais os tipos de macrófagos que participam da inflamação na arterite de Takayasu e sua relação com outras células do sistema imunológico, incluindo linfócitos T, linfócitos B e células NK (sigla do inglês "natural killers" que significa células matadoras naturais, ou seja, células do sistema imune que matam nossas células infectadas por vírus). Serão avaliadas também artérias de pacientes com doença aterosclerótica, ou seja, placas de gordura nas artérias, e

artérias normais de indivíduos submetidos à retirada da artéria por outras causas.

Esclarecemos que a participação neste estudo não oferece **riscos** ao indivíduo, apenas serão realizados cortes microscópicos no material de biópsia, nesse caso a artéria que se encontra armazenada no laboratório de patologia. Todos os procedimentos técnicos deste trabalho serão realizados exclusivamente no laboratório do Departamento de Patologia da Unifesp-EPM.

Não há **benefício** direto para o participante. Trata-se de estudo experimental que busca entender melhor como ocorre a inflamação das artérias nos pacientes com arterite de Takayasu. Somente ao final do estudo poderemos concluir qual o tipo de macrófago é mais encontrado na parede das artérias de pacientes com arterite de Takayasu e sua relação com as outras células imunológicas.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Alexandre Wagner Silva de Souza que pode ser encontrado na Rua Botucatu, 740 – 3º andar. Telefone: (11) 5576-4239. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente. Os dados e materiais coletados serão utilizados somente para esta pesquisa. O paciente tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**Avaliação do infiltrado de macrófagos na parede arterial de pacientes com arterite de**

**Takayasu”.**

Eu discuti com o biomédico João Paulo dos Santos sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente/representante legal. São Paulo, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha. São Paulo, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo. São Paulo, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## Anexo 6 – Dispensa do TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido)



**Universidade Federal de São Paulo**  
**Escola Paulista de Medicina**  
**Departamento de Medicina**

*Disciplina de Reumatologia*

Ao Comitê de Ética em Pesquisa  
 Universidade Federal de São Paulo

São Paulo, 24 de novembro de 2015.

**DISPENSA DO TCLE (TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO)**

Conforme IV.8 da Resolução Nº 466, DE 12 de dezembro de 2012:

*"Nos casos em que seja inviável a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ou que esta obtenção signifique riscos substanciais à privacidade e confidencialidade dos dados do participante ou aos vínculos de confiança entre pesquisador e pesquisado, a dispensa do TCLE deve ser justificadamente solicitada pelo pesquisador responsável ao Sistema CEP/CONEP, para apreciação, sem prejuízo do posterior processo de esclarecimento."*

Eu, João Paulo dos Santos, solicito a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do infiltrado de macrófagos na parede arterial de pacientes com arterite de Takayasu**" devido à impossibilidade de sua obtenção em relação a todos os pacientes e seus familiares, em razão do fato de alguns serem falecidos e da não localização de seus familiares e de alguns dos pacientes vivos por terem perdido seguimento em nosso hospital e por terem seus dados de contato desatualizados no sistema de registro hospitalar do Hospital São Paulo.

**Declaro:**

- a) Que o acesso ao material para fins da pesquisa científica será feito somente após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética;
- b) O acesso aos dados será supervisionado por uma pessoa que esteja plenamente informada sobre as exigências de confiabilidade;
- c) Assegurar o compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados preservando integralmente o anonimato e a imagem do sujeito bem como a sua não estigmatização;
- d) Assegurar a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou econômico-financeiro;
- e) O pesquisador responsável estabeleceu salvaguardas seguras para confidencialidades dos dados de pesquisa;
- f) Os dados obtidos na pesquisa serão usados exclusivamente para finalidade prevista no protocolo;
- g) Os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para o projeto vinculado; os quais serão mantidos em sigilo, em conformidade com o que prevê os termos da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Esclareço, ainda, que os responsáveis pelo departamento que tem a guarda do material, conforme cartas de concordância estão de acordo com a sua utilização, salvaguardando os interesses dos pesquisados quanto a sua imagem e sua privacidade.

Esclareço, finalmente, que assumo a total responsabilidade pelas informações apresentadas.

Local e data São Paulo, 24 de novembro de 2015.

João Paulo dos Santos  
 Assinatura do Pesquisador Responsável

**Anexo 7 – Ficha de avaliação utilizada para os pacientes com AT**

**Ficha de avaliação**

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Data da avaliação: \_\_\_\_\_

RG – HSP: \_\_\_\_\_ Nº do paciente: \_\_\_\_\_

Diagnóstico em: \_\_\_\_\_ Tipo arteriográfico: \_\_\_\_\_

Outros diagnósticos: \_\_\_\_\_

**Dados clínicos e laboratoriais quando submetido à cirurgia ou ao óbito:**

Prednisona ( ): \_\_\_\_\_ mg/dia Metrotexate ( ): \_\_\_\_\_ mg/semana

Anti TNF ( ) ETN ( ) ADA ( ) IFX ( ) Ciclofosfamida VO ( ) EV ( )

Leflunomida ( ): Micofenolato ( ): \_\_\_\_\_ mg/dia AAS ( ) dose: \_\_\_\_\_

IECA ( ) Estatina ( ) Qual ? \_\_\_\_\_ Dose diária: \_\_\_\_\_

VHS: \_\_\_\_\_ mm/1 hora PCR: \_\_\_\_\_ mg/L

Paciente em atividade ( )

Distribuição das lesões arteriais:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Escores do infiltrado inflamatório arterial:**

CD68 : \_\_\_\_\_

CD3: \_\_\_\_\_

CD86: \_\_\_\_\_

CD20: \_\_\_\_\_

CD163: \_\_\_\_\_

CD56: \_\_\_\_\_

**Localização do infiltrado:**

Adventícia: \_\_\_\_\_

Média: \_\_\_\_\_

Íntima: \_\_\_\_\_

Vasa vasorum: \_\_\_\_\_

**Anexo 8 - Ficha de avaliação utilizada para o grupo controle**

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Data da avaliação: \_\_\_\_\_

RG – HSP: \_\_\_\_\_ N° do controle: \_\_\_\_\_

Diagnóstico principal: \_\_\_\_\_

Outros diagnósticos: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Escores do infiltrado inflamatório arterial:**

CD68 : \_\_\_\_\_

CD3: \_\_\_\_\_

CD86: \_\_\_\_\_

CD20: \_\_\_\_\_

CD163: \_\_\_\_\_

CD56: \_\_\_\_\_

**Localização do infiltrado:**

Adventícia: \_\_\_\_\_

Média: \_\_\_\_\_

Íntima: \_\_\_\_\_

*Vasa vasorum:* \_\_\_\_\_