



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Rosana da Silva Costa Palma

**Avaliação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento associados
à disfunção endotelial nas manifestações clínicas da doença arterial
obstrutiva periférica**

Rio de Janeiro

2019

Rosana da Silva Costa Palma

Avaliação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento associados à disfunção endotelial nas manifestações clínicas da doença arterial obstrutiva periférica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Thaís Porto Amadeu

Coorientadora: Prof.^a Dra. Luciana Silva Rodrigues

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P171 Palma, Rosana da Silva Costa.

Avaliação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento associados à disfunção endotelial nas manifestações clínicas da doença arterial obstrutiva periférica / Rosana da Silva Costa Palma. – 2019.

120 f.

Orientadora: Thaís Porto Amadeu.

Coorientadora: Luciana Silva Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Doenças vasculares periféricas - Teses. 2. Mediadores da Inflamação. 3. Doença Arterial Periférica. 4. Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular. 5. Endotelina-1. I. Amadeu, Thaís Porto. II. Rodrigues, Luciana Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.13-004.6

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rosana da Silva Costa Palma

Avaliação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento associados à disfunção endotelial nas manifestações clínicas da doença arterial obstrutiva periférica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de junho de 2019.

Orientadora : Prof.^a Dra. Thaís Porto Amadeu
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Luciana Silva Rodrigues
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Roberta Arnoldi Cobas
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Sandra Regina Boiça da Silva
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Sebastião Barreto de Brito Filho
Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

À Deus sempre presente em minha vida.

Aos meus pais Palma e Sonia; aos meus avós e padrinhos Antonio e Rosa (*in memoriam*), por todo amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela oportunidade em realizar o meu sonho de fazer um mestrado e por tudo que me concedeu ao longo da vida até hoje.

Aos meus pais, Palma e Sonia, a quem eu devo tudo, por sempre me apoiarem e incentivarem a lutar pelos meus sonhos. A vocês, que com seu amor incondicional muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus.

Aos meus avós, Antonio e Rosa (*in memoriam*), por participarem da minha criação e se orgulharem da minha trajetória, sei que de onde estiverem estão muitos felizes com mais essa conquista.

Aos meus verdadeiros amigos, por me incentivarem sempre e entenderem muitas vezes minhas ausências, especialmente Ana Cristina, Talita e Vanessa, juntas desde a infância.

Às minhas orientadoras, Prof.^a Dra Thaís Porto Amadeu e Prof.^a Dra Luciana Silva Rodrigues, que me receberam de braços abertos, embarcaram nessa ideia e com conhecimento sempre disponível, se esforçaram para me orientar a qualquer momento. Thaís, por sua generosidade e amor em todos os momentos dessa trajetória. Luciana, por suas ideias e perseverança. Obrigada a vocês pela paciência, confiança e ensinamentos ao longo desses anos.

À Vanisse pela amizade e por compartilharmos o mesmo sonho desde o início.

À Roberta, Camila e Eduardo por toda ajuda na coleta dos dados e amostras.

À Doutoranda Raquel da Silva Corrêa pela busca da perfeição no processamento das amostras e pela ajuda na realização de alguns experimentos. À Doutoranda Mariana Martins de Athaide pela ajuda na realização de alguns experimentos.

Ao biólogo do Laboratório de Imunopatologia, Roberto Stefan, pela grande ajuda na dosagem de nitrito bem como no auxílio da finalização desta dissertação.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e por fazer parte desse momento, contribuindo para o aperfeiçoamento desse estudo.

À revisora, Dra Sandra Regina Boiça da Silva por aceitar participar da revisão desta dissertação e por todo o apoio.

Aos suplentes por aceitar o convite e por todo apoio e colaboração neste trabalho.

Ao Laboratório de Imunopatologia localizado na disciplina de Patologia Geral, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro por me permitir realizar esse projeto.

Aos membros envolvidos na pesquisa, como sempre digo, sem vocês nada disso seria possível.

A todos os professores das disciplinas obrigatórias ou eletivas, da Pós-Graduação em Ciências Médicas pela grande contribuição e ensinamentos. Aos amigos conquistados nesse caminho.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram envolvidas na construção desse sonho.

Muito obrigada!!!!

A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.

Albert Einstein

RESUMO

PALMA, Rosana da Silva Costa. **Avaliação de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento associados à disfunção endotelial nas manifestações clínicas da doença arterial obstrutiva periférica.** 2019. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) constitui uma manifestação de aterosclerose e apresenta maior prevalência a partir da sexta ou sétima década de vida. É um preditor de eventos cardiovasculares e cerebrovasculares e de mortalidade. Os casos mais graves exigem intervenção cirúrgica para revascularização. Alguns pacientes não apresentam boa resposta, no médio prazo, acarretando em revascularização ou amputação do membro. Em qualquer circunstância a DAOP traz um impacto na qualidade de vida dos pacientes. Esses eventos estão associados principalmente à disfunção endotelial, e alguns mediadores inflamatórios e fatores de crescimento estão envolvidos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os níveis séricos dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes com doença vascular obstrutiva periférica de membros inferiores. Foram recrutados 51 pacientes portadores de DAOP de membros inferiores com diferentes manifestações clínicas, acompanhados no Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital Municipal Souza Aguiar (HMSA) do Rio de Janeiro e no Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital Federal do Andaraí (HFA) e 17 indivíduos saudáveis. Os pacientes foram separados em dois grupos de acordo com a classificação Fontaine da DAOP. O sangue periférico foi coletado e as amostras processadas e armazenadas para posterior detecção dos níveis séricos de Endotelina-1 (ET-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β 1), óxido nítrico (NO) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) por ensaio imunoenzimático (ELISA). Nossos resultados mostraram que os mediadores que apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos DAOP e o controle foram ET-1, VEGF-A e PDGF-BB com $p < 0,0001$, $p = 0,0004$, $p = 0,0148$, respectivamente. A ET-1 apresentou níveis elevados em diferentes manifestações da doença. Destacou-se a relação entre os níveis de VEGF-A em pacientes com Fontaine 4. Acreditamos que uma melhor compreensão da fisiopatologia da DAOP poderá auxiliar na identificação de marcadores prognósticos, assim como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas adjuvantes à prática clínica.

Palavras-chave: Doença arterial obstrutiva periférica. Membros inferiores. Mediadores inflamatórios. Endotelina-1. Fator de crescimento endotelial vascular.

ABSTRACT

PALMA, Rosana da Silva Costa. **Evaluation of inflammatory mediators and growth factors associated with endothelial dysfunction in the clinical manifestations of peripheral obstructive arterial disease.** 2019. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Peripheral arterial obstructive disease (PAD) is a manifestation of atherosclerosis and is more prevalent as of the sixth or seventh decade of life. It is a predictor of cardiovascular and cerebrovascular events and mortality. More severe cases require surgical intervention for revascularization. Some patients do not present a good response, in the medium term, resulting in revascularization or limb amputation. In any circumstance, DAOP has an impact on patients' quality of life. These events are mainly associated with endothelial dysfunction, and some inflammatory mediators and growth factors are involved. Therefore, the objective of this study was to evaluate serum levels of inflammatory mediators and growth factors in patients with peripheral obstructive vascular disease of the lower limbs. Fifty-one patients with lower limb PAOD with different clinical manifestations were enrolled at the Vascular and Endovascular Surgery Service of the Souza Aguiar Municipal Hospital (HMSA) in Rio de Janeiro and at the Vascular and Endovascular Surgery Service of the Federal Hospital of Andaraí (HFA) and 17 healthy individuals. Patients were separated into two groups according to Fontaine's classification of PAOD. Peripheral blood was collected and the samples were processed and stored for further detection of serum levels of Endothelin-1 (ET-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor beta (TGF- β 1), nitric oxide (NO) and platelet-derived growth factor (PDGF) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Our results showed that the mediators that presented a significant statistical difference between the DAOP and control groups were ET-1, VEGF-A and PDGF-BB with $p < 0.0001$, $p = 0.0004$, $p = 0.0148$, respectively. ET-1 showed elevated levels in different manifestations of the disease. The relationship between VEGF-A levels in Fontaine 4 patients was emphasized. We believe that a better understanding of the pathophysiology of PAOD may help in the identification of prognostic markers, as well as in the development of new therapeutic strategies adjuvant to clinical practice.

Keywords: Peripheral obstructive arterial disease. Lower limbs. Inflammatory mediators. Endothelin-1. Vascular endothelial growth factor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura básica da placa de ateroma	22
Figura 2 –	Representação da resposta à isquemia na DAOP	25
Quadro 1 -	Classificação de Fontaine	26
Quadro 2 -	Classificação de Rutherford.....	26
Figura 3 –	Lesão em paciente DAOP	28
Quadro 3 –	Valores de ITB e sua interpretação.....	29
Figura 4 -	Imagem representativa da realização do ITB.....	30
Figura 5 –	Imagem obtida por arteriografia apresentando aterosclerose de aorta e ilíacas	31
Figura 6 –	Fluxograma da população de estudo.....	45
Figura 7 –	Imagens macroscópicas das lesões de três pacientes representativos do grupo com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) atendidos no Hospital Municipal Souza Aguiar	53
Figura 8 –	Imagens representativas de arteriografias de pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) de membros inferiores que apresentaram feridas, mostrando diferentes acometimentos dos segmentos arteriais	54
Figura 9 –	Acometimentos dos segmentos arteriais em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) de membros inferiores que apresentavam ou não ferida	57
Figura 10 –	Detecção de níveis séricos de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica ...	59
Figura 11 –	Detecção de níveis séricos de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica com e sem ferida.....	60
Figura 12 -	Correlação dos níveis séricos de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento e da Proteína C Reativa em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica.....	62
Figura 13 -	Correlação dos níveis séricos de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento e da hemoglobina glicada em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados clínicos, demográficos e laboratoriais da população geral de estudo.....	53
Tabela 2 –	Dados clínico, demográficos e laboratoriais dos paciente DAOP com e sem ferida em comparação aos indivíduos sadios.....	56
Tabela 3 –	Dados clínicos dos pacientes DAOP com e sem ferida.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	Dimetilarginina assimétrica
AFS	Artéria femoral superficial
AGEs	Produtos avançados de glicação
ATA	Artéria tibial anterior
ATP	Artéria tibial posterior
CO	Monóxido de carbono
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECE	Enzima conversora de endotelina
ELISA	Ensaio imunoenzimático
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina-1
ETA	Receptor A de endotelina
ETB	Receptor B de endotelina
GAMA-GT	Gama glutamil transpeptidase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIF	Fator induzido pela hipóxia
HFA	Hospital Federal do Andaraí
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMSA	Hospital Municipal Souza Aguiar
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular -1
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
INR	Razão normatizada internacional
ITB	Índice tornozelo-braquial

LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lactato desidrogenase
MEC	Matriz extracelular
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PCR	Proteína C reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PTN	Proteína
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TAP	Atividade de protrombina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF β 1	Fator de crescimento transformante beta-1
TGL	Triglicerídeos
TNF	Fator de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1	Doença Arterial Obstrutiva Periférica	17
1.1.1	<u>Epidemiologia e fatores de risco</u>	17
1.1.2	<u>Resposta do endotélio na DAOP</u>	20
1.1.3	<u>Manifestações clínicas</u>	26
1.1.4	<u>Diagnóstico</u>	28
1.1.5	<u>Tratamento</u>	31
1.2	Biomarcadores de resposta à isquemia na prática clínica	32
1.2.1	<u>Endotelina</u>	32
1.2.2	<u>Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)</u>	34
1.2.3	<u>Fator de crescimento transformador - beta (TGF-β)</u>	36
1.2.4	<u>Óxido nítrico (NO)</u>	37
1.2.5	<u>Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)</u>	39
1.2.6	<u>Proteína C reativa (PCR)</u>	41
1.2.7	<u>Fibrinogênio</u>	42
1.3	Justificativa	42
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivo geral	43
2.2	Objetivos específicos	43
3	METODOLOGIA	44
3.1	Desenho do estudo	44
3.2	População de estudo	45
3.3	Critérios de inclusão e exclusão	46
3.4	Avaliação laboratorial e radiológica	46
3.5	Coleta e processamento das amostras	47
3.5.1	<u>Dosagem sérica de endotelina-1</u>	47
3.5.2	<u>Dosagem sérica de VEGF-A</u>	47
3.5.3	<u>Dosagem sérica de TGF-β1</u>	48
3.5.4	<u>Dosagem sérica de Óxido Nítrico</u>	49
3.5.5	<u>Dosagem sérica do PDGF-BB</u>	49

3.6	Análise estatística dos dados	49
4	RESULTADOS	51
4.1	Característica da população do estudo	51
4.2	População amostral do grupo DAOP com ferida (Fontaine 4)	54
4.3	População amostral do grupo DAOP sem ferida (Fontaine 2)	55
4.4	Avaliação dos níveis séricos dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em indivíduos DAOP versus indivíduos saudáveis	57
4.5	Avaliação dos níveis séricos dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes DAOP com ferida, pacientes DAOP sem ferida e indivíduos saudáveis	57
4.6	Correlação dos níveis séricos dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes DAOP com os valores da PCR e hemoglobina glicada	61
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do HMSA	92
	APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do HFA	95
	APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos indivíduos saudáveis (Controles)	98
	APÊNDICE D - Questionário Aplicado aos Pacientes do HMSA	101
	APÊNDICE E - Questionário Aplicado aos Pacientes do HFA	104
	APÊNDICE F - Questionário Aplicado aos Indivíduos Saudáveis (Controles)	107
	ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética - HMSA	109
	ANEXO B - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética - HUPE	113
	ANEXO C - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética - HFA	118

INTRODUÇÃO

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) é causada por uma disfunção endotelial, na maioria dos casos ligada à aterosclerose. Nesse processo estão envolvidos vários fatores de risco, como a hipertensão arterial, o tabagismo e o diabetes *mellitus* (DM). Calcula-se que a prevalência mundial da doença seja de 15 a 20% na população acima de 55 anos, com o aumento da prevalência com o aumento da idade, 40% na população acima de 80 anos, sendo a maioria dos casos, cerca de 70%, assintomáticos (NORMAN; EIKELBOOM; HANKEY, 2004). A DAOP é uma doença de acometimento local, com envolvimento coronariano e cerebrovascular associados, sendo considerada, portanto, um forte preditor de morbidade sistêmica e mortalidade. Pacientes com DAOP grave têm taxa de mortalidade de 45% dos casos (CONTE; VALE, 2018).

A disfunção endotelial que ocorre na DAOP é um processo sistêmico e um evento inicial na aterosclerose. O endotélio orchestra as funções vasculares pela síntese e liberação de vários fatores inflamatórios, que atuam na regulação do tônus vascular e na prevenção da trombose, no controle da inflamação e no remodelamento vascular (VOGEL, 1999; RICHARD, 2014). Assim, alterações no balanço de substâncias derivadas do endotélio têm-se mostrado importantes na fisiopatologia da DAOP. A oclusão arterial aterosclerótica resulta em um reduzido fluxo sanguíneo para o membro inferior. Portanto, durante o exercício físico, há uma inabilidade de aumentar o fluxo para a demanda da musculatura, resultando em isquemia e dor. Com a progressão da doença, há um dano maior pela liberação de espécies reativas de oxigênio, e conseqüentemente com a evolução da injúria tecidual, o aparecimento de úlceras e gangrena, que em muitos casos evoluem para amputação de membro (ROOS, 1993; MAKDISSE et al., 2007).

O estímulo à isquemia seguido de reperfusão causa mudanças na microcirculação que incluem a liberação de moléculas de adesão e a produção de fatores de crescimento e citocinas inflamatórias. Uma série de mediadores inflamatórios tem sido reportada em condições isquêmicas agudas e crônicas, como na falência renal, na síndrome coronariana aguda e no acidente vascular encefálico (BARANI et al., 2006). No entanto, pouco ainda se sabe sobre seu papel na DAOP nos membros inferiores e na evolução da doença. Acreditamos que no processo de isquemia-reperfusão dos membros inferiores haja a expressão e liberação na circulação periférica de mediadores característicos e que sua identificação possa ajudar a prevenir a progressão da doença e de complicações adicionais, pois a DAOP é uma das

principais causas de comprometimento da qualidade de vida que, por sua vez, piora ainda mais com a progressão da doença.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doença Arterial Obstrutiva Periférica

A aterosclerose é um processo crônico multifatorial decorrente de uma resposta inflamatória e fibroproliferativa às agressões ao endotélio arterial. O termo aterosclerose foi criado por Marchand em 1904, que analisando a parede vascular, encontrou depósitos de lipídeos circunscritos associados a fenômenos de esclerose envolvente. Em 1913, Anitschkow e Chalатов descreveram o papel do acúmulo de colesterol na parede dos vasos para a formação de aterosclerose. Em 1958, a Organização Mundial de Saúde definiu a aterosclerose como uma afecção da camada íntima das artérias devido ao acúmulo focal de lipídeos, produtos sanguíneos, tecido fibroso e depósito de cálcio, acompanhado de alterações na camada média. A DAOP, também chamada de aterosclerose obliterante periférica, é hoje um marcador de doença cardiovascular (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1958; LUZ; VINT, 2003; HANSON, 2005).

1.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

A DAOP afeta 12% da população geral, atingindo a cada dia pacientes de faixa etária cada vez mais baixa (HIATT; HOAG; HAMMAN, 1995; NORGREN; HIATT; DORMANDY, 2007). Predomina no sexo masculino e aparece com mais frequência entre a sexta e sétima décadas de vida. Geralmente na fase de claudicação intermitente há acometimento simultâneo dos setores cerebral e coronariano, o que aumenta a morbidade.

A prevalência da doença assintomática em homens ao redor de 60 anos varia de 0,9% a 22% dos pacientes diagnosticados, enquanto a prevalência de claudicação intermitente foi estimada em 3 a 6%, sendo maior em homens que em mulheres de todas as faixas etárias. Acredita-se que a prevalência seja subestimada pelo fato do processo aterosclerótico ser subclínico e assintomático por um longo período (COOKE; WILSON, 2010; BECKER et al., 2011). Estima-se que 5 a 10% dos pacientes assintomáticos ou com claudicação irão progredir para isquemia crítica em 5 anos, e 1-3% dos pacientes com DAOP estão com isquemia crítica

na apresentação inicial (STOFFERS et al., 1996; SIGVANT et al., 2007; VARU; HOGG; KIBBE, 2010). Dos pacientes assintomáticos, 40% apresentam risco de acidente vascular encefálico e 20-60% risco de infarto do miocárdio (CONTE; VALE, 2018). A incidência da isquemia crônica crítica dos membros inferiores é aproximadamente de 500 a 1000 novos casos por milhão de habitantes no ano, sendo a relação entre homens e mulheres de 3:1 (SIGVANT et al., 2007; SETACCI, 2010). Nesses pacientes o índice de amputação primária varia de 10 a 40%, sendo que 25% requerem amputação em 12 meses do diagnóstico. Sua mortalidade varia de 20-45%, 40-70%, 80-95% em 1, 5 e 10 anos, respectivamente. Na DAOP alguns pacientes apresentam quadro agudo de isquemia, que ocorre de forma rápida e por não haver circulação colateral pré-existente, é exigido tratamento de urgência, nesses casos a taxa de amputação varia de 10-15%, a mortalidade de 20% em 1 ano, sendo o prognóstico relacionado ao tempo de revascularização e à extensão tecidual (NOVO, 2002; CONTE; VALE, 2018).

A DAOP pode ter muitas etiologias, tais como as síndromes displásicas, vasculites, trombozes e condições degenerativas, porém a aterosclerose é a causa principal e mais comum. Estudos epidemiológicos admitem como principais fatores de risco para aterosclerose: a idade, o sexo, os fatores genéticos ou a história familiar de doença aterosclerótica, o tabagismo, o diabetes *mellitus*, a hipertensão arterial e a hiperlipidemia.

Como já mencionado acima, a doença se predomina na faixa etária dos 50 a 70 anos. São preferencialmente homens. Manifesta-se aproximadamente 10 anos antes nos homens do que nas mulheres. Ainda não há um conhecimento vasto sobre os fatores genéticos que levam à suscetibilidade da DAOP, mas variações em muitos genes podem levar ao risco da doença por estarem relacionadas aos fatores de risco estabelecidos para a DAOP e outras doenças ateroscleróticas. É proposto que variações genéticas podem influenciar unicamente o desenvolvimento de doença arterial em membros inferiores à despeito de outros territórios vasculares, mas isto ainda não está totalmente esclarecido (VALENTINE et al., 2004; WASSEL et al., 2012).

O tabagismo é um importante fator de risco para a aterosclerose periférica junto com o diabetes *mellitus*. Ele aumenta o risco da doença arterial em 3 vezes (LAUSTIOLA, 1991). Foi demonstrado que 09 entre 10 pacientes com aterosclerose fumaram pelo menos por 10 anos, aumentando proporcionalmente com o número de cigarros fumados. Estudos mostraram que pacientes com claudicação, que pararam de fumar, tiveram melhor evolução clínica do que os que prosseguiram (BECKER et al., 2011; JONES; APELBERG; NAVES-ACIEN, 2013). O

tabagismo é o fator de risco mais modificável para progressão ou prevenção da doença arterial periférica (MASCARENHAS et al., 2014).

Há evidências de que o diabetes *mellitus* aumenta a incidência e a gravidade da aterosclerose periférica. A doença vascular parece ser mais extensa nos diabéticos, porém a natureza dessa lesão não está totalmente explicada. A incidência da aterosclerose periférica precoce parece ser 2 a 6 vezes maior em diabéticos do que em não diabéticos. Nos pacientes com DM, o maior tempo de diabetes, a existência da neuropatia periférica e uma idade elevada aumenta o risco de desenvolver DAOP. Estes indivíduos com DM irão apresentar uma doença mais avançada em comparação aos pacientes não diabéticos (JUDE et al., 2001; SOLANKI; MAKWANA; SHAH, 2016). Altas concentrações de hemoglobina glicada (HbA1c) correlacionam-se com o estreitamento arterial e a aterosclerose acelerada, seus níveis foram relacionados à alta incidência de DAOP, sugerindo um papel na aterosclerose acelerada nos membros inferiores como marcador da glicação não-enzimática de outras proteína da matriz do vaso, como o colágeno (SELVIN et al., 2006; LEE et al., 2016). Trabalhos correlacionam os níveis de hemoglobina glicada com os resultados adversos nos membros, e mostram que pacientes com pobre controle glicêmico (HbA1c > 8%) têm o risco duas vezes maior de amputação (MALONE et al., 2014; ARYA et al., 2018).

Na DAOP, a hipertensão arterial eleva o risco aproximadamente 2 a 3 vezes de amputação. Como fator de risco coronariano, a hipertensão arterial induz alterações no endotélio facilitando a penetração de lipídeos na parede arterial; promovendo aumento e ativação de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular -1), E-selectina e aderência de monócitos. Além disso, a angiotensina II pode desencadear um processo inflamatório ao estimular a produção de ânions superóxido e espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas células endoteliais e células musculares lisas. No entanto, ainda não está bem definido o papel da hipertensão na aterosclerose periférica. A hipertensão parece ter mais efeito sobre o segmento proximal do que sobre o distal (PICCINATO; CHERRI; MORIYA, 2001; ESTIRADO et al., 2014; CRIQUI; ABOYANS, 2015).

Há relação entre os níveis elevados de lipídeos plasmáticos e o desenvolvimento de aterosclerose periférica. Na doença arterial periférica algumas frações lipídicas são fatores de risco independentes, como elevação de colesterol total, LDL e triglicérides. O aumento de LDL é considerado o fator aterogênico mais importante. No entanto, a HDL é considerada um fator protetor de aterosclerose por fazer um transporte reverso de colesterol e de enzimas antioxidantes e assim neutraliza os efeitos pró-inflamatórios. Ela também mantém a óxido nítrico sintase (NOS) na membrana aumentando a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO),

promove aumento da síntese de prostaciclina, reduz a expressão de moléculas de adesão, de fator ativador de plaquetas, de tromboxano A₂ e a captação de LDL (BRANDÃO; TRINDADE; PINHEL, 2005; PEREIRA et al., 2015; SOLANKI; MAKWANA; SHAH, 2016). Nesse contexto, encontra-se a hipercolesterolemia familiar, doença de herança genética autossômica dominante, caracterizada pela elevação dos níveis séricos de colesterol total e de LDL, que pode determinar o desenvolvimento de lesões obstrutivas precoces em distintos leitos arteriais, visto que o LDL desloca da membrana a NOS e a célula muscular prolifera, já que o NO inibe sua proliferação (PEREIRA et al., 2015).

A hiperhomocisteinemia parece ser um fator de risco independente para a DAOP, sendo detectada em 28 a 30% dos pacientes com DAOP. Pode ser devida a fatores genéticos no metabolismo da homocisteína ou deficiência de vitaminas B₆ e B₁₂ e de ácido fólico. Atua na produção de radicais livres promovendo disfunção endotelial, proliferação de células musculares lisas, peroxidação lipídica e oxidação do LDL. Ela provoca alteração do controle do tônus vascular e estimula a produção de proteínas quimiotáticas para monócitos (BRUNELLI; FUSCO; TRABALLES, 2015; GANGULY; ALAM, 2015).

1.1.2 Resposta do endotélio na DAOP

O endotélio é considerado um órgão endócrino e metabólico, com funções importantes, participando na regulação do tônus vascular, na resposta inflamatória, na coagulação e na resposta imune. Substâncias vasoativas são sintetizadas e liberadas pelo endotélio, modulando o tônus, calibre vascular e fluxo sanguíneo, com isso é desempenhada sua função principal, fundamental na regulação do aparelho circulatório. No músculo liso vascular, essas substâncias ativam receptores constritores ou relaxantes, estimulam a proliferação celular, a geração de espécies reativas de oxigênio e a expressão de genes. Em condições normais, as células endoteliais suscetíveis às forças hemodinâmicas e composição sanguínea, equilibram o sistema regulando a vasodilatação e inibindo a proliferação da musculatura lisa, agregação plaquetária e formação de trombo. Nas condições de desequilíbrio, como na idade avançada e presença de hipertensão arterial, diabetes, hipercolesterolemia e tabagismo ocorre uma disfunção das células endoteliais, favorecendo situações pró-aterogênicas (HANKE; LENZ; FINKING, 2001; HANSON, 2005).

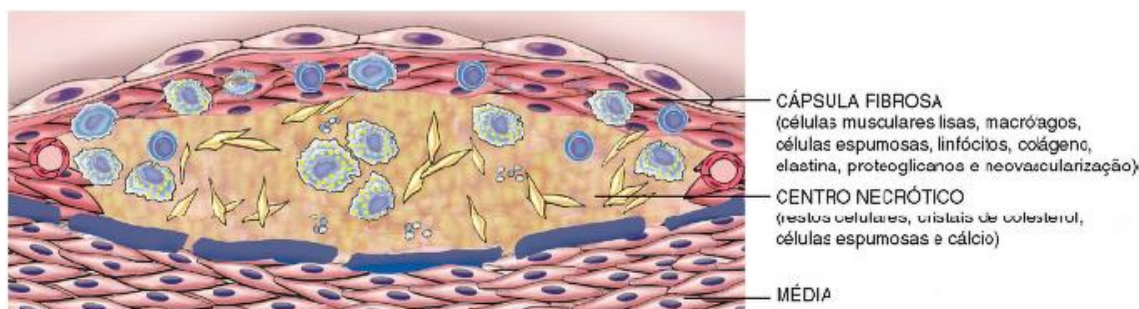
A aterosclerose manifesta-se então como uma resposta a uma lesão endotelial. É classificada, segundo a *American Heart Association*, em graus de I a VI, sendo iniciais as lesões tipo I e II, intermediárias as tipo III e avançadas as tipo IV, V e VI. A lesão endotelial leva à migração dos monócitos que penetram no subendotélio onde começam a acumular lipídeo e transformam-se em células espumosas, evento mais precoce que caracteriza a lesão tipo I. Esses monócitos ativados (macrófagos) liberam mitógenos e quimioatrativos para recrutar mais macrófagos. Além disso, geram ROS que aumentam o estresse oxidativo dentro da parede do vaso e aceleram a oxidação do LDL retido abaixo da íntima do vaso, promovendo mais formação de células espumosas, que se acumulam no espaço subendotelial e distorcem o endotélio suprajacente. Nessas regiões de ulceração endotelial as plaquetas aderem à parede do vaso e liberam fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e citocinas que contribuem para a migração e proliferação do músculo liso. A lesão tipo II, chamada de estria gordurosa, apresenta células musculares lisas e pequeno acúmulo de gordura, além das células espumosas em camadas estratificadas. Os linfócitos T podem ser identificados nessa lesão (ROOS, 1993; SERRANO; FERNÁNDEZ; LUZ, 2003; CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2008).

Quando ocorre a ruptura das células espumosas aparecem lipídeos extracelulares, os mesmos encontram-se espalhados entre as camadas de células musculares lisas, isso consiste na lesão tipo III, chamada de intermediária ou pré ateroma. A lesão tipo IV, chamada de ateroma, é constituída de um núcleo lipídico individualizado, formado pela fusão de ilhotas de gordura, com centro necrótico, onde pode haver células musculares lisas calcificadas, assim como partículas de cálcio livres, além de macrófagos, linfócitos e mastócitos entre esse núcleo e a superfície endotelial. O papel das células musculares lisas parece variar com o estágio da doença, elas sofrem uma mudança no fenótipo de contráteis para secretoras e assim elaboram uma matriz extracelular, constituída por fibras colágenas, fibras elásticas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e outras proteínas, como a fibronectina e a laminina, e estende-se desde a membrana basal das células endoteliais até a lâmina elástica interna. Os proteoglicanos e as fibras de colágeno são os elementos essenciais da matriz e em estado patológico, há elevação da sua secreção por numerosos fatores, tais como o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), PDGF, LDL oxidada, entre outros, o que transforma a lesão em uma placa fibrosa, configurando a lesão tipo V. A lesão tipo Va ou fibroateroma refere-se a presença do novo tecido conjuntivo fibroso associado ao núcleo lipídico. As lesões Vb contêm grande quantidade de cálcio com o tecido fibroso aumentado. A lesão Vc é chamada fibrótica, em que a íntima normal é substituída pelo tecido conjuntivo fibroso e o conteúdo lipídico da

placa é mínimo (CAMACHO; MELICIO; SOARES, 2007; CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2008).

A lesão cresce com o recrutamento de mais células e a placa fibrosa transforma-se numa placa complexa que possui um revestimento fibroso e um núcleo necrótico com *debris* celulares, colesterol e alta concentração de fator tecidual trombogênico secretado pelos macrófagos (Figura 1). Com a ruptura da superfície da placa, caracterizamos a lesão VI, também chamada de complicada, que desempenha um papel importante na progressão da DAOP. Com frequência, a ruptura, descolamento ou ulceração da placa, levam à trombose, que pode ser assintomática ou apresentar-se como uma descompensação aguda. Esta fase contribui para o crescimento rápido das lesões à medida que o trombo sofre fibrose (STARY et al., 1994; CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2008).

Figura 1 - Estrutura básica da placa de ateroma



Legenda: Representação da placa aterosclerótica com disposição excêntrica. A placa de ateroma é formada por uma cápsula fibrosa constituída por células musculares lisas, colágeno, elastina e proteoglicanos e um núcleo lipídico é constituído por *debris* celulares, cristais de colesterol, células espumosas, macrófagos, linfócitos, cálcio, fibrina e proteínas do plasma.

Fonte: Kumar (2013).

Alguns mecanismos endógenos opõem-se a aterogênese. O HDL pode participar no transporte reverso do colesterol do vaso para o fígado, além de conter enzimas que metabolizam o fator ativador das plaquetas. O ativador do plasminogênio tecidual, produzido pelo endotélio, induz fibrinólise e assim a dissolução do trombo. O NO e a prostaciclina são vasodilatadores e inibem a aderência das plaquetas e dos leucócitos ao endotélio, inibem a proliferação de células musculares lisas e macrófagos e suprimem a geração de radicais livres de oxigênio. No entanto, a disfunção endotelial leva à diminuição da produção de NO e ao aumento na produção de endotelina-1 (ET-1), um potente vasoconstrictor que se liga a receptores presentes nas células musculares lisas de todos os leitos vasculares (Figura 2). Ela age como fator de crescimento e está elevada na aterosclerose e na presença de lipídeos e da

LDL oxidada, além de aumentar as ROS (LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002; ALONSO; RADOMSKI, 2003; TABAS, 2004).

Os mecanismos pelos quais os fatores de risco apresentados alteram o endotélio ainda não foram determinados plenamente. Acredita-se que haja relação com uma maior geração do ânion superóxido e redução na síntese e atividade do NO derivado do endotélio. A disfunção endotelial exerce efeitos agudos sobre o tônus vascular e crônicos sobre a estrutura do vaso. O estresse oxidativo perturba a membrana celular e aumenta a permeabilidade endotelial. A produção endotelial de radicais livres ativam as proteínas transcricionais sensíveis aos oxidantes que se deslocam ao núcleo celular e induzem a expressão de moléculas de adesão e das quimiocinas que participam na adesão e na infiltração dos monócitos. As moléculas de adesão medeiam também à deposição de leucócitos sobre o endotélio. Entre essas moléculas de adesão destacam-se a VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular -1) e a ICAM-1 (ROOS, 1993; SERRANO; FERNÁNDEZ; LUZ, 2003).

Durante o ato de fumar há uma diminuição do fluxo sanguíneo cutâneo e aumento da resistência vascular. São várias substâncias capazes de provocar lesão direta ou indireta no sistema vascular, como redução de oxigênio para os tecidos, aumento da frequência cardíaca, hipertensão arterial, hiperlipoproteinemia, aumento da agregação plaquetária, alterações na coagulação, aumento da viscosidade sanguínea, alteração na resposta imune e aumento do fibrinogênio (CRIQUI; ABOYANS, 2015). O monóxido de carbono (CO) aumenta a permeabilidade do endotélio aos lipídeos e nos músculos com suprimento sanguíneo deficiente produz sintomas de insuficiência circulatória. O CO provoca redução da pressão parcial de oxigênio que poderia ser responsável pela lesão celular que predispõe às alterações ateroscleróticas. O NO é oxidado e se transforma no peróxido nitrito, uma espécie reativa de nitrogênio, nitrosilante e causadora de lesão. Portanto com o endotélio lesado pelo fumo e diminuição do NO há uma perda de relaxamento do mesmo. O tabagismo também leva a produção e liberação de radicais livres, o que estimula a produção de ânions superóxido que oxidam a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e estimulam a ação inflamatória de macrófagos na aterosclerose (HOOI et al., 2001; JONES; APELBERG; NAVES-ACIEN, 2013).

A isquemia no pé diabético é decorrência da aterosclerose dos médios e grandes vasos da perna e da coxa, resultando em uma doença arterial obstrutiva, e não somente em decorrência de processos microangiopáticos no pé. A agressão endotelial leva ao aumento das respostas inflamatórias pelo diabetes, posterior agregação plaquetária e proliferação do tecido liso muscular com formação da placa (JUDE et al., 2001; BOULTON et al., 2005; OZAN et

al., 2017; SINWAR, 2018). Como dito acima, a doença vascular periférica no diabetes parece ser um processo que inclui alterações do endotélio, plaquetas, células musculares lisas, lipoproteínas de coagulação. A insulina desempenha papel na captação e remoção pelo tecido adiposo dos triglicerídeos plasmáticos, assim sua deficiência exporia o sistema vascular à ação de mais altos níveis de lipoproteínas de origem endógena e exógena (AMARANTE et al., 2007; KALANI et al., 2008). Ela também estimula diretamente a proliferação e a migração de células musculares lisas e diminui os receptores da lipoproteína de alta densidade (HDL) dos fibroblastos (BRANDÃO; TRINDADE; PINHEL, 2005).

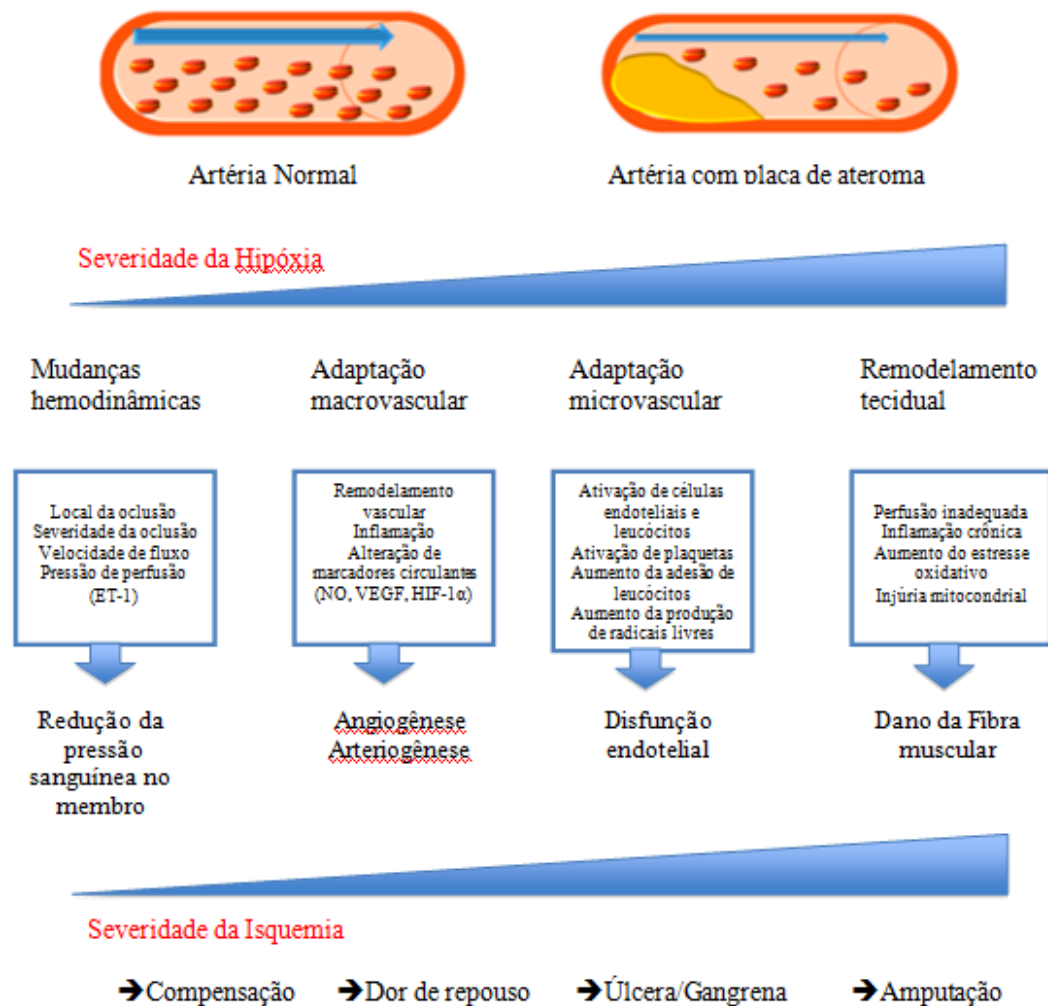
A hiperglicemia parece desempenhar um papel direto na lesão vascular, com estímulo a proliferação de fibroblastos e células musculares lisas da parede arterial. Esse estímulo parece estar relacionado com a produção dos AGE, produtos avançados da glicação de proteínas, que contribuem para o aumento do estresse oxidativo e da inflamação. Os monócitos têm receptores para AGEs, que se acumulam na matriz extracelular (MEC), formando compostos reativos que se ligam às lipoproteínas e retardam seu *clearance*. Os macrófagos e monócitos encontrados nas placas ateroscleróticas têm receptores de alta afinidade para esses AGEs e quando interagem secretando fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), que estimula a produção e secreção de colágeno tipo IV e proliferação de células endoteliais, mesangiais e musculares lisas (AMARANTE et al., 2007; BARBOSA et al., 2016). Além disso, com a hiperglicemia há aumento de hemoglobina glicosilada, gerando uma menor disponibilidade de oxigênio, o que leva à hipóxia tecidual e, com isso, o desenvolvimento da lesão vascular e aceleração da aterosclerose (FENG et al., 2014).

Do ponto de vista hemodinâmico, a limitação obstrutiva do fluxo sanguíneo arterial com isquemia dos tecidos irrigados é o distúrbio fundamental na aterosclerose das extremidades, gerando sinais e sintomas decorrentes dessa inadequada oxigenação. O fluxo sanguíneo depende de algumas variáveis, sendo diretamente proporcional à quarta potência do raio do vaso e inversamente proporcional à resistência periférica. Então nas estenoses o raio da região estenosada e o gradiente pressórico são os fatores mais importantes na limitação do fluxo para a extremidade. A presença de uma ou mais placas em determinados pontos de uma artéria, provocando o seu estreitamento, traduz-se clinicamente pelo início dos sintomas, como parestesias relacionadas ao exercício, porém o exame físico é normal. Com a evolução do processo ateromatoso, a luz arterial vai sofrendo redução gradual até atingir um ponto crítico em que o fluxo seja suficiente para manter estado normal em repouso, porém ao exercício mostra-se insuficiente, dando origem à claudicação intermitente. Com a evolução da

doença e na medida em que aumenta o volume da placa e o efeito da estenose, começam a surgir alterações na coloração, temperatura e fenômenos vasomotores. Em repouso, há a necessidade da presença de estenose de 85% a 95% de um vaso de grande calibre para haver limitação do fluxo (FIDDIAN; BYAR; EDWARDS, 1964; YOUNG; CHOLVIN; KIRKEEIDE, 1977).

Em uma fase avançada da doença pode ocorrer obstrução arterial grave, e se não houver adequado desenvolvimento de circulação colateral, os pacientes apresentam sinais e sintomas de isquemia, mesmo em repouso. A circulação colateral é constituída de vasos preexistentes, relativamente não funcionantes, quando a artéria principal está pérvia, porém quando a via principal encontra-se obstruída esses vasos colaterais são passíveis de dilatação. A gangrena no membro ocorre quando o fluxo diminui a tal ponto que os tecidos não recebam mais oxigênio em níveis suficientes para manter sua integridade (Figura 2). A doença arterial periférica não é apenas um distúrbio hemodinâmico, pois fatores adicionais estão envolvidos, como a estrutura neuromuscular, que pelo descondicionamento e pela inatividade, geram lesão muscular e atrofia, assim como a função metabólica (ANDERSEN, 2010).

Figura 2 - Representação da resposta à isquemia na DAOP



Legenda: À medida que ocorre a formação da placa de ateroma, aumenta a severidade da hipóxia com mudanças na resposta ao processo inflamatório, disfunção endotelial e reparo mediadas por mediadores inflamatórios, correlacionando-se com as manifestações clínicas da doença.

Fonte: Adaptado Krishna, Moxon e Golledge (2015).

1.1.3 Manifestações clínicas

Os sintomas da DAOP são, em geral, insidiosos e graduais em sua evolução, levando à procura por atendimento médico em estágio avançado da doença. A DAOP pode ser classificada em estágios pela classificação de Fontaine, e em graus e categorias pela classificação de Rutherford (VAQUERO, 2016) (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 - Classificação de Fontaine

Estágio	Quadro clínico
I	Assintomático
IIa	Claudicação intermitente leve (limitante)
IIb	Claudicação intermitente moderada/grave (incapacitante)
III	Dor de repouso
IV	Úlcera ou gangrena (lesões tróficas)

Quadro 2 - Classificação de Rutherford

Grau	Categoria	Quadro clínico
0	0	Assintomático
I	1	Claudicação intermitente leve
I	2	Claudicação intermitente moderada
I	3	Claudicação intermitente grave
II	4	Dor de repouso
III	5	Perda tecidual pequena
IV	6	Perda tecidual grande

Os sinais e sintomas resultantes da isquemia dos tecidos dependem da artéria acometida pela aterosclerose. A claudicação intermitente é um sintoma característico da DAOP, na maioria dos casos, a primeira manifestação da doença. É descrita como dor, câimbra, aperto ou fadiga de determinada musculatura durante o exercício, melhorando com a interrupção do mesmo. Esse desconforto ocorre em um grupo muscular distal à oclusão arterial e sua localização mais comum é a panturrilha, provocada pela oclusão da artéria femoral superficial. Aparece após caminhadas extensas ou grandes esforços como subir escadas ou ladeiras, e com a evolução da doença, a distância da claudicação diminui e o tempo para a recuperação aumenta. A distância da claudicação varia com a extensão e com a gravidade da obstrução arterial e com o grau de desenvolvimento da circulação colateral. Essa rede colateral desenvolve-se gradualmente e permite a viabilidade dos tecidos mais distais à obstrução (MAKDISSE et al., 2007).

A isquemia que ameaça o membro é definida como um fluxo sanguíneo arterial insuficiente para atender às necessidades metabólicas do tecido em repouso, surgindo quando

a rede colateral torna-se insuficiente para prover os tecidos mais distais. Assim a isquemia crítica seria diagnosticada clinicamente como dor de repouso ou lesão trófica nos membros (estágios III e IV de Fontaine). A dor de repouso manifesta-se como queimação nas regiões mais distais dos membros inicialmente e podendo evoluir para todo o membro. Ocorre mais comumente à noite ou piora à noite quando o membro está em posição horizontal, sendo referida como dor intensa, persistente que impede o sono. O paciente procura o alívio esfregando o local, deambulando, flexionando ou mantendo o pé pendente, já que melhora com o declive, provavelmente pelo aumento da pressão arterial induzido pela gravidade. Essa dor sinaliza que as condições da extremidade estão se deteriorando e que o membro encaminha-se para necrose ou ulceração. Dor moderada ou intensa pode acompanhar os casos com ulcerações e/ou gangrenas, também piora à noite e não diminui com o repouso, exceção dos pacientes diabéticos com neuropatia. Há queixas de parestesias nas extremidades assim como frialdade (CRIQUI; ABOYANS, 2015; CONTE; VALE, 2018).

No exame físico, a diminuição ou ausência de pulso é o sinal mais característico da DAOP, indicando o provável local da lesão. Em casos de claudicação intermitente, pulsos aparentemente normais podem desaparecer durante a caminhada. As alterações tróficas costumam ocorrer quando a isquemia é grave observando-se queda de pelos, unhas espessadas, pele seca e descamativa, úlceras isquêmicas dolorosas que com frequência resultam de traumas, geralmente estão infectadas, com cicatrização difícil e com evolução em muitos casos para gangrena. As ulcerações aparecem mais na porção distal dos artelhos, ao redor das unhas e não costumam causar infecção grave, porém as gangrenas de pé e/ou perna podem acarretar em infecção generalizada do paciente. E a partir dessas infecções ocorrem osteomielite, e necroses ósseas (Figura 3). As alterações na coloração dos pés são comuns, podendo ser verificada palidez em repouso ou com a elevação do membro e eritrocianose em declive. É comum observar atrofia da musculatura com perda do tônus muscular. Pode aparecer edema nos casos avançados em que pela dor de repouso o paciente mantém o pé pendente para aliviar a dor (PICCINATO; CHERRI; MORIYA, 2001; ALVIM et al., 2018).

Figura 3 - Lesão em paciente DAOP



Legenda: Paciente portador de DAOP, hipertenso e diabético, atendido na emergência do Hospital Municipal Souza Aguiar, apresentando gangrena de segundo e terceiro pododáctilos esquerdos com extensão para dorso do pé.

Fonte: A autora, 2017.

1.1.4 Diagnóstico

A utilização de métodos diagnósticos não invasivos é útil na confirmação diagnóstica e na documentação da DAOP. Os dados obtidos são importantes para o seguimento do tratamento clínico e/ou cirúrgico.

O índice tornozelo-braquial (ITB) é o primeiro, mais simples e útil teste não invasivo. Traduz a perda global de pressão ao longo do sistema arterial secundário à obstrução, detecta a DAOP com repercussão hemodinâmica, estratifica a gravidade das lesões tanto na fase sintomática quanto assintomática, monitoriza a progressão da DAOP e avalia a capacidade funcional dos pacientes. Trata-se da relação entre a pressão sistólica arterial dos tornozelos e a pressão sistólica dos braços. Em condições normais a pressão sistólica dos membros inferiores é igual ou ligeiramente maior que a dos membros superiores. Na presença de obstrução arterial nos membros inferiores capaz de provocar redução da pressão nos leitos distais à lesão, há queda na pressão sistólica dos tornozelos e, conseqüentemente, diminuição nos valores do ITB. Nos pacientes diabéticos o valor do ITB está falsamente elevado pela calcificação da camada média arterial ou arteriosclerose de Monckeberg, dificultando a avaliação da DAOP (NATIVEL et al., 2018). A classificação mais utilizada correlacionando o valor do ITB com a gravidade da DAOP encontra-se no quadro 3. Os valores tendem a ser mais altos quando a lesão está confinada às artérias poplíteas ou abaixo do joelho e mais

baixos nos membros com lesões em múltiplos níveis. O ITB diminui quando a gravidade funcional da doença aumenta, com valores mais baixos sendo obtidos em membros com gangrena iminente, e os mais altos, em membros com claudicação leve. Correlaciona-se com os achados arteriográficos, valores mais baixos na obstrução completa e mais altos na alteração ateromatosa mínima. A diminuição consistente indica progressão da doença ou insucesso de uma reconstrução. Uma elevação pode ser devida ao aparecimento de circulação colateral ou após uma intervenção bem-sucedida (SACKS et al., 2003; CRIQUI; ABOYANS, 2015; INAMPUDI et al., 2018). O valor de ITB abaixo do normal (menor ou igual a 0,9) apresenta sensibilidade de 90 a 97% e especificidade de 98 a 100% para estenoses que comprometam 50% ou mais da luz de um ou mais vasos de maior calibre nos membros inferiores.

Para a realização do ITB recomendam-se os aparelhos de esfigmomanômetro aneroides ou de coluna de mercúrio. Como regra geral, a largura da bolsa inflável deve corresponder a 40% da circunferência do braço do paciente. Mede-se a pressão sistólica nos braços do paciente com o auxílio dos aparelhos de *doppler* portáteis (transdutor de 5 a 10MHz). Em seguida, localiza-se os pulso tibial posterior e o pedioso por palpação digital, e com o auxílio do *doppler* mede-se a pressão sistólica da artéria tibial posterior e da artéria pediosa. Isso é feito em cada membro inferior do paciente (Figura 4). O valor do ITB será calculado para cada membro inferior. A maior pressão sistólica registrada nas artérias braquiais será o denominador tanto da medida do ITB direito quanto do esquerdo. O numerador será a maior medida do tornozelo, pediosa ou tibial posterior, correspondente ao ITB que está sendo avaliado (MAKDISSE, 2004).

ITB (direito ou esquerdo) = Maior pressão do tornozelo (direito ou esquerdo) / Maior pressão do braço

Quadro 3 - Valores de ITB e sua interpretação

Valor do ITB	Interpretação
1,1 ± 0,1	Normal
0,6 ± 0,15	Claudicação
0,26 ± 0,13	Dor de repouso
0,05 ± 0,08	Gangrena

Fonte: Makdisse (2004).

Figura 4 - Imagem representativa da realização do ITB



Fonte: Makdisse (2004).

O mapeamento duplex (*duplex scan*) torna possível a obtenção da imagem vascular e da medida de fluxo pelo efeito *doppler*, fornece informações sobre as lesões, estrutura da parede arterial e relações anatômicas. Tornou-se parte essencial da avaliação não-invasiva da DAOP, sendo portanto muito utilizado. Traz grande auxílio no manuseio dos pacientes com DAOP, sendo um exame anterior à arteriografia, substituindo-a em alguns casos e permitindo o acompanhamento dos doentes após tratamento cirúrgico. Por ter um custo baixo torna-se ideal para a triagem dos pacientes e seguimento.

A arteriografia é um método invasivo indicado nos pacientes com DAOP quando cogita-se o tratamento cirúrgico. A arteriografia fornece informações sobre o local exato da oclusão, extensão desta, multiplicidade de lesões, condições dos vasos acima e abaixo da obstrução e circulação colateral, o que a torna importante para a tomada de decisão terapêutica (NORGREN; HIATT; DORMANDY, 2007). Esse procedimento necessita de uma infra-estrutura para sua realização. É feita numa sala de hemodinâmica, hoje realizada pela digitalização de imagens, com uso de menos volume de contraste iodado. Realiza-se uma punção arterial, com introdução de um fio-guia e passagem de uma bainha pela qual é introduzido um cateter, pelo qual injeta-se contraste, sendo visualizada a anatomia vascular (Figura 5).

Figura 5 - Imagem obtida por arteriografia apresentando ateromatose de aorta e ilíacas



Fonte: Maffei et al., 2008.

1.1.5 Tratamento

O tratamento clínico é indicado quando a claudicação intermitente não limitante é o único sintoma e quando o paciente apresenta dor de repouso, úlcera ou gangrena e suas condições vasculares não permitem ou contraídicam o tratamento cirúrgico, e quando não há possibilidade de recanalização arterial percutânea.

O tratamento consiste na abstenção do fumo, já que o tabagismo mostra-se como um fator importante na manutenção e agravamento da DAOP. Orientação de caminhada programada, parte mais importante do tratamento clínico, em que é recomendado ao paciente que o mesmo caminhe até que a dor atinja um nível que impeça a continuação da deambulação, parando e aguardando a desaparecimento da dor e retomando a caminhada. O mecanismo responsável por essa melhora não é bem conhecido, acredita-se que leve a um mecanismo de adaptação da célula muscular, com melhora do metabolismo oxidativo e assim melhor aproveitamento de oxigênio pelos músculos. O tratamento farmacológico baseia-se no uso do cilostazol (inibidor da fosfodiesterase III, atua na inibição da ativação e agregação plaquetária e tendo ação vasodilatadora direta), ácido acetilsalicílico (anti-agregante plaquetário), analgésicos, prostaglandinas venosas (efeito vasodilatador, agindo preferencialmente na microcirculação), antibióticos no caso de lesões infectadas e curativos nas feridas. A escolha do tratamento cirúrgico, cirurgia de revascularização por técnica endovascular ou cirurgia direta, depende da extensão da doença aterosclerótica, do acometimento tecidual e das condições clínicas do paciente, assim como a necessidade de

amputação do membro dependerá do grau da doença (NORGREN; HIATT; DORMANDY, 2007; SETACC et al., 2011; NATIVEL et al., 2018).

1.2 Biomarcadores de resposta à isquemia na prática clínica

1.2.1 Endotelina

Em 1988, Yanagisawa et al. identificaram um potente fator constrictor derivado do endotélio, que passou a ser denominado de endotelina, capaz de mediar uma constrição de início lento, mas com duração prolongada, podendo atingir de alguns minutos até horas (BARTON, YANAGISAWA, 2008). Este peptídeo de 21 aminoácidos e é sintetizado a partir de um precursor inativo (grande endotelina) e clivado por enzimas conversoras de endotelina (ECE) em três isoformas: endotelina-1 (ET-1), endotelina -2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). Estas, em conjunto com os receptores ETA e ETB, compõem o sistema endotelina. A pré-endotelina-1 humana possui 212 aminoácidos, e é clivada por endopeptidases específicas, dando origem à pro-endotelina-1, cuja conversão em ET-1 ocorre predominantemente no plasma e não no interior das células endoteliais, visto que a pro-endotelina-1 é encontrada em maiores quantidades do que seu produto final no plasma (SUZUKI; KAJIKURI; ITOH, 1991; HOWARD; PLUMPTON; DAVENPORT, 1992). Entretanto, a forma madura de ET-1, já foi detectada no interior do citoplasma de células endoteliais, sugerindo que alguma conversão ocorre no interior da célula. A síntese de ET-1 a partir de pro-endotelina-1 ocorre por meio da ação da ECE (YANO et al., 1991).

A ET-1 é a única endotelina liberada pelo endotélio vascular, e possui potentes propriedades vasoconstrictoras, além de promover a proliferação de células musculares lisas na parede vascular (INOUE et al., 1989; TSUI; SHI-WEN, 2011). Os agonistas que estimulam a liberação de ET-1, como a trombina, angiotensina II e a vasopressina, atuam através da transcrição de novo de RNA mensageiro quando há exposição desses às células endoteliais (FENG et al., 2014). A ET-1 contribui para o tônus vascular primariamente por exercer uma constrição tônica sustentada. Existem locais de ligação específicos e de alta afinidade para as endotelinas nos vasos sanguíneos, coração, adrenais, rins e cérebro, com uma distribuição que sugere um papel cardiovascular.

Diferentes respostas à endotelina sugerem a existência de pelo menos três tipos de receptores. Dois desses receptores foram isolados pela expressão de DNA *in vitro* (INOUE et al., 1989). O receptor ETA está presente em diversos tecidos humanos, com maior expressão na aorta, coração, pulmão e rins (HOSODA et al., 1991). Um segundo receptor o ETB foi pode ser encontrado em diferentes tecidos, como córtex cerebral, cerebelo, aorta, rins, pulmões e células endoteliais. A ET-1 liga-se aos receptores específicos, ETA e ETB, localizados predominantemente nas células musculares lisas, onde causam vasoconstrição. Embora tenham menor potência, as ET-2 e ET-3 também provocam vasoconstrição (MORELAND et al., 1992; KIRKBY et al., 2012). Os antagonistas seletivos dos receptores ETA e ETB já foram isolados e incluem, respectivamente, o BQ-123 e o BQ-788. Esses antagonistas têm sido úteis para avaliar os níveis de ET-1 na circulação periférica em seres humanos. Além disso, o antagonista de ambos os receptores, tais como o bosentan, já vem sendo usado na prática clínica em pacientes com hipertensão arterial pulmonar. Esses antagonistas têm sido, portanto, úteis para avaliar a ação da ET-1 na circulação periférica em seres humanos (BARTON; YANAGISAWA, 2008; HUCKLE et al., 2001; JEREMYA et al., 2011).

Níveis elevados de ET-1 têm sido reportados em condições isquêmicas agudas e crônicas, como falência renal, síndrome coronariana aguda, acidente vascular cerebral e DAOP, assim como em outras condições patológicas como a hipercolesterolemia (BARANI et al., 2006). A ET-1 exerce seus efeitos por uma série complexas de eventos intracelulares que incluem a ativação da fosfolipase C, aumento da transcrição genética e interações com canais iônicos. O evento final que resulta em vasoconstrição decorre de um aumento da concentração intracelular de cálcio. As endotelinas inibem a síntese de NO, através dos receptores ETA, em células musculares lisas. Os inibidores da NO sintase também potencializam os efeitos constritor e pressor da ET-1, sugerindo que exista um mecanismo autócrino de retroalimentação que regula o efeito vasoconstrictor da endotelina (BACON; CARY; DAVENPORT, 1995). Embora o papel da endotelina como um potente vasoconstrictor sistêmico e coronário tenha sido bem estabelecido, existem evidências de que a endotelina possa participar na patogênese e nas manifestações clínicas da aterosclerose, exercendo um papel nos estágios clínicos iniciais com disfunção endotelial até a isquemia. A ET-1 é liberada em resposta à lesão vascular, agindo como fator pró-inflamatório, sendo um importante estímulo à quimiotaxia e adesão de monócitos circulantes, bem como a ativação de macrófagos e na indução da expressão de moléculas de adesão. Além disso, aterosclerose potencializa a atividade vasoconstrictora da endotelina e ligação ao receptor (JANKOWICH;

CHOUDHARY, 2019).

1.2.2 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

O VEGF tem sido conhecido por ser um regulador central no processo de angiogênese. A família do VEGF inclui VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e fator de crescimento placentário (PLGF-1 e PLGF-2). O VEGF por meio de seu receptor tirosina-quinase (VEGF-R1 e VEGF-R2) ativa várias vias pró-angiogênicas. O VEGF-A afeta o processo de angiogênese por induzir o gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e, por conseguinte, a produção de NO e a ativação da metaloproteinases. De forma similar, o efeito pró-angiogênico do VEGF-B mediado pela sinalização do VEGFR-1 está associado à ativação da via relacionada à eNOS (SILVESTRE et al., 2001; KRISHNA; MOXON; GOLLEDGE, 2015; INAMPUDI et al., 2018).

Em resposta à isquemia tecidual são ativadas vias de inflamação, apoptose e remodelamento vascular, ocorrendo alterações estruturais nos vasos pré-existentes com aumento de circulação colateral para aumentar e redistribuir o fluxo sanguíneo (arteriogênese) ou formação de novos vasos (angiogênese). Nesse processo estão envolvidos numerosos fatores de crescimento induzidos pela hipóxia, dentre eles, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator induzido pela hipóxia (HIF) - 1α , que tentam compensar e resolver a hipóxia tecidual com mudanças hemodinâmicas e essas adaptações microvasculares. Com o aumento da severidade da hipóxia, as adaptações macro e microvasculares não são suficientes, havendo portanto injúria mitocondrial e geração de radicais livres com consequente dano da fibra muscular e fibrose. Essas etapas de mudanças com diminuição do suprimento sanguíneo e aumento de metabólitos levam às manifestações clínicas, como dor em repouso, gangrena e, finalmente, perda da viabilidade do membro (MCDERMOTT et al., 2005; KRISHNA; MOXON; GOLLEDGE, 2015) (Figura 2).

O VEGF-A é provavelmente o fator angiogênico mais importante, sendo requerido na fisiopatologia da angiogênese e pequenas mudanças na sua expressão podem levar à alterações no crescimento e remodelamento vascular. As angiopoetinas ligam-se ao receptor endotelial Tie2 e a angiopetina 2 é regulada e recrutada pelo VEGF nesse processo (JONES et al., 2001; FINDLEY et al., 2008; GARDNER et al., 2014). Formas solúveis de VEGFR-1 e Tie2 são produzidas e secretadas na circulação, onde podem se ligar aos seus respectivos

fatores de crescimento e inibir a angiogênese. Enquanto o VEGFR-1 solúvel é produzido pelo gene do VEGFR1, o Tie2 solúvel resulta da clivagem proteolítica de um receptor na membrana, e ambas as proteínas estão implicadas na patogênese da doença cardiovascular. (LEE; LIP; BLANN, 2004; HAZARIKA et al., 2007).

A DAOP é caracterizada por isquemia tecidual e a hipóxia tecidual resultante fornece um potente estímulo angiogênico. Portanto, o DAOP deve resultar na regulação positiva de fatores angiogênicos para induzir uma resposta angiogênica compensatória, e o VEGF, Ang2 e o sVEGFR-1 são todos conhecidos por serem suprarregulados por hipóxia *in vitro* (PICHIOLE; CHAVEZ; LAMANNA, 2004). Uma série de estudos examinou os níveis circulantes de proteínas moduladoras da angiogênese no contexto de doenças cardiovasculares ou em pacientes com fatores de risco para tal, como hipertensão e diabetes *mellitus*, e assim constatou-se que as concentrações plasmáticas de VEGF, Ang2 e sTie2 aumentaram o quadro de doença arterial coronariana, síndromes coronarianas agudas e hipertensão (LEE; LIP; BLANN, 2004; NADAR et al., 2005). Nos pacientes com DAOP, a isquemia tecidual causada pelo estreitamento dos vasos como resultado da placa de ateroma serve de impulso para os fatores induzidos pela hipóxia (por exemplo, o HIF-1 α) e por meio deles as células endoteliais produzem o VEGF-A. Este leva à ativação e migração de células endoteliais e inibe a sua apoptose, além disso, mobiliza os progenitores das células endoteliais que migram para os tecidos isquêmicos, onde diferenciam-se em células endoteliais e proliferam-se rapidamente. (BAO et al., 2009; WIECZÓR et al., 2015).

Estudos sugerem que no sangue de pacientes com aterosclerose e diabetes, as concentrações de VEGF-A encontram-se diminuídas, enquanto as de VEGFR-1 e VEGFR-2 solúveis encontram-se aumentadas inibindo a angiogênese, ou seja, a hipóxia tecidual estimularia a formação de novos vasos, porém as taxas elevadas de glicose inibiriam essa formação e portanto piorariam a doença arterial (FINDLEY et al., 2008). Isso pode estar relacionado com a visão atualmente adotada de que a hiperglicemia tem um impacto considerável nos danos funcionais e estruturais às células endoteliais vasculares - as chamadas complicações microangiopáticas (LIM et al., 2004). A coexistência de diabetes tipo 2 e DAOP é demonstrada pelos baixos níveis plasmáticos do fator proangiogênico (VEGF-A) e por níveis mais altos de inibidores da angiogênese (sVEGFR-1 e sVEGFR-2). Independentemente da coexistência de diabetes tipo 2, a hipóxia parece ser um fator crucial que estimula os processos de angiogênese em pacientes com DAOP comparável a indivíduos saudáveis, enquanto a hiperglicemia pode ter um impacto negativo (inibitório) na angiogênese em membros inferiores. O papel dos receptores solúveis sVEGFR-1 e sVEGFR-2 como

inibidores angiogênicos vem sendo estudado, já que ao formarem complexos com o VEGF-A diminuem a biodisponibilidade do VEGF-A aos receptores endoteliais e com isso, sua atividade (BOTI et al., 2012; LIU et al., 2014). Alguns estudos sugerem diferenças na expressão dos fatores de crescimento envolvidos na angiogênese e de seus receptores, e a sua relação com as diferentes manifestações clínicas da DAOP, sendo mais elevados os níveis nas fases avançadas com lesão trófica (FINDLEY et al., 2008; STEHR et al., 2010; KIKUCHI et al., 2014).

1.2.3 Fator de crescimento transformador - beta (TGF- β)

O TGF- β trata-se de uma das citocinas mais estudadas pelo seu papel na progressão da aterosclerose e na hiperplasia neointimal. Exerce papel no desenvolvimento, migração, diferenciação em matriz extracelular (MEC), além de imunomodulador. Os membros da superfamília do TGF- β são produzidos de precursores latentes sem atividade biológica que são ativados no meio extracelular. Vários membros da família têm papel na biologia vascular. O TGF- β 1, primeiro membro a ser descoberto, está presente em altos níveis em indivíduos com parede vascular saudável, enquanto as isoformas TGF- β 2 e TGF- β 3 estão ausentes ou em baixos níveis. O TGF- β 1 é o mais bem estudado da família, assim como dos receptores TGF- β RI e TGF- β RII (GRAINGER, 2004). É considerado benéfico na prevenção da aterosclerose sendo chamado de citocina protetora, pelo seu efeito nas células da musculatura lisa vascular. Estudos mais antigos sugeriam que o TGF- β promovia a proliferação da musculatura lisa (BATTEGAY et al., 1990; STOUFFER; OWENS, 1992), porém em muitas condições em que a proliferação é estimulada por fatores de crescimento, o TGF- β inibe a proliferação das células da musculatura lisa, além de inibir a sua migração (BJORKERUD et al., 1991; GRAINGER; METCALFE, 1995).

A primeira evidência do papel do TGF- β 1 na doença vascular foi vista em estudos com balonamento arterial em ratos, mostrando a influência da sua ativação ou inibição no processo da doença com formação da neointima, deposição na matriz extracelular e proliferação das células da musculatura lisa (MAJESK et al., 1991; SCHULICK et al., 1998; SMITH et al., 1999). Confirmando esses resultados, observa-se que pacientes com grau severo de reestenose também exibem níveis diminuídos de TGF- β 1 (NIKOL et al., 1992). O TGF- β inibe a proliferação, ativação e diferenciação das células T em Th1 e Th2

(METCALFE; GRAINGER, 1995; COBBOLD et al., 2004). Muitas células associadas ao ateroma têm a capacidade de produzir TGF- β 1, cuja função imunomoduladora na placa está relacionada à sua propriedade em regular as células T e inibir a resposta pró-inflamatória medida por IL- 6.

A complexidade do papel do TGF- β na parede do vaso está baseada não apenas nos efeitos sobre os leucócitos, mas também nos compartimentos endoteliais e da musculatura lisa. A elaboração da matriz extracelular é uma das maiores funções das células musculares lisas, e o balanço entre a sua população e a de leucócitos no desenvolvimento da placa de ateroma é o grande determinante da estabilidade da mesma. Conseqüentemente, o TGF- β exerce papel central na regulação da estabilidade da placa, influenciando na sua morfologia por dois caminhos: supressão do recrutamento de leucócitos e como citocina fibrogênica. O TGF- β protege contra a formação inicial das estrias gordurosas, como também contra o desenvolvimento das lesões instáveis por favorecer a capa fibrosa (LUTGENS et al., 2002; GRAINGER, 2004). Estudos onde foi observada uma formação mais instável da placa nos casos de deficiência do TGF- β 1, corroboram com isso, mostrando que a diminuição da fibrose e o aumento das contagem de células inflamatórias na placa elevam o risco de ruptura da placa. Alguns estudos relataram que placas instáveis teriam mutações celulares no seu receptor tipo II que perderia a capacidade de sinalizar e levando conseqüentemente à diminuição da sensibilidade ao TGF- β 1 (McCAFFREY, 2000). O papel anti-aterosclerótico do TGF- β tem sido reforçado por estudos que evidenciam a relação negativa entre seus níveis plasmáticos e a presença de doença coronariana, e resultados similares em estudos com pacientes com DAOP (DiCHIARA et al., 2000; MCDERMOTT et al., 2005; COOKE; WILSON, 2010; SIGNORELLI et al., 2012).

1.2.4 Óxido nítrico (NO)

O endotélio normal participa de modo essencial na regulação do tônus vascular, na resposta inflamatória, na coagulação/fibrinólise e na resposta imune. Seu principal produto vasodilatador, o óxido nítrico (NO), que protege contra lesão vascular, inflamação e trombose. O NO é um gás com meia-vida de vários segundos. É sintetizado por uma família de enzimas NO sintase (NOS) que produzem NO e citrulina pela oxidação de cinco elétrons do terminal azotado de guanidina da L-arginina (substrato para a síntese de NO). Três

isoformas distintas de NOS foram identificadas em seres humanos e outros organismos. Dois deles são constitutivamente expressos: NOS neuronal (nNOS; também conhecida como NOS-1, porque foi a primeira isoforma descoberta) e NOS endotelial (eNOS; NOS-3). Ambos são regulados por cálcio e calmodulina e por modificações pós-traducionais das enzimas. A terceira isoforma é NOS induzível (iNOS; NOS-2) que é regulada pela estimulação de citocinas e produz quantidades de NO muito superiores às produzidas pelas outras duas isoformas. As enzimas NOS são expressas por uma variedade de tipos de células. A eNOS foi identificada em células musculares endoteliais e lisas, miócitos cardíacos, células ósseas e neurônios. A nNOS foi encontrada em neurônios, músculo esquelético, pâncreas e rins. A iNOS pode ser expressa em quase qualquer tipo de célula sob estimulação de citocina, mas também é constitutivamente expressa em alguns tecidos, como a parede do intestino (McNAMARA et al., 1993; MARKS et al., 1995).

NO inibe a adesão leucocitária ao endotélio, evita a proliferação das células musculares lisas e é anti-trombótico porque limita a agregação plaquetária. Na presença de fatores de risco, como a hipercolesterolemia, tabagismo, diabetes *mellitus* e hipertensão arterial essas defesas do endotélio entram em colapso, há uma maior produção de radicais livres e menor atividade do NO nas células endoteliais pela diminuição da NO sintase (AKKOCA et al., 2017). Uma quantidade maior de ânions superóxido acarreta a ativação do fator nuclear κ B (NF κ B) mediante a fosforilação e a degradação da proteína inibidora (I κ B). A seguir, NF κ B fica livre e penetra no núcleo para iniciar a transcrição de genes pró-aterogênicos, tais como a molécula de adesão das células vasculares e o peptídeo 1 quimioatrativo dos monócitos (KRISHNA; MOXON; GOLLEDGE, 2015; QIANG et al., 2015). O óxido nítrico pode inibir esses processos pela inibição da produção de superóxido, varrendo diretamente os ânions superóxido e aumentando a transcrição e atividade da I κ B. Além disso, por ser o NO um fator parácrino, poderá exercer importantes efeitos inibitórios sobre os leucócitos circulantes e as células musculares lisas subjacentes. Assim, a formação de NO é essencial para a manutenção de uma função endotelial normal. Nos pacientes com DAOP, a síntese de NO pode ser inibida pelo composto endógeno dimetilarginina assimétrica (ADMA). Os níveis de ADMA nos pacientes com DAOP correlacionam-se diretamente com a inibição da síntese de NO e com a gravidade dos sintomas de claudicação (ABDELSALAM et al., 2015; AKKOCA et al., 2017).

A elaboração do NO é crucial para a função homeostática normal do endotélio. Pacientes com aterosclerose em desenvolvimento reduzem a biodisponibilidade de NO tanto na vasculatura coronariana quanto periférica. A importância do NO na aterogênese foi

sugerida em camundongos deficientes em apolipoproteína E (apoE), nos quais as lesões ateroscleróticas se desenvolveram espontaneamente quando a eNOS também foi suprimida. Entretanto, evidências também sugerem que o NO esteja envolvido na aterogênese. Os camundongos *knockout* para ApoE-iNOS demonstraram formação reduzida de placa aterosclerótica. Isto sugere que o NO derivado da eNOS pode proteger a vasculatura da aterosclerose, enquanto o NO da iNOS pode promover a formação de lesões (BARBATO; TZENG, 2004).

A hipercolesterolemia, um dos fatores de risco da aterosclerose, está associada com um aumento da produção de espécies reativas e com um aumento do estresse oxidativo, o que leva a uma alteração na biodisponibilidade de NO e/ou alterações funcionais no endotélio com importantes consequências na patogênese da aterosclerose. O estresse oxidativo aumenta também a produção e a liberação de ET-1 pelas células endoteliais, e a ET-1, por sua vez, pode aumentar o estresse oxidativo pelo estímulo da produção de radicais livres por macrófagos (LOFFREDO et al., 2006, 2013). Estudos com a administração de antagonistas dos receptores A e B relacionaram com uma melhora da função endotelial e com o aumento dos níveis de NO em modelos experimentais de hipercolesterolemia. Demonstraram também uma redução do estresse oxidativo relacionada à inibição dos receptores da endotelina. Concluiu-se assim a participação da ET-1 na regulação da atividade do NO e um possível papel para os seus inibidores na hipercolesterolemia (HUCKLE et al., 2001).

1.2.5 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

O PDGF e seus receptores (PDGFRs) representam uma das famílias mais intensamente estudadas de fatores de sinalização nas últimas quatro décadas. Eles constituem uma família com quatro cadeias polipeptídicas diferentes codificadas por quatro produtos gênicos (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D). As isoformas PDGF-A e PDGF-B formam tanto heterodímeros quanto homodímeros, resultando na isoforma PDGF-AB. Enquanto as isoformas PDGF-C e PDGF-D existem apenas como homodímeros. Estes ligantes atuam por meio de dois receptores do tipo transmembrana, o PDGFR- α e o PDGFR- β , que pertencem à classe dos receptores tirosina quinase; estes são codificados pelos genes *PDGFRA* e *PDGFRB* e estão localizados nos cromossomos 4 e 5 em humanos e 5 e 18 em camundongos (FREDRIKSSON; LI; ERIKSSON, 2004; KANAAN; STRANGE, 2017;

KAZLAUSKAS, 2017).

Para que as isoformas se tornem biologicamente ativas se faz necessário um processamento, que pode ser extra ou intracelular, visto que todos os PDGFs são produzidos e secretados por suas respectivas células. Alguns deles são secretados em sua forma latente assim, tornam-se ativos somente após serem processados por proteases como uroquinase, plasmina e matriptase. Este processamento proteolítico necessário é extracelular para as isoformas PDGF-C e PDGF-D, enquanto que nas isoformas PDGF-A, PDGF-B e PDGF-AB esta etapa ocorre intracelularmente antes da secreção. Após o processamento, as isoformas agora biologicamente ativas, são denominadas PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD (FREDRIKSSON; LI; ERIKSSON, 2004; LEWANDOWSKI et al., 2016).

A sinalização pelo PDGF é iniciada pela ligação de suas isoformas pelo lado extracelular do receptor, este contém 5 domínios semelhantes a imunoglobulinas, dos quais o domínio 2-3 está envolvido na ligação ao PDGF. A interação PDGF/PDGFR leva a indução da dimerização do PDGFR e a autofosforilação dos resíduos de tirosina no seu domínio intracelular. Assim, a exposição ao ligante dimeriza os PDGFRs, que *a priori* são monoméricos, gerando PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$ e PDGFR- $\alpha\beta$ (HYE-RYONG SHIM et al., 2010; CHEN; UNGER; HE, 2015). Os ligantes ligam-se a esses pares de receptores com diferentes afinidades. O PDGF-AA e o PDGF-CC ligam-se com alta afinidade ao PDGFR- $\alpha\alpha$ *in vitro* e *in vivo*. O PDGF-BB apresenta afinidade a todos os três dímeros de PDGFR *in vitro* e sinaliza através de PDGFR- $\beta\beta$ *in vivo*. PDGF-AB liga-se a PDGFR- $\alpha\alpha$ e PDGFR- $\alpha\beta$ *in vitro*. O PDGF-DD mostra afinidade ao PDGFR- $\beta\beta$ *in vitro*. O PDGF-CC e -DD ativam o heterodímero PDGFR- $\alpha\beta$ *in vitro*. A afinidade de ligação *in vivo* para os diferentes PDGFRs é desconhecida para PDGF-DD e -AB (KANAN; STRANGE, 2017). Ambos receptores são estruturalmente similares e ativam vias de transdução de sinal sobrepostas, incluindo fosfatidilinositol-3-quinase, Ras-MAPK, família Src de 42 quinases e fosfolipase C γ 0020 (TROJANOWSKA, 2009). Estas vias podem afetar várias funções celulares, incluindo crescimento, proliferação e diferenciação celular.

Tradicionalmente o PDGF é considerado um potente mitógeno de células de origem mesenquimal, como os fibroblastos, as células musculares lisas e as células gliais. Estudos mais recentes têm mostrado que ele tem efeito direto em outros tipos celulares, como as células neuronais, endoteliais e inflamatórias. Como mediador na inflamação, primeiramente o PDGF pode induzir a migração e proliferação de células musculares lisas na íntima, o que é importante no mecanismo da aterosclerose. Além disso, possui uma atividade de quimiotaxia que contribui para o acúmulo de fibroblastos e células musculares lisas nos sítios de lesão, e

subsequente resposta proliferativa. E finalmente o PDGF tem efeito na vasoconstrição (GROTENDERST et al., 1982; ZHANG et al., 2015).

O PDGF-A é sintetizado e secretado pelas células musculares lisas na camada íntima vascular durante a injúria, já o PDGF-B é produzido por macrófagos e células endoteliais. Os dois contribuem para o processo de aterosclerose regulando a migração e proliferação de monócitos/macrófagos e o espessamento da capa fibrosa da placa de ateroma (ARMULIK; ABRAMSSON; BETSHOLTZ, 2005; XIAO et al., 2007). PDGF-AA, PDGF-AB e PDGF-BB são potentes promotores da proliferação e migração das células musculares lisas (ZHANG et al., 2015). O PDGF-C e o PDGF-D descobertos mais recentemente, entre 2000 e 2001, são produzidos pelos macrófagos nas lesões ateroscleróticas e regulam a diferenciação dos monócitos, assim como sua migração e a expressão das metaloproteinases 2 e 9. O PDGF- C é expresso em células endoteliais de artérias normais e em todos os tipos de lesões, enquanto que o PDGF-D é expresso na parede arterial, em macrófagos e em células musculares lisas (OZAKI, TANAKA, 2016). Eles têm papel na maturação dos vasos sanguíneos e sua propriedade angiogênica inclui efeitos diretos nas células progenitoras vasculares, na regulação de outros fatores angiogênicos, como o VEGF, angiopoetina, metaloproteinases (CHAO et al., 2006; TANG et al., 2013). Muitos estudos avaliam o papel do PDGF em doenças arteriais, como cardiovasculares e cerebrovasculares, e os níveis do marcador encontram-se elevados. Da mesma forma em pacientes DAOP são evidenciadas elevadas concentrações de PDGF comparado aos controles, sem mostrar diferença com os graus da doença (CIMMINIELLO et al., 1999; THYGESEN et al., 2012; ZHANG et al., 2015; LEE; LI, 2018; FOLESTAD; KUNATH; WAGSAER, 2018).

1.2.6 Proteína C reativa (PCR)

A inflamação tem um papel importante na aterosclerose e dos marcadores inflamatórios a Proteína C Reativa parece estar associada independente da DAOP, até mesmo na normolipidemia (RIDKER et al., 1998; VU et al., 2005). Pode ser sintetizada em muitos locais, mas em especial no fígado, como proteína de fase aguda, por influência da IL-6. Alguns estudos sugerem que os valores de PCR estão independentemente relacionados com a duração do diabetes e o ITB, podendo ser útil no diagnóstico e no prognóstico da doença (RIDKER; STAMPFER; RIFAI, 2001; TZOULAKI et al., 2005). Os pacientes com DAOP

apresentam um aumento da resposta inflamatória devido aos elevados níveis de PCR. Este nível aumentado fomenta a proliferação do tecido muscular liso vascular, impedindo a regulação do tônus vascular, intensifica atividades pro-coagulantes, moléculas de adesão de leucócitos e substâncias quimiotáticas e inibe a síntese de óxido nítrico (NO) de células endoteliais, prejudicando a homeostasia fibrinolítica, como o inibidor do ativador do plasminogênio (PAI) -1 (BOSEVSKI; BOSEVSKA; STOJANOVSKA, 2013).

1.2.7 Fibrinogênio

O fibrinogênio é reflexo de um maior quadro inflamatório sistêmico como proteína de fase aguda, por influência da IL-6. Elevadas concentrações plasmáticas de fibrinogênio têm sido associadas à DAOP, pelo aumento da viscosidade sanguínea. Estudos mostraram que o fibrinogênio está associado com o controle do diabetes, idade, hipertensão arterial e dos componentes da síndrome metabólica. Os níveis elevados de fibrinogênio estão frequentemente presentes em pacientes diabéticos com DAOP, e há correlação dos valores de fibrinogênio e a extensão da doença (RIDKER; STAMPFER; RIFAI, 2001; BOSEVSKI; BOSEVSKA; STOJANOVSKA, 2013; APPIAH et al., 2015).

1.3 **Justificativa**

A DAOP é uma doença multifatorial em que a oclusão arterial resulta em um reduzido fluxo sanguíneo para o membro inferior, resultando em isquemia e dor e com a progressão da doença pode haver injúria tecidual, além de uma deterioração progressiva dos pacientes, e em alguns casos amputação de membro. Alguns pacientes evoluirão para eventos cardiovasculares e ao óbito, o que a torna um preditor de mortalidade. O sucesso do tratamento torna-se limitado pela alta morbidade, com grande risco de perda de membro e o alto custo para o paciente e para o sistema de saúde. Além disso, os graus avançados da doença devem-se em grande parte pela falta de reconhecimento precoce da mesma e pela ausência de programas de rastreamento universal. Apesar da sua importância, estudos relacionados aos efeitos dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento como

possíveis alvos no diagnóstico, evolução e abordagem da doença ainda são escassos na literatura, sendo a maior parte relacionada à doença coronariana e cerebrovascular.

Em linhas gerais, a realização deste trabalho tem relevância pelo impacto da doença vascular periférica na qualidade de vida e nas taxas de morbidade e mortalidade do paciente. Como muitos mediadores vasculares estão relacionados com essa fisiopatologia vascular, a dosagem desses mediadores tem como objetivo de correlacioná-los com a doença arterial obstrutiva dos membros inferiores, em busca de um conjunto de marcadores que possa ajudar como preditivos de severidade e prognóstico da doença, além de poder auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas adjuvantes à prática clínica, como o uso de antagonistas dos receptores de ET-1 e a terapia angiogênica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes com doença vascular obstrutiva periférica de membros inferiores.

2.2 Objetivos específicos

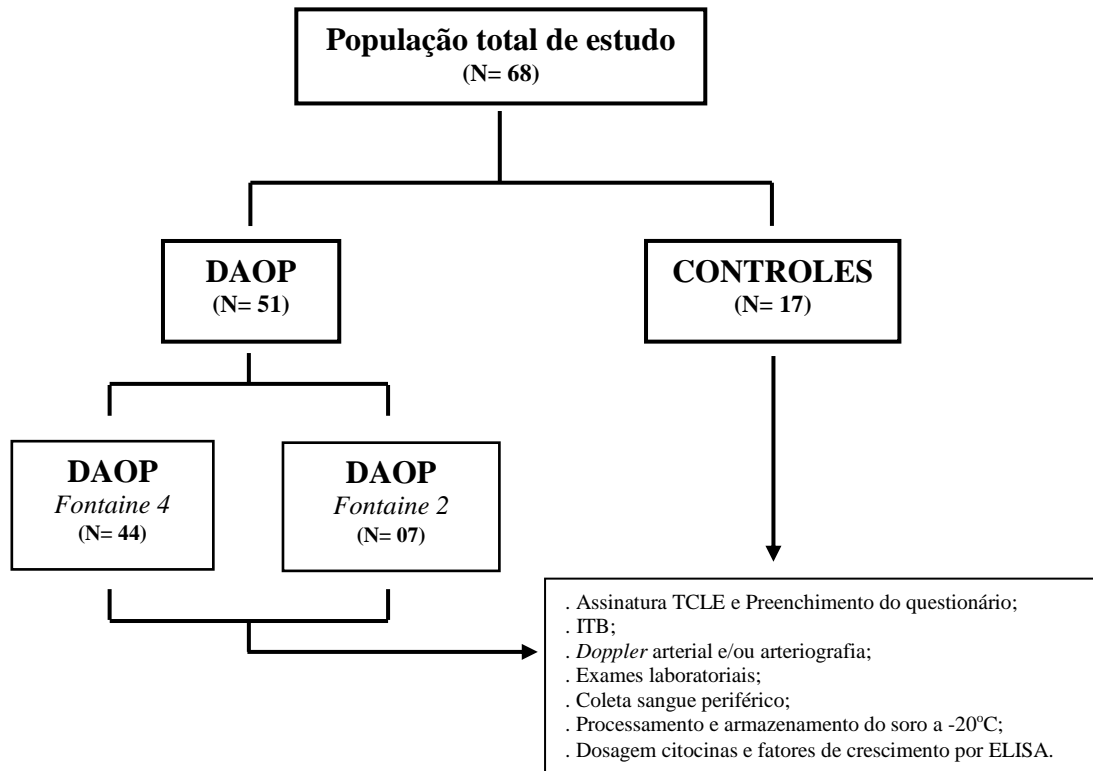
- a) Avaliar os níveis séricos de ET-1, VEGF-A, TGF- β 1, NO, PDGF-BB em pacientes com DAOP comparando com indivíduos saudáveis;
- b) Comparar os níveis séricos de ET-1, VEGF-A, TGF- β 1, NO, PDGF-BB em pacientes com DAOP com diferentes manifestações clínicas e com indivíduos saudáveis;
- c) Correlacionar os níveis séricos de ET-1, VEGF-A, TGF- β 1, NO, PDGF-BB em pacientes com DAOP com o perfil laboratorial (PCR e hemoglobina glicada).

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Nesse estudo de corte transversal foram recrutados pacientes atendidos pelo Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital Municipal Souza Aguiar do Rio de Janeiro (HMSA) e no Serviço de Cirurgia Vascular do Hospital do Andaraí com DAOP em diferentes manifestações clínicas. Destes, 44 possuíam alguma ferida e 07 apresentavam apenas claudicação intermitente (Figura 6). Foram recrutados também 17 indivíduos saudáveis que trabalhavam em diferentes setores dos hospitais acima mencionados (Figura 6). Todos os participantes consentiram em participar do projeto, assinando espontaneamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (nº 1.482.744 HMSA e parecer 1.542.150 HUPE) (APÊNDICES A, B e C e ANEXOS A, B e C). Todos foram orientados em relação aos procedimentos a serem adotados para a realização dos exames clínicos, bem como a coleta de amostras de sangue periférico para dosagens de parâmetros laboratoriais e dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento.

Figura 6 - Fluxograma da população de estudo



Legenda: N - número amostral; DAOP - pacientes com doença arterial obstrutiva periférica de membros inferiores; Controles - indivíduos saudáveis; Fontaine II - classificação do estadiamento da doença grau 2 (pacientes sem ferida); Fontaine IV - classificação do estadiamento da doença grau 4 (pacientes com ferida); TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido; ITB - índice tornozelo-braquial; ELISA - técnica de ensaio imunoenzimático.

3.2 População de estudo

Os pacientes com DAOP foram divididos em dois grupos: pacientes em fase inicial com claudicação intermitente e em tratamento clínico e acompanhamento ambulatorial (Fontaine 2); e pacientes com DAOP em estágio avançado, com dor de repouso e/ou lesão trófica, com indicação de revascularização (Fontaine 4).

O grupo controle (indivíduos saudáveis, n= 17) foi constituído de indivíduos sem história de hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus*, tabagismo e dislipidemia, fazendo parte dos mesmos critérios de exclusão.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os pacientes elegíveis apresentaram os seguintes critérios de inclusão:

- Portadores de DAOP evidenciada por *doppler* vascular (realizado com aparelho de ecocardiograma Philips HD7, com sonda linear de 5MHz), índice de pressão tornozelo- braço (realizado por intermédio de *doppler* vascular portátil modelo DV 610B, sendo considerado significativo quando valor menor que 0,9) e arteriografia (exame realizado por injeção de contraste não iônico intra-arterial, com obtenção das imagens por intensificador de imagem no centro cirúrgico, sendo consideradas lesões obstrutivas e estenóticas com repercussão hemodinâmica, sem tratamento cirúrgico prévio;
- Homens e mulheres com idade igual ou superior a 18 anos;
- Concordância na participação do estudo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os pacientes elegíveis não apresentaram os seguintes critérios de exclusão:

- Não concordar em participar do projeto;
- Insuficiência cardíaca;
- Exame HIV positivo;
- Histórico de cirurgia vascular prévia.

3.4 Avaliação laboratorial e radiológica

Nos candidatos ao estudo foram realizados exames laboratoriais com hemograma completo, glicemia de jejum, PCR, hemoglobina glicada e anti-HIV. Foram realizados em todos o eco *doppler* arterial com aparelho de ecocardiograma Philips HD7, com sonda linear de 5MHz e o índice de pressão tornozelo-braço por intermédio de *doppler* vascular portátil modelo DV 610B.

Os pacientes com DAOP em estágio avançado realizaram arteriografia, exame realizado por injeção de contraste não iônico intra-arterial, com obtenção das imagens por

intensificador de imagem no centro cirúrgico, sendo consideradas lesões obstrutivas e estenóticas com repercussão hemodinâmica, sem tratamento cirúrgico prévio. Esse exame foi realizado pela indicação cirúrgica, para o estudo da mesma.

3.5 Coleta e processamento das amostras

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos Vacuntainer® não heparinizados. As amostras de soro foram então armazenadas em freezer a -20°C até a realização das dosagens. Todas as leituras foram realizadas no espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific - Multiskan FC, catálogo: 51119000). As amostras foram coletadas após pelo menos 2 horas de repouso e sem fumar nos pacientes internados e claudicantes ambulatoriais. Os pacientes internados encontravam-se deitados no momento da coleta que ocorreu no início da manhã.

3.5.1 Dosagem sérica de endotelina-1

O kit utilizado para a dosagem de endotelina-1 humana foi do fabricante *R&D Systems* (Catálogo: DET 100). Na placa já pré-sensibilizada e bloqueada pelo fabricante, adicionamos $150\ \mu\text{L}$ /poço de diluente RD1-105 e, conforme o desenho da placa, $75\ \mu\text{L}$ /poço da curva-padrão e das amostras de soro, tal incubação foi em temperatura ambiente em um agitador de microplaca por 1 hora. Na sequência, após a lavagem, adicionamos $200\ \mu\text{L}$ /poço de anti-endotelina-1 conjugada (anticorpo de detecção e enzima estreptavidina) em temperatura ambiente no agitador de microplaca por 3 horas. Após a lavagem da placa, adicionamos $200\ \mu\text{L}$ /poço de solução de substrato (reagentes A e B) e incubamos em temperatura ambiente por 30 minutos. Por fim, adicionamos $50\ \mu\text{L}$ /poço de ácido sulfúrico - H_2SO_4 (2N), e assim, a leitura em densidade óptica foi realizada com o filtro de 450nm, e filtro de correção de 570nm.

3.5.2 Dosagem sérica de VEGF-A

O kit utilizado para a dosagem de VEGF humano foi do fabricante PEPROTech (Catálogo: 900-T10). A placa foi pré-sensibilizada *overnight* em temperatura ambiente com 50µL/poço de anticorpo de captura (anticorpo primário). No dia seguinte, após a lavagem da placa, para evitar reações inespecíficas, a mesma foi bloqueada com 50µL/poço de reagente diluente por 1 hora em temperatura ambiente (25°C). Na sequência, após a segunda lavagem em seus respectivos poços, adicionamos 50µL/poço das amostras de soro (sem diluir), e para a diluição seriada da curva-padrão, 50µL/poço em duplicatas. Tal incubação teve duração de 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada, e então, adicionado 50µL/poço de anticorpo de detecção (anticorpo secundário) por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente a uma nova lavagem, foi adicionado 50µL/poço de enzima estreptavidina-HRP por 30 minutos em temperatura ambiente. E então, após a última lavagem de placa, foram adicionados 50µL/poço de substrato TMB durante 20 minutos em temperatura ambiente. A fim de parar a reação, foi adicionado 50µL/poço de ácido sulfúrico - H₂SO₄ (2N), e assim, a leitura em densidade óptica com o filtro de 450nm, e filtro de correção de 620nm.

3.5.3 Dosagem sérica de TGF-β1

O kit utilizado para a dosagem de TGF-β1 humano foi do fabricante Affymetrix eBioscience (Catálogo: 88-8350). A placa foi pré-sensibilizada *overnight* a 2-8°C com 50µL/poço de anticorpo de captura (anticorpo primário). No dia seguinte, após a lavagem da placa, para evitar reações inespecíficas, a mesma foi bloqueada com 50µL/poço de reagente diluente por 1 hora em temperatura ambiente (25°C). Na sequência, após a segunda lavagem, as amostras de soro (diluídas 10 vezes: 20µL de amostra somado a 180µL de PBS 1X) foram ativadas com 20µL de ácido clorídrico - HCl (1N), e após 10 minutos, neutralizadas com 20µL de hidróxido de sódio - NaOH (1N). Na placa, em seus respectivos poços, foram adicionados 25µL da amostra diluída somado a 25µL de reagente diluente 1X, e para a diluição seriada da curva-padrão, 50µL/poço em duplicatas. Tal incubação teve duração de 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada e adicionado 50µL/poço de

anticorpo de detecção (anticorpo secundário) por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 50µL/poço de enzima estreptavidina-HRP por 30 minutos em temperatura ambiente. E então, após a última lavagem de placa, foram adicionados 50µL/poço de substrato tetrametilbenzidina (TMB) durante 15 minutos em temperatura ambiente. A fim de parar a reação, foi adicionado 50µL/poço de ácido sulfúrico - H₂SO₄ (2N), e assim, a leitura em densidade óptica com o filtro de 450nm, e filtro de correção de 570nm.

3.5.4 Dosagem sérica de Óxido Nítrico

As concentrações de óxido nítrico foram indiretamente avaliadas pela determinação do acúmulo de nitrito no soro dos pacientes e indivíduos saudáveis utilizando o método de reação de Griess. Resumidamente, misturaram-se volumes iguais do soro oriundo dos pacientes (50µL) e o reagente de Griess, diluído a 40 mg/mL (Sigma, código: G4410). Todas as condições experimentais foram quantificadas em duplicata. Posteriormente, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min, ao abrigo da luz para posterior leitura. A absorbância da reação foi mensurada a 540 nm em leitor de microplacas. As concentrações de óxido nítrico foram calculadas pela comparação com a curva padrão realizada com nitrato de sódio nas concentrações de 5µM a 100 µM.

3.5.5 Dosagem sérica do PDGF-BB

Para dosagem de PDGF-BB foi utilizado o kit de ELISA comercial (Peprotech, USA - cat. 900-K04), onde os soros diluídos 1:10 (em solução diluente do kit) foram processados, conforme orientação do fabricante. A leitura de absorbância foi obtida a 405 nm com correção de comprimento de onda ajustada em 605 nm com uma faixa de detecção de 32 a 3.000 pg/mL. Este kit apresenta 100% de reação cruzada com PDGF-AB e 1% com FGFb e PDGF-AA.

3.6 Análise estatística dos dados

A análise descritiva foi realizada com os dados demográficos e clínicos. Para a comparação das médias de idade foi utilizado o teste T e na análise comparativa do gênero, etnia utilizamos, respectivamente, o teste do qui-quadrado e o exato de Fisher. As concentrações dos mediadores inflamatórios foram expressas como mediana. Como os mediadores não apresentaram distribuição normal foram utilizados testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis (todos com o pós-teste) para comparar as concentrações séricas entre os grupos estudados. Para a análise de correlação da PCR e da hemoglobina glicada com os mediadores estudados, bem como entre os mesmos foi usado o teste de Spearman. Todas as análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Característica da população do estudo

Neste estudo, a coleta de dados foi estabelecida a partir do mês de maio de 2016 até o mês de novembro de 2018, obedecendo os critérios de inclusão e exclusão, obtendo-se assim, uma composição de 51 pacientes e 17 controles (Figura 6).

Durante o recrutamento e seleção dos pacientes do estudo foram realizados questionários (APÊNDICES D, E e F), coletados dados laboratoriais e dados da doença vascular, como resultado de *doppler* e/ou arteriografia, assim como o ITB. Além disso, as lesões tróficas foram documentadas e as amostras de sangue periférico foram coletadas para o processamento e armazenamento do soro para as análises no Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Ciências Médicas/UERJ.

Identificamos o perfil sócio demográfico dos 51 pacientes por meio do questionário respondido de forma oral pelo paciente. Considerando os 51 pacientes que responderam o questionário, evidenciou-se um predomínio do sexo masculino com 30 (59%) e 21 (41%) do sexo feminino, apontando uma faixa etária predominante entre 55 e 70 anos de idade e com idade média de $64 \pm 6,9$ anos. Do total de pacientes, 37 declararam-se brancos, 10 negros e 4 pardos (Tabela 1). O grupo controle consistiu em 17 indivíduos funcionários dos hospitais envolvidos na pesquisa, sem comorbidades, não tabagistas, sem sintomas vasculares, com ITB em média de 0,9 e exames laboratoriais dentro da normalidade. Nesse grupo, a média de idade encontrada foi de 53,23 anos com desvio padrão de 10,6. Este grupo era composto de 04 homens e 13 mulheres, 05 brancos, 06 negros e 06 pardos (Tabela 1).

No que concerne ao estado civil dos pacientes, domínio para os casados com 34 (67,7%) pacientes, 14 solteiros ou separados (27,5%) e 3 (5,8%) pacientes viúvos. No que se refere a procedência, 5 (9,8%) relataram procedência de outros estados e 46 (90,2%) relataram procedência do Rio de Janeiro; 31 (60%) relataram moradia na cidade do Rio de Janeiro, enquanto 20 (40%) revelaram uma moradia em outras cidades do estado do Rio de Janeiro (dados não mostrados). A disposição no tocante da escolaridade retratou que 34 (66,7%) iniciaram ao menos o ensino fundamental, 14 (27,5%) o ensino médio e apenas 3 (5,8%) ingressaram no ensino superior (dados não mostrados). Em referência a profissão, 5

(10%) apresentavam emprego formal, 9 (17%) afirmaram trabalhar como autônomos, 8 (16%) se declararam pensionistas e 29 (57%) se declararam aposentados (dados não mostrados).

Constatado como resultado do perfil de comorbidades associadas, o diabetes *mellitus* estava presente em 35 (67%) pacientes, seguido da hipertensão arterial sistêmica (HAS), presente em 34 (66%) pacientes, e do tabagismo em 32 pacientes (62,7%) (Tabela 1).

O ITB variou de 0,5 a 0,8 ($0,65 \pm 0,12$) (Tabela 1).

O início dos sintomas variou de 1 mês a 10 anos antes da entrevista, em sua maioria apresentando dor concomitante à lesão trófica. O tempo de aparecimento de lesão trófica variou de 2 semanas a 1 ano, porém a maioria dos pacientes (29 pacientes) com início da lesão há menos de 1 mês da data da coleta dos dados.

Nos exames laboratoriais destacam-se elevações na PCR e na hemoglobina glicada no grupo DAOP em comparação ao grupo controle ($p=0,0004$ e $p<0,0001$, respectivamente) (Tabela 1). O hematócrito (%) apresentou valores diminuídos no grupo DAOP ($p=0,0003$), hemoglobina (g/dL) não apresentou diferença nos dois grupos ($p=0,7390$), a glicose (mg/dL) encontrava-se com valores superiores no grupo DAOP em comparação ao controle ($p<0,0001$) (Tabela 1).

Os pacientes faziam uso de medicamentos, destacando-se para o uso do ácido acetil-salicílico (AAS) em 17 pacientes com DAOP, sendo 6 com ferida (Fontaine 4); e o uso de cilostazol (inibidor da fosfodiesterase 3) em todos os pacientes sem ferida e de maior evolução da doença, e somente em 3 pacientes com ferida, os com maior evolução da doença.

Em relação à presença de lesões tróficas ou feridas, o acometimento do membro inferior direito (MID) apresentou uma vantagem, se apresentando em 33 pacientes enquanto o membro inferior esquerdo (MIE) estava acometido em 21 pacientes, sendo 3 pacientes com acometimento bilateral. As lesões maiores acometendo dorso de pé com extensão para perna e calcâneo estavam presentes em 9 pacientes, e as menores, acometendo pododáctilos estavam presentes em 35 pacientes. (Figura 7).

Todos os pacientes com ferida desse estudo efetuaram exame de *doppler* arterial e arteriografia do membro inferior afetado (Figura 8), e os pacientes sem ferida realizaram apenas *doppler* arterial. Quanto ao território arterial acometido, 7 pacientes possuíam obstrução em território suprapatelar, 15 em território infrapatelar, 29 em territórios suprapatelar e infrapatelar (Tabela 3).

Tabela 1 - Dados clínicos, demográficos e laboratoriais da população geral de estudo

	DAOP (N = 51)	CONTROLE (N = 17)	Valor de <i>p</i>
IDADE (ANOS)	64,31 ± 6,89	53,24 ± 10,60	0,0003*
GÊNERO	30 (59,0%) M 21 (41,0%) F	04 (23,5%) M 13 (76,5%) F	0,0234 [†]
COR DA PELE	14 (27,5%) NB 37 (72,5%) B	12 (70,6%) NB 05 (29,4%) B	0,0031 [†]
IMC (Kg/m ²)	25,26 ± 2,90	27,00 ± 2,62	0,0637
TABAGISTA	32 (62,7%)	NA	
ETILISTA	12 (23,5%)	NA	
HAS	34 (66%)	NA	
DM	35 (67%)	NA	
ITB	0,65 ± 0,12	0,93 ± 0,04	<0,0001*
HEMATÓCRITO (%)	35,83 ± 5,14	41,37 ± 2,47	0,0003*
HEMOGLOBINA (g/dL)	11,72 ± 1,82	11,66 ± 1,39	0,7390*
GLICOSE (mg/dL)	165,29 ± 91,50	84,89 ± 8,44	<0,0001*
HbA1c (% Hb total)	6,62 ± 1,83	4,84 ± 0,48	0,0004*
PCR (mg/dL)	60,02 ± 72,06	0,87 ± 0,44	<0,0001*

Legenda: N - número de indivíduos; DAOP - pacientes com doença arterial obstrutiva periférica; *p* - valor de significância estatística; F - gênero feminino; M - gênero masculino; NB - não brancos; B - branco; IMC - índice de massa corporal; HAS - Hipertensão arterial; DM - diabetes *mellitus*; ITB - índice tornozelo-braquial; HbA1c - hemoglobina glicada; PCR - proteína C reativa; [†] *Teste de Fisher*; * teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

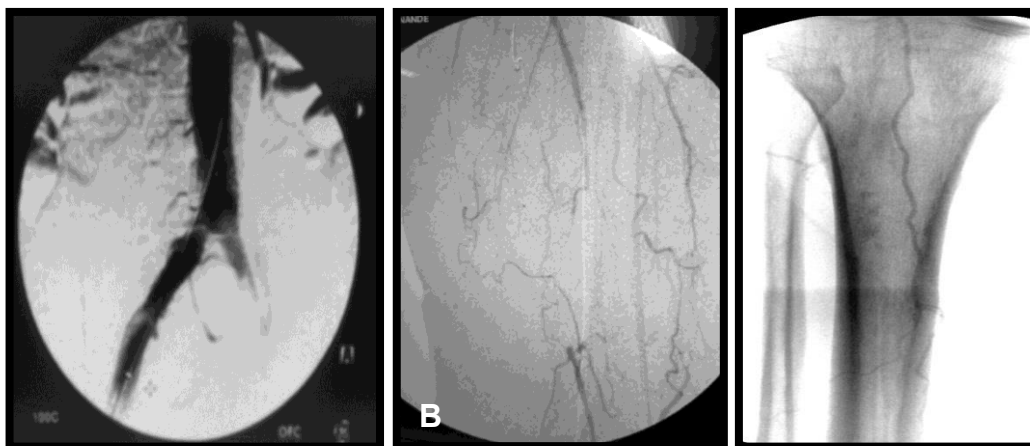
Figura 7 - Imagens macroscópicas das lesões de três pacientes representativos do grupo com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) atendidos no Hospital Municipal Souza Aguiar



Legenda: (A) Isquemia crítica em dorso de pé esquerdo; (B) Necrose em dorso de hálux e de terceiro pododáctilo direitos; (C) Placa de necrose em calcâneo e gangrena de quarto e quinto pododáctilos direitos.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 8 - Imagens representativas de arteriografias de pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) de membros inferiores que apresentaram feridas, mostrando diferentes acometimentos dos segmentos arteriais



Legenda: A, oclusão de artéria íliaca comum esquerda. B, oclusão de artéria femoral superficial em terço médio com reabilitação em terço distal e circulação colateral. C, oclusão troncotibiofibular e estenose de artéria tibial anterior em terço distal.

Fonte: A autora, 2019.

4.2 População amostral do grupo DAOP com ferida (Fontaine 4)

O grupo DAOP com ferida era constituído de 44 pacientes, com média de idade de 64,6 anos, sendo composto por 28 homens e 16 mulheres, 34 brancos, 6 negros, 4 pardos, em sua maioria aposentados, 28 tabagistas, 31 diabéticos e 29 hipertensos. Os pacientes desse grupo apresentaram valor médio de ITB de $0,64 \pm 0,13$ (Tabela 2).

Os pacientes apresentaram DAOP diagnosticada pelo *doppler* arterial e arteriografia. O tempo de evolução da doença variou de 1 mês a 2 anos, a maioria com evolução entre 2 meses e 1 ano (25 pacientes - 57% dos casos) e 2 pacientes com maior tempo de evolução, um com 4 anos e outro com 10 anos de doença. O tempo de aparecimento de lesão trófica variou de 2 semanas a 1 ano, porém a maioria dos pacientes (29 pacientes - 66% dos casos) com início da lesão há menos de 1 mês da data da coleta dos dados. Como já mencionado em relação à localização da ferida, 9 pacientes (20%), e as menores, acometendo pododáctilos estavam presentes em 35 pacientes (80%) (Tabela 3).

Muitos pacientes apresentavam doença em mais de um leito arterial, sendo predominante o acometimento supra e infrapatelar em 28 pacientes (64%), seguido do infrapatelar e supratelar isolados, compostos por 13 pacientes (30%) e 3 pacientes (6%),

respectivamente. Com relação ao membro acometido, 27 pacientes com acometimento do membro inferior direito e 17 com acometimento do membro inferior esquerdo (Tabela 3).

Avaliando o leito arterial, foi visto que 28 possuem doença arterial localizada em AFS (artéria femoral superficial); 31 em ATA (artéria tibial anterior); 31 em ATP (artéria tibial posterior); 29 em artéria fibular; 17 em artéria poplítea, 11 em tronco tibiofibular e 5 em artéria ilíaca externa; 5 em artéria ilíaca interna e 7 em artéria femoral profunda e 4 em artéria femoral e 20 com acometimento do arco plantar que mostrou-se incompleto, como demonstrado na (Figura 9).

4.3 População amostral do grupo DAOP sem ferida (Fontaine 2)

O grupo DAOP sem ferida era constituído de 07 pacientes claudicantes, com média de idade de 62,3 sendo composto por 02 homens e 05 mulheres, 03 brancos e 04 negros, 04 tabagistas, 03 diabéticos, 05 hipertensos. O ITB obtido teve média de $0,74 \pm 0,05$ (Tabela 2). Os pacientes apresentam claudicação com início variando de 5 anos a 6 meses e ocorrendo na caminhada em uma distância média de 300 metros. Os pacientes incluídos nesse grupo não possuíam lesão trófica. Os pacientes apresentaram DAOP diagnosticada pelo *doppler* arterial. Muitos pacientes apresentaram a doença em mais de um leito arterial, sendo predominante o acometimento supratelar em 4, seguido do infrapatelar acometido em 2 pacientes, e do acometimento supra e infrapatelar em 1 paciente. Com relação ao membro acometido, 6 pacientes com acometimento do membro inferior direito e 4 com acometimento do membro inferior esquerdo, pois 3 pacientes apresentavam acometimento bilateral (Tabela 3). Avaliando o leito arterial, 4 possuíam doença arterial localizada em AFS, 2 pacientes em artéria tibial anterior, 1 paciente em artéria femoral, 1 paciente em artéria poplítea, 1 em tronco tibiofibular, 1 em artéria tibial posterior, 1 em artéria fibular e o restante dos leitos arteriais não estavam acometidos nesse grupo, como demonstrado na (Figura 9).

Nos exames laboratoriais destacam-se elevações na PCR (mg/dl) no grupo DAOP com ferida comparado com o grupo DAOP sem ferida e o grupo controle ($p < 0,0001$). O hematócrito (%) apresentou valores diminuídos no grupo DAOP com ferida em relação ao grupo DAOP sem ferida e ao grupo controle ($p = 0,0007$), assim como a hemoglobina (g/dL) ($p = 0,0658$). A glicose (mg/dL) encontrava-se com valores ligeiramente superiores no grupo DAOP com ferida em comparação ao grupo DAOP sem ferida, e com quase o dobro do valor

em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Os valores de hemoglobina glicada no grupo DAOP não mostraram diferença entre os grupos DAOP com ferida e sem ferida, porém mostraram-se aumentados em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados clínicos, demográficos e laboratoriais dos pacientes DAOP com e sem ferida em comparação aos indivíduos sadios

	DAOP COM FERIDA (N = 44)	DAOP SEM FERIDA (N = 07)	CONTROLE (N = 17)	Valor de <i>p</i>
IDADE (ANOS)	66,3 ± 8,2	61,0 ± 4,0	53,24 ± 10,60	<0,0001**
GÊNERO	28 (63,6 %) M 16 (36,4 %) F	02 (28,6 %) M 05 (71,4 %) F	04 (23,5%) M 13 (76,5%) F	0,0095 ⁺
COR DA PELE	10 (22,7%) NB 34 (77,3%) B	04 (54,1%) NB 03 (42,9%) B	12 (70,6%) NB 05 (29,4%) B	0,0014 ⁺
IMC (Kg/m²)	26,3 ± 2,7	24,3 ± 3,7	27,0 ± 2,6	0,1787*
TABAGISTA	28 (63,6%)	04 (57,1%)	NA	
ETILISTA	11 (25,0%)	01 (14,2%)	NA	
HAS	29 (66,0%)	05 (71,4%)	NA	0,8673 ⁺
DM	31 (70,5%)	03 (43%)	NA	
ITB	0,64 ± 0,13	0,74 ± 0,05	0,93 ± 0,04	<0,0001*
HEMATÓCRITO (%)	35,06 ± 4,92	40,30 ± 3,96	41,37 ± 2,47	0,0007*
HEMOGLOBINA (g/dL)	11,49 ± 1,74	13,43 ± 1,57	11,66 ± 1,39	0,0658*
GLICOSE (mg/dL)	166,44 ± 129,70	157,00 ± 132,17	82,50 ± 14,80	<0,0001*
HbA1c (% Hb total)	6,62 ± 1,71	6,62 ± 2,74	4,84 ± 0,48	<0,0001*
PCR (mg/dL)	71,29 ± 73,36	0,44 ± 0,40	0,87 ± 0,44	<0,0001*

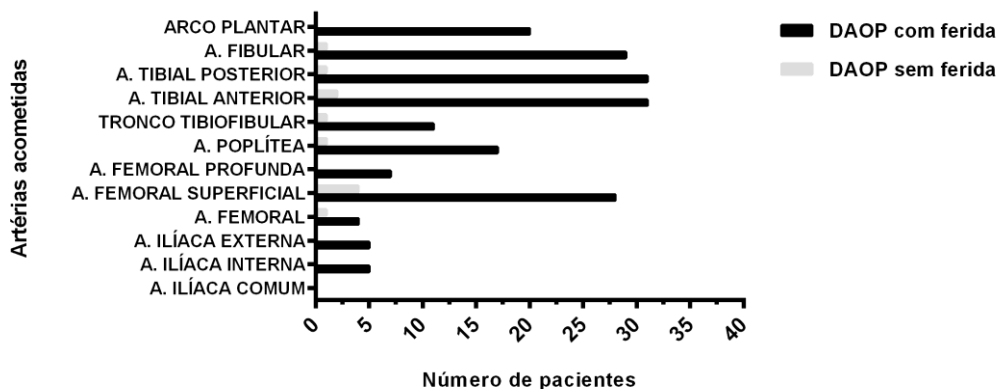
Legenda: N - número de indivíduos; DAOP - pacientes com doença arterial obstrutiva periférica; *p* - valor de significância estatística; F - gênero feminino; M - gênero masculino; NB - não brancos; B - branco; IMC - índice de massa corporal; HAS - Hipertensão arterial; DM - Diabetes mellitus; ITB - índice tornozelo-braquial; HbA1c - hemoglobina glicada; PCR - proteína C reativa; * teste não paramétrico Kruskal-Wallis; **teste ANOVA; ⁺ teste do qui-quadrado.

Tabela 3 - Dados clínicos dos pacientes DAOP com e sem ferida

	DAOP COM FERIDA (N = 44)	DAOP SEM FERIDA (N = 07)	Valor de <i>p</i>
TEMPO DE EVOLUÇÃO			
≤ 1 mês	09 (20,0%)	00 (0,0%)	0,0272 ⁺
2 meses - 1 ano	25 (57,0%)	02 (29,0%)	
> 1 ano	10 (23,0%)	05 (71,0%)	
TEMPO DE FERIDA			
< 1 mês	29 (66,0%)	NA	
2 meses a 1 ano	15 (34,0%)	NA	
TAMANHO DA FERIDA			
Maior	09 (20,0%)	NA	
Menor	35 (80,0%)	NA	
TERRITÓRIO ARTERIAL ACOMETIDO			
Suprapatelar	03 (6,0%)	04 (57,1%)	0,001 ⁺
Infrapatelar	13 (30,0%)	02 (28,6%)	
Supra e Infrapatelar	28 (64,0%)	01 (14,3%)	

Legenda: N - número de indivíduos; DAOP - pacientes com doença arterial obstrutiva periférica. ⁺ teste do Chi-quadrado.

Figura 9 - Acometimentos dos segmentos arteriais em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) de membros inferiores que apresentavam ou não ferida



Legenda: A - artéria.

Fonte: A autora, 2019.

4.4 Avaliação dos níveis séricos dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em indivíduos DAOP versus indivíduos saudáveis

Do total de 68 amostras coletadas para esse estudo realizamos a dosagem dos marcadores inflamatórios e detivemos o resultado apresentado na figura 10. Os resultados

foram apresentados como mediana. Observamos que os pacientes do grupo DAOP apresentaram níveis séricos de ET-1, nitrito, VEGF-A maiores significativamente quando comparados com o grupo controle ($p < 0,0001$, $p < 0,0148$, $p < 0,0004$, respectivamente) (Figura 10 A, B e D). No entanto, os níveis séricos de PDGF-BB e TGF- β 1 se apresentaram menores significativamente nos pacientes DAOP comparados com o grupo controle ($p < 0,0137$ e $p < 0,0001$, respectivamente) (Figura 10 C e E).

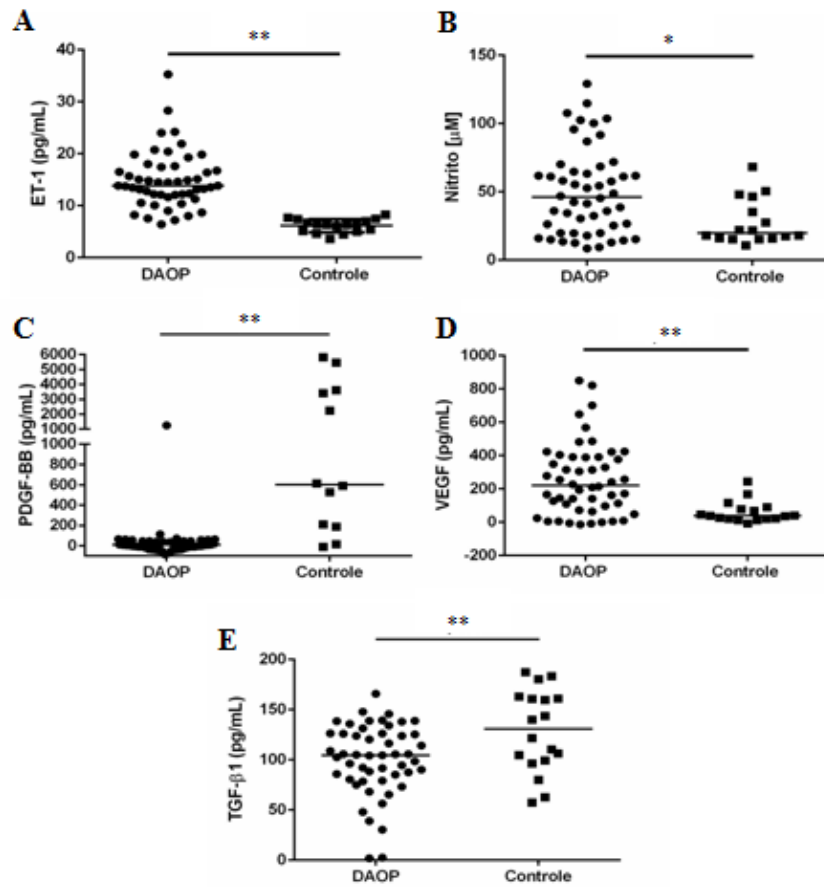
4.5 Avaliação dos níveis séricos dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes DAOP com ferida, pacientes DAOP sem ferida e indivíduos saudáveis

A detecção dos mesmos mediadores e fatores de crescimento foi avaliada comparando os pacientes dos grupos DAOP com e sem ferida e os controles (Figura 11). Com relação à dosagem de ET-1, o grupo DAOP com ferida apresentou valores aumentados em comparação ao grupo controle ($p = 0,0001$), assim como o grupo DAOP sem ferida comparado ao grupo controle ($p = 0,00001$). Entretanto, ao compararmos os grupos DAOP com ferida e sem ferida não foi encontrada diferença estatística significativa (Figura 11A). No entanto, os níveis de nitrito não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos DAOP com e sem ferida e entre eles e o grupo controle (Figura 11B).

Com relação ao PDGF-BB, o grupo DAOP com ferida apresentou valores diminuídos em comparação ao controle ($p < 0,0001$). Ao compararmos os grupos DAOP sem ferida com o grupo controle não foi visto diferença estatística significativa ($p = 0,8567$). Observamos valores diminuídos no grupo DAOP com ferida comparado com grupo DAOP sem ferida ($p = 0,0460$) (Figura 11C). Com relação ao VEGF-A, o grupo DAOP com ferida apresentou valores aumentados em comparação ao controle ($p = 0,001$). Já o grupo DAOP sem ferida comparado ao grupo controle não mostrou diferença estatística significativa. Ao compararmos os grupos DAOP com ferida e sem ferida, foram encontrados valores aumentados significativos no primeiro ($p = 0,001$) (Figura 11 D).

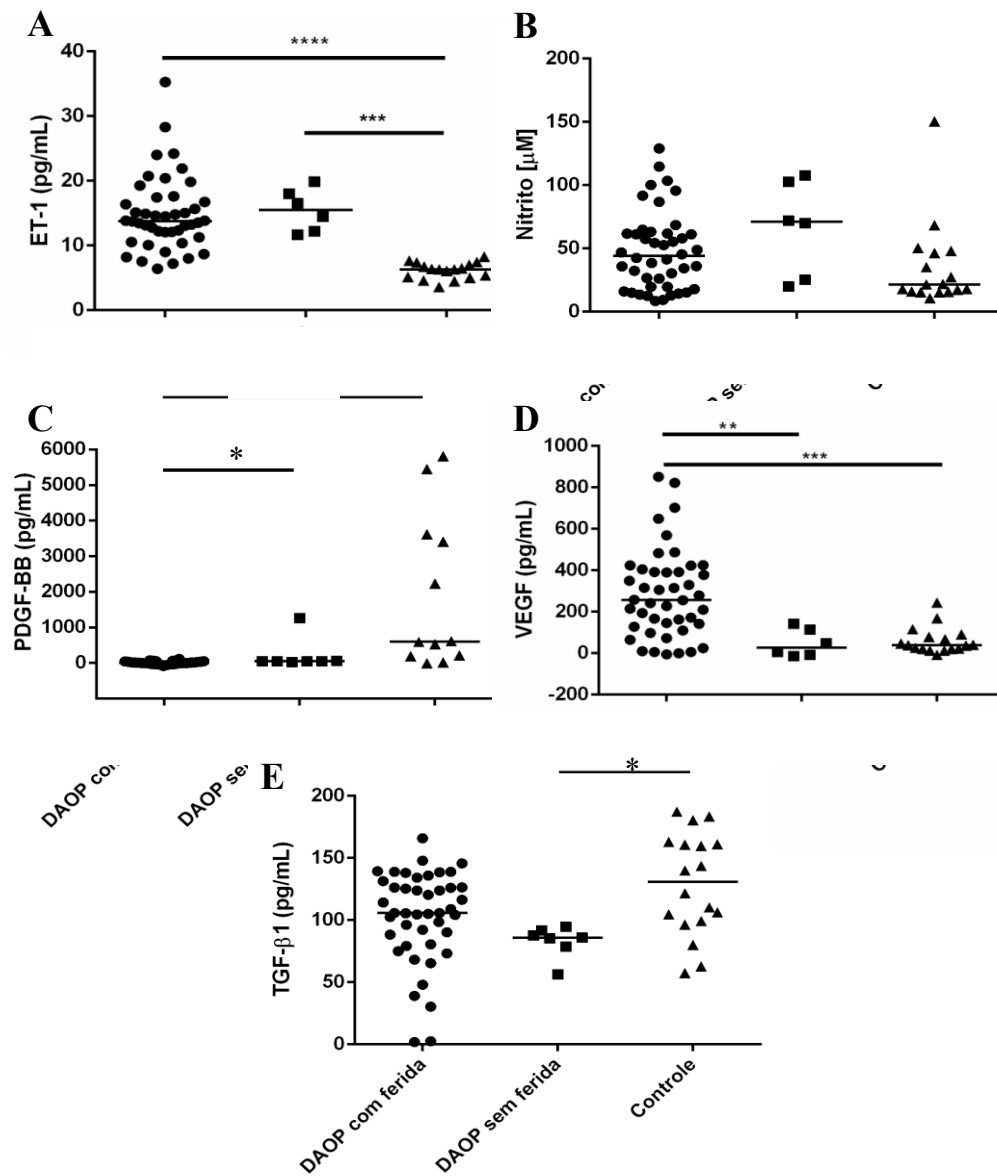
Com relação aos níveis séricos de TGF- β 1, o grupo DAOP com ferida não apresentou diferença estatística em comparação ao controle ($p = 0,1410$). Porém, ao compararmos o grupo DAOP sem ferida com o grupo controle, foram vistos valores diminuídos ($p = 0,0053$). Ao comparar os grupos DAOP com ferida e sem ferida, foram vistos níveis reduzidos nos dois grupos porém sem diferença estatística significativa (Figura 11E).

Figura 10 - Detecção de níveis séricos de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica



Legenda: Níveis de ET-1 (pg/mL) (A), Nitrito (μ M) (B), PDGF-BB (pg/mL) (C), VEGF-A (pg/mL) (D) e TGF- β 1 (pg/mL) (E) em amostras de soro de pacientes DAOP (doença arterial obstrutiva periférica) e indivíduos sadios (controle) dosados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados são representados pela mediana. O teste não paramétrico para amostras Mann-Whitney com correção de Welch foi realizado para a análise estatística, em que (*) significa $p < 0,0001$ e (***) $p < 0,05$.

Figura 11 - Detecção de níveis séricos de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica com e sem ferida



Legenda: Níveis de ET-1 (pg/mL) (A), Nitrito (μ M) (B), PDGF-BB (pg/mL) (C), VEGF-A (pg/mL) (D) e TGF- β 1 (pg/mL) (E) em amostras de soro de pacientes DAOP (doença arterial obstrutiva periférica) com e sem ferida, e indivíduos sadios (controle) dosados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados são representados pela mediana. O teste não paramétrico para amostras Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn foi realizado para a análise estatística, em que (*) significa $p < 0,05$, (**) $p < 0,001$ e (***) $p < 0,0001$.

4.6 Correlação dos níveis séricos dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes DAOP com os valores da PCR e hemoglobina glicada

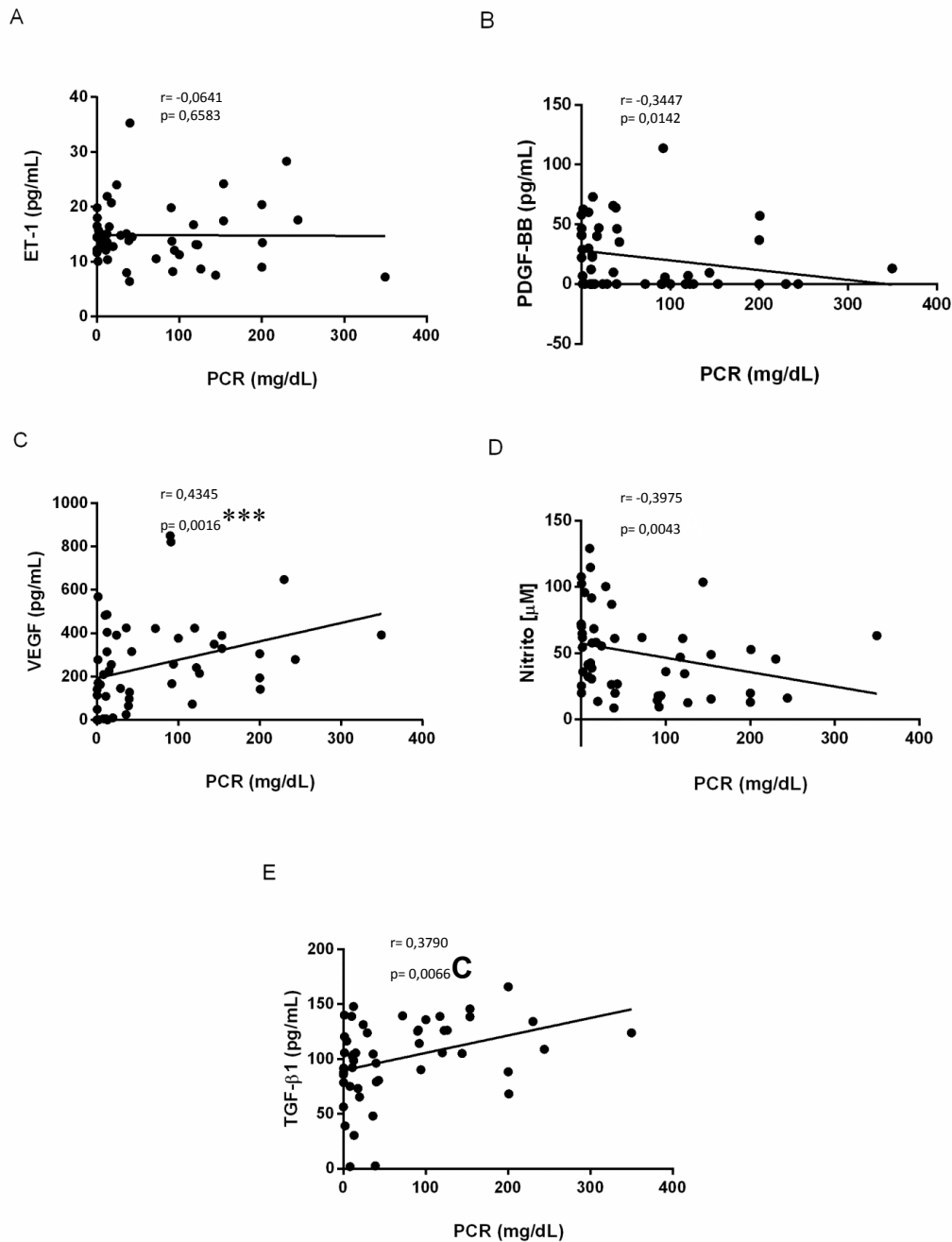
Sabemos que a PCR elevada é um fator de risco independente para o desenvolvimento e a severidade da DAOP, e exerce um papel importante na inflamação. A PCR é um marcador sistêmico de inflamação, e altas concentrações têm sido associadas ao potencial desenvolvimento de eventos aterotrombóticos tanto em pacientes com doença cardiovascular conhecida quanto em indivíduos aparentemente saudáveis (RIDKER et al., 1998; PEPYS; HIRSCHFELD, 2003; VU et al., 2005). De forma igualmente importante, o impacto do diabetes *mellitus* como comorbidade em pacientes com DAOP é significativa. Não apenas a presença do diabetes como um fator de risco têm sido demonstrada, mas também o pobre controle glicêmico associado aos piores desfechos na DAOP, como o insucesso da revascularização e amputações de membros (MALMSTEDT et al., 2008; MALONE et al., 2014; ARYA et al., 2018).

Desta forma, realizamos a correlação dos níveis séricos de ET-1, nitrito, PDGF-BB, VEGF-A e TGF- β 1 com os níveis séricos da proteína C reativa (PCR), bem como da hemoglobina glicada nos pacientes com DAOP (Figuras 12 e 13). Observamos que os indivíduos DAOP apresentaram uma correlação positiva e significativa entre os níveis da PCR com o VEGF-A ($r=0,4345$, $p=0,0016$) e da PCR com o TGF- β 1 ($r=0,3790$, $p=0,0066$) (Figura 12C e E), ou seja, quanto maior o nível sérico de PCR, maiores são os níveis de VEGF-A e TGF- β 1. No entanto, observou-se uma correlação negativa sem significância estatística da PCR com ET-1 ($r= -0,0641$, $p=0,6583$) (Figura 12A); uma correlação negativa significativa da PCR com PDGF-BB ($r= -0,3447$, $p=0,0142$) e com o nitrito ($r= -0,3975$, $p=0,0043$) (Figura 12 B e D).

No que diz respeito à correlação dos níveis de hemoglobina glicada e os níveis de nitrito e TGF- β 1 verificamos que a mesma foi positiva e significativa ($r= 0,3130$ e $p= 0,0303$; $r= 0,3157$ e $p= 0,0289$, respectivamente) (Figura 13D e E). Ao contrário, os dados mostraram uma correlação negativa não significativa entre os níveis de hemoglobina glicada e o PDGF-BB ($r= -0,2017$ e $p= 0,1693$) (Figura 13B). Os níveis de hemoglobina glicada se correlacionaram de forma positiva, mas não significativa com os níveis de ET-1 e VEGF-A ($r= 0,1339$ e $p= 0,3642$; $r= 0,2073$ e $p= 0,1575$, respectivamente) (Figura 13A e C).

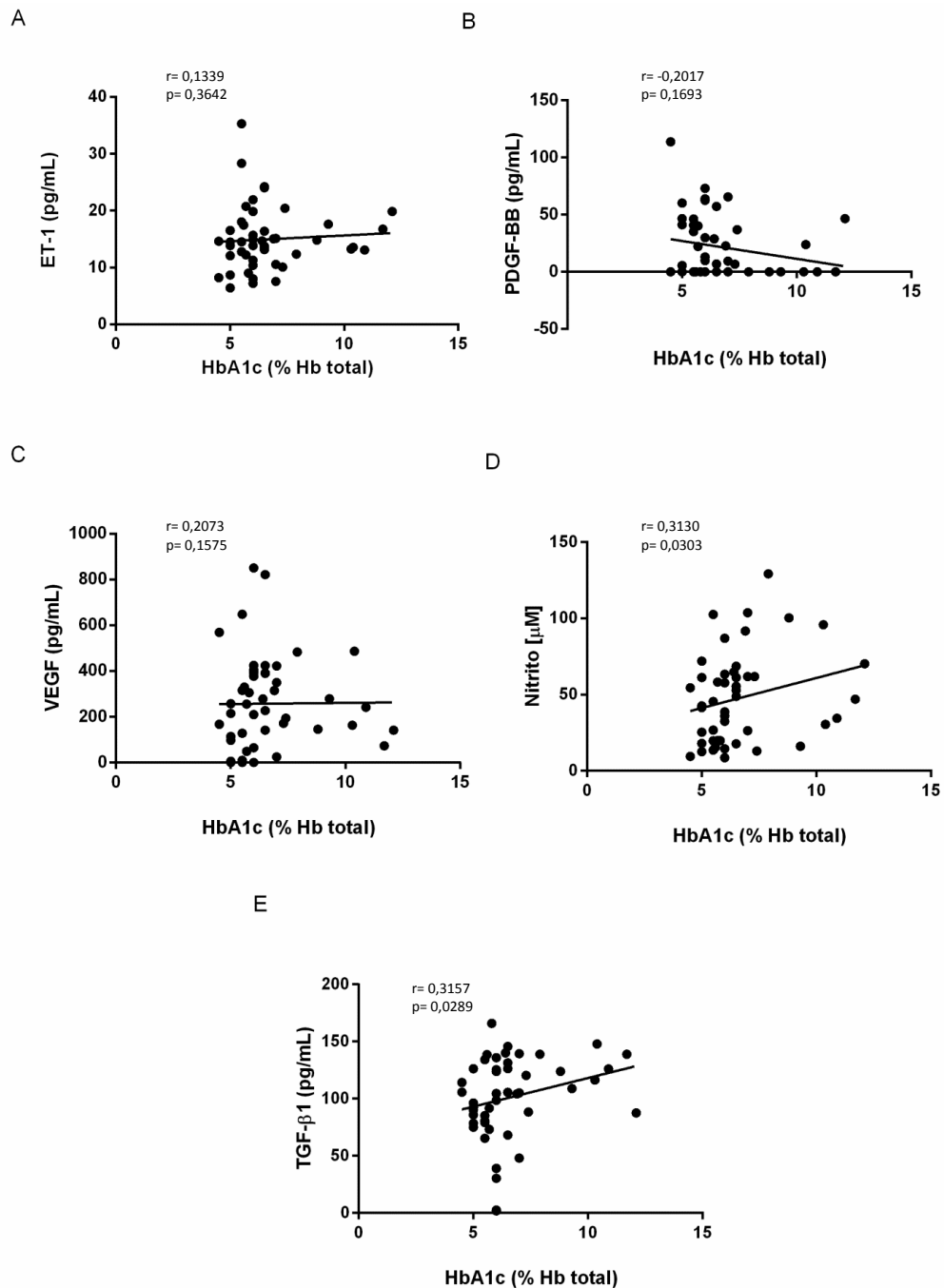
Não observamos correlação entre os níveis de ET-1 e nitrito com os demais mediadores e fatores de crescimento estudados neste trabalho (dados não mostrados). No entanto, verificamos uma correlação negativa significativa entre os valores de VEGF-A e os níveis de PDGF-BB ($r = -0,5693$, $p < 0,0001$), enquanto os valores séricos de VEGF-A se relacionaram positivamente e de maneira significativa com os níveis de TGF- β 1 ($r = 0,6438$ e $p < 0,0001$) (dados não mostrados). Os níveis de PDGF-BB se correlacionaram negativa e significativamente com os valores de TGF- β 1 ($r = -0,7372$ e $p < 0,0001$) (dados não mostrados).

Figura 12 - Correlação dos níveis séricos de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento e da Proteína C Reativa em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica



Legenda: Correlação dos níveis séricos de ET-1 (pg/mL) (A), PDGF-BB (pg/mL) (B), VEGF-A (pg/mL) (C), Nitrito (μ M) (D) e TGF- β 1 (pg/mL) (E) e da proteína C reativa (PCR – mg/dL) em pacientes DAOP (doença arterial obstrutiva periférica). Dados pareados de 50 pacientes do grupo DAOP, sendo cada ponto representando um paciente. Os coeficientes de relação são mostrados nas retas (valores de r), assim como o nível de significância (valores de p). A análise estatística foi feita pelo método de correlação não paramétrico Spearman.

Figura 13 - Correlação dos níveis séricos de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento e da hemoglobina glicada em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica



Legenda: Correlação dos níveis séricos de ET-1 (pg/mL) (A), PDGF-BB (pg/mL) (B), VEGF-A (pg/mL) (C), Nitrito (μ M) (D) e TGF- β 1 (pg/mL) (E) e da hemoglobina glicada (HbA1c – % Hb total) em pacientes DAOP (doença arterial obstrutiva periférica). Dados pareados de 48 pacientes do grupo DAOP, sendo cada ponto representando um paciente. Os coeficientes de relação são mostrados nas retas (valores de r), assim como o nível de significância (valores de p). A análise estatística foi feita pelo método de correlação não paramétrico Spearman.

5 DISCUSSÃO

A existência de DAOP é tida como um marcador de doença vascular sistêmica e de riscos cardiovascular e cerebral. Pacientes com sintomas apresentam em 25% dos casos morte por causa vascular em 12 meses de apresentação da doença. Em 1 ano a mortalidade dos pacientes com DAOP crônica severa sobe para mais de 45%. Um pouco mais da metade dos casos de DAOP são assintomáticos e não há programas de *screening* na maioria dos países (WATSON; WATSON; PATER, 2006; HIATT et al., 2012; CONTE; VALE, 2018), o que torna a DAOP um importante fator de risco para a amputação de membros inferiores. Por conseguinte, o diagnóstico, o tratamento da isquemia e o acompanhamento desses pacientes devem ser agressivos e considerados uma urgência para o salvamento do membro inferior, pelo impacto socioeconômico trazido pela doença e suas complicações (BROWNRIGG et al., 2015; FORESYTHE et al., 2015; LIPSKY et al., 2016). Muitas são as quimiocinas que fazem parte do cenário do desenvolvimento da aterosclerose, e, portanto têm sido alvo de estudos em diversas doenças vasculares em busca de diagnóstico e tratamento. Como já visto em alguns trabalhos, algumas já têm sido relacionadas à oclusão arterial obstrutiva por aterosclerose (TZOULAKI et al., 2005; MURABITO et al., 2008).

Diante deste cenário, o presente estudo buscou avaliar os níveis de mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em pacientes internados no Serviço de Cirurgia Vascular do Hospital Municipal Souza Aguiar, considerado uma das maiores emergências da América Latina, situado no bairro do Centro, no Rio de Janeiro, onde os pacientes chegam com doença em estágio avançado (Fontaine 3 e 4), vindos de toda parte do estado do Rio de Janeiro, e já tendo sido atendidos em outros hospitais. Foram recrutados também pacientes atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vascular do Hospital do Andaraí, situado no bairro do Andaraí, no Rio de Janeiro, onde podemos encontrar pacientes em todos os estágios, inclusive os iniciais (Fontaine 2), já que muitos pacientes chegam pelo sistema de regulação de vagas vindos dos Postos de Saúde e/ou Clínicas da Família.

Para alcançar nosso objetivo, o propósito inicial do estudo era a comparação do mesmo número de pacientes DAOP claudicantes (Fontaine 1 e 2) com pacientes DAOP com ferida (Fontaine 4), porém o número de pacientes do primeiro grupo não foi satisfatório. O recrutamento de pacientes portadores de claudicação intermitente enfrentou inicialmente alguns obstáculos relacionados à aprovação pelo centro de estudos do Hospital do Andaraí, local onde o ambulatório possui um perfil com maior concentração de pacientes nessa fase da

doença; e o número de pacientes com claudicação que chega ao Hospital Municipal Souza Aguiar é muito menor, sendo encaminhados quando chegam à emergência para ambulatórios de outros hospitais, e, portanto o recrutamento se torna inviável por não haver participação dos médicos plantonistas da emergência no projeto.

No entanto, de uma forma geral, o número de pacientes com claudicação que chega ao SUS, seja na emergência ou nos ambulatórios, é baixo, já que a assistência primária é deficitária, muitos postos de saúde estão fechados, além de faltarem médicos em muitas Clínicas da Família, portanto, os pacientes são admitidos no hospital em estágios de doença avançados para o atendimento especializado de cirurgia vascular. Além disso, muitas vezes a DAOP é subdiagnosticada por seus sintomas serem confundidos com os de outras doenças, como por exemplo, ortopédicas e neurológicas que causam dor em membros inferiores, e por não haver a consulta do especialista na rede básica, nem um programa de rastreio da mesma, a doença não é tratada adequadamente. Aliado a tudo isso, encontra-se o fato da faixa etária mais acometida ser de idosos, que caminham menos e, portanto, abrem o quadro já com lesão na maioria das vezes.

Ainda com relação ao número amostral, por muitos pacientes serem provenientes de outros hospitais, um grande quantitativo de pacientes já tinha sido submetido a algum tratamento cirúrgico e este era um dos critérios de exclusão do estudo. Mediante ao exposto optamos por analisar um grupo geral de pacientes com DAOP com diferentes manifestações clínicas da doença comparando com um grupo de indivíduos saudáveis.

A distribuição encontrada em nosso estudo de perfil sócio-demográfico caracterizou uma predominância do gênero masculino (59%), com faixa etária predominante entre 50 e 70 anos, confirmando o encontrado por Hiatt, Hoag e Hamman (1995), Cooke e Wilson (2010) e Criqui et al. (2015). No tocante ao grupo de indivíduos saudáveis, a média de idade foi de 53.24 ± 10.60 , uma faixa etária abaixo da encontrada no grupo com DAOP, isso está relacionado à dificuldade de encontrar indivíduos saudáveis e sem comorbidades numa faixa etária mais avançada. A maioria de pacientes do estudo composta por aposentados e com relação ao estado civil a maioria era casada, com baixo nível de escolaridade e residentes da cidade do Rio de Janeiro. Noyes et al. (2018) e Criqui et al. (2015) obtiveram resultados semelhantes em seu estudo confirmando a maioria dos trabalhos, os quais indicam que as variáveis sociodemográficas exercem um papel significativo tanto na prevalência quanto como na evolução da DAOP, demonstrando que o nível socioeconômico baixo, nível de escolaridade débil e o fato de não possuir familiares presentes, apresentam maiores chances

de complicações clínicas e maior chance de evoluírem para amputações de membros inferiores.

Nosso estudo aferiu o perfil clínico abordando as principais comorbidades encontradas nos pacientes com DAOP observando a condição crônica e multissistêmica da doença. A DM como fator de risco para DAOP estava presente em 67% dos pacientes. É de conhecimento que a DM expressa uma razão de ameaça importante para composição e progressão da DAOP. Mesmo assim a HAS (66%) mostrou-se semelhante no estudo e a frequência do tabagismo foi de 62,7%. Esses resultados são compatíveis com os descritos por Becker et al. (2011). O tabagismo e o diabetes *mellitus* são fortes preditores de morbi-mortalidade. O diabetes está associado à aterosclerose acelerada e tem-se mostrado relacionado ao aumento dos casos de amputação (LEIBSON et al., 2004; LU; MACKAY; PELL, 2014).

De acordo com Hinchliffe et al. (2016), a DAOP apresenta uma predileção no segmento infra inguinal afetando os pacientes diabéticos com uma incidência 5 vezes maior que em paciente não diabéticos, acometendo 50% dos pacientes com DM e progredindo para uma isquemia crítica em 20% dos casos. Nos pacientes com DAOP, por outros fatores de risco, como por exemplo, tabagismo e hipertensão estão mais intimamente ligados a lesões obstrutivas nos vasos aorto-ilíaco-femorais (MASCARENHAS et al., 2014). Geralmente as oclusões nos diabéticos são multissegmentares com alterações difusas da parede vascular, enquanto nos não diabéticos as oclusões são mais segmentares com árvore arterial adjacente livre (HOOI et al., 2001; TSAI et al., 2009). No nosso estudo, essa predileção também foi observada, já que um total de 43 pacientes apresentaram acometimento infrapatelar, onde 15 possuíam segmento infrapatelar acometido exclusivamente. Além disso, 31 dos 35 pacientes DM tinham acometimento infrapatelar, e 31 dos 41 pacientes com acometimento infrapatelar eram DM, como já relatado por Mascarenhas et al. (2014).

Muitos trabalhos avaliam a ET-1 na doença coronariana, carotídea, insuficiência cardíaca e insuficiência renal, mostrando níveis elevados relacionados a essas morbidades (YANG et al., 2012; WANG et al., 2018; JANKOWICH; CHOUDHARY, 2019). Além disso, a pesquisa desse mediador mostra-se muito direcionada nos casos de hipertensão da artéria pulmonar, onde os inibidores dos receptores de ET-1 (exemplo, Bosentan) já são utilizados no tratamento (BARTON; YANAGISAWA, 2008; HIRASHIKI et al., 2016; GU et al., 2018). Estudos com antagonistas dos receptores de endotelina reforçam a ideia de que a ET-1 possa participar em modelos experimentais de hipertensão (CARDILLO et al., 1999). O potente efeito mitogênico da ET-1 pode contribuir para a hipertrofia das células musculares lisas associada à hipertensão, amplificando as respostas vasoconstrictoras. Essa capacidade da ET-

1 promover proliferação celular pode contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose. Lesões ateroscleróticas apresentam elevada expressão de ET-1 e pacientes com aterosclerose e os mesmos possuem níveis de endotelina elevados, atingindo maiores concentrações nos pacientes com maior número de vasos afetados (KELLY; WHITWORTH, 1999). Da mesma maneira, estudos como o de De Haro et al. (2012) avaliaram o uso dos inibidores dos receptores de ET-1 em pacientes com tromboangeíte obliterante, uma vasculite que acomete artérias de membros inferiores, com estreitamento das mesmas.

Alterações da ET-1 na DAOP de membros inferiores também já foram evidenciadas, a maioria dos trabalhos identifica níveis elevados de endotelina-1 em estágios avançados da doença com lesão trófica e correlacionam seus níveis com resposta ao tratamento (DE HARO; FLO; CASARIEGO, 2010; CHEN et al., 2019). O nosso estudo foi capaz de nos fornecer informações quanto aos níveis de ET-1 nos pacientes com DAOP comparados com indivíduos saudáveis, e verificamos seus níveis aumentados nos pacientes DAOP com e sem ferida. Isso corrobora com as alterações nos níveis de ET-1 na DAOP de membros inferiores evidenciadas por De Haro, Flo e Casariego (2010).

Um pequeno número de estudos observou diferenças nas concentrações de ET-1 em diferentes estágios da DAOP, constatando níveis mais elevados nos estágios iniciais da doença (claudicação intermitente), reafirmando a participação da endotelina na patogênese (DE HARO; FLO; CASARIEGO, 2010; De HARO et al., 2016). Além disso, suas concentrações parecem se correlacionar à hiperplasia intimal e reestenose pós-revascularização com técnica endovascular ou cirurgia de *bypass* em doença coronariana, além de lesões valvares (HUCKLE et al., 2001; TSUI; DASHWOOD, 2005; JEREMYA et al., 2011; TSUI; SHI-WEN, 2011; LEÃO et al., 2015; CHEN et al., 2019). Sugere-se, portanto, que o sistema endotelina esteja envolvido no processo de isquemia-reperfusão que ocorre na revascularização de forma geral, uma vez que os níveis de ET-1 encontram-se aumentados durante a reperfusão, contribuindo para a lesão isquêmica (FANTINI; CONTE, 1995; CASEY et al., 2010; RICHARD, 2014). Adicionalmente, alguns estudos mostraram um aumento de ET-1 e de seus receptores em enxertos venosos, sugerindo, portanto, que a ET-1 teria também uma participação na falência do enxerto (KINBONGARD et al., 2013). Outros estudos correlacionam as altas concentrações de ET-1 com o número de lesões ateroscleróticas (KELLY; WHITWORTH, 1999; BARTON; YANAGISAWA, 2008). A maioria dos trabalhos identifica níveis elevados de endotelina-1 em estágios avançados da doença com lesão trófica, alguns correlacionam esses níveis com a revascularização e reestenose após procedimentos cirúrgicos (CHEN et al., 2019; JEREMYA et al., 2011).

Poucos estudos avaliaram diferenças nas concentrações de ET-1 em diferentes estágios da DAOP. De Haro et al. (2016) constatou níveis mais elevados nos estágios iniciais da doença (claudicação intermitente), reafirmando a participação da endotelina na patogênese. Mais estudos devem ser direcionados à avaliação da ET-1 relacionada com as diferentes fases da doença para o melhor emprego de seus inibidores, além de estudos avaliando a resposta ao uso desses inibidores na DAOP.

Mediante os resultados obtidos vimos que os pacientes com ferida apresentaram altos níveis de VEGF-A no soro comparado aos indivíduos saudáveis. Comportamento similar foi descrito por Findley et al. (2008) e Stehr et al. (2010), cujos estudos avaliaram VEGF em casos de DAOP avançada. Além disso, em pacientes Fontaine 4 têm mostrado o dobro do valor do que encontrado em indivíduos saudáveis (KRISHNA; MOXON; GOLLEDGE, 2015). Altos níveis circulantes de VEGF têm sido associados aos quadros clínicos piores, como a amputação maior, sugerindo que o VEGF sérico é um potencial marcador de severidade da DAOP (STEHR et al., 2010; JALKANEN et al., 2018). Krishna, Moxon e Golledge (2015) com o trabalho voltado para a angiogênese, relatou ser provável que a associação de altas concentrações de VEGF com resultados ruins reflita a causalidade reversa como uma resposta à gravidade da isquemia em vez de uma causa, e portanto sugere estudos com administração de VEGF como terapia angiogênica na DAOP. Os efeitos do VEGF na angiogênese na DAOP têm sido abordados em pacientes com claudicação intermitente ou isquemia crítica do membro, porém os estudos nessa área ainda são escassos e não conclusivos (OUMA et al., 2012; KRISHNA; MOXON, GOLLEDGE, 2015; INAMPUDI et al., 2018).

Em nossos resultados, o TGF- β 1 apresentou níveis diminuídos nos pacientes com DAOP corroborando com o que é descrito em alguns estudos anteriores (NIKOL et al., 1992; KRISHNA; MOXON, GOLLEDGE, 2015). Tais resultados reforçam seu papel protetor da placa, como é descrito em alguns trabalhos que sugerem uma relação negativa entre seus níveis plasmáticos e a presença de doenças vasculares, seja no território coronariano, seja em território arterial periférico, como nos pacientes com DAOP (DiCHIARA et al., 2002; MCDERMOTT et al., 2005; COOKE; WILSON, 2010; SIGNORELLI et al., 2012). Inicialmente esperávamos encontrar diferença significativa nos níveis séricos de TGF- β 1 ao comparamos pacientes DAOP com ferida e os indivíduos saudáveis, por se tratar de um fator importante no controle de inflamação e estabilidade da placa. Porém, diferente do esperado, os níveis nos pacientes com ferida não apresentaram diferença estatística significativa, enquanto que os pacientes sem ferida apresentaram. Questionamos então se o motivo para tal

fato não esteja relacionado ao tempo de evolução da doença, ao uso de medicamentos, ao fato da maior parte dos estudos ser voltado para território coronariano e se pode haver diferença na expressão do marcador em leitos arteriais distintos, como ocorre na ET-1. Esbarramos também na questão da dosagem não ter sido feita na ferida, não sabemos se os níveis locais de TGF- β 1 se apresentariam diferentes, pois encontramos poucos estudos em DAOP com ferida, e alguns referem-se à miopatia ocasionada no DAOP (DUY et al., 2016).

Em condições fisiológicas, o NO endotelial causa relaxamento do músculo liso, inibição da agregação plaquetária e regulação da resposta imune. A biodisponibilidade do NO derivado do endotélio está associada à integridade funcional do endotélio e depende do balanço entre sua formação e sua remoção, e isto, por sua vez, está ligado à reação do NO com as ROS. Como ele é um importante componente do sistema que regula a resistência vascular e o fluxo sanguíneo, entende-se que a DAOP esteja associada com uma baixa produção de NO. Alguns trabalhos mostraram que os níveis de NO encontram-se diminuídos em pacientes com DAOP (LOFFREDO et al., 2006; WEISS et al., 2013). Por outro lado, grandes quantidades de NO derivadas de células inflamatórias são perigosas e conhecidas por causar estresse nitrosativo sob condições patológicas.

Miralles et al. (2009) e Akkoca et al. (2017) relataram aumento do nível de nitrito no sangue e sua correlação negativa com a dilatação mediada por fluxo da artéria braquial nos pacientes com DAOP. Estas descobertas corroboram com a teoria de que o NO derivado da eNOS pode proteger a parede vascular da aterosclerose, enquanto o NO derivado da iNOS pode promover a formação de lesões ateroscleróticas. Uma vez liberado no lúmen do vaso, o NO derivado do endotélio é oxidado e participa de reações de nitrosilação. A atividade do NO é o resultado do equilíbrio entre sua produção pela NOS e sua inativação pelos radicais livres de oxigênio (ANDERSON, 2003; BARBATO; TZENG, 2004; MIYOSHI et al., 2006). No nosso estudo verificaram-se valores elevados de nitrito, um dos produtos do NO, nos pacientes DAOP em comparação com indivíduos saudáveis, porém sem diferença significativa, diferentemente do que mostrou o estudo de Miralles et al. (2009), onde os níveis de nitrito foram significativamente mais elevados nos grupos de pacientes com DAOP em relação ao grupo controle de indivíduos saudáveis. Nesse mesmo estudo assim como no nosso não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de nitrito entre os grupos DAOP.

Paralelamente, destacamos alguns trabalhos que relacionam os níveis de NO ao uso de medicamentos cronicamente, pois o NO além de ser liberado de forma basal, tem também sua liberação em resposta à estímulos farmacológicos, mecânicos e químicos, segundo Hellsten et

al. (2012). Vários medicamentos usados no manejo do diabetes têm efeitos benéficos sobre a vasculatura através do NO. Segundo Barbatto e Tzeng (2004), em estudos em camundongos, essas drogas aumentam a disponibilidade de NO, diminuindo a atividade da NADPH oxidase, diminuindo assim a produção de superóxido e reduzindo o efeito de resfriamento no NO. Apesar de seus efeitos pró-proliferativos nas células musculares lisas, a insulina também pode exercer efeitos antiinflamatórios, em parte através da regulação negativa mediada pelo NO da expressão da molécula de adesão intracelular-1 nas células endoteliais. Além disso, a insulina ativa a via da fosfatidilinositol-3-quinase para estimular a síntese de NO pela eNOS. A angiotensina II pode aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio e se opor à ação local do NO. Os inibidores da enzima conversora de angiotensina podem ser vasoprotetores, diminuindo a produção de superóxido, aumentando a disponibilidade de NO e diminuindo a concentração de ADMA, cujo aumento do nível plasmático também estava ligada à disfunção endotelial em pacientes com DAOP (JORAS; POREDOS; FRAS, 2006; BREVETTI et al., 2010). Nossos pacientes faziam uso desses tipos de medicamentos e questionamos portanto, se o seu uso irregular poderia ter influenciado nos nossos resultados. Aliado à isso, tanto na obtenção dos valores de NO quanto aos valores dos demais mediadores analisados, a natureza transversal de nosso estudo não nos permite estabelecer a relação de causa e efeito desse processo.

Nosso estudo evidenciou níveis de PDGF-BB diminuídos no soro dos pacientes portadores de DAOP comparados aos indivíduos saudáveis, e níveis mais baixos do marcador nos pacientes com ferida quando comparados aos sem ferida, resultado semelhante foi visto no estudo de Jalkanen et al. (2018) em que os níveis de PDGF declinavam nos graus avançados de isquemia, e o mesmo autor já havia relatado resultado semelhante num estudo de 2016 (JALKANEN et al., 2016). Segundo Jalkanen et al. (2018), no tocante à idade dos pacientes o PDGF tem uma relação inversa diminuindo com o aumento da idade, o que pode justificar no nosso estudo seus níveis mais baixos no grupo DAOP comparado aos indivíduos controle que têm uma faixa etária menor e apresentaram níveis mais altos do PDGF. Lee e Li (2018) e Thygesen et al. (2012) relataram o envolvimento do PDGF na DAOP com evidências de níveis aumentados do marcador, porém nosso estudo não mostrou esses resultados, podendo ter relação com o tipo de PDGF dosado, pois esses estudos focaram na dosagem de PDGF-C e PDGF-D.

Tem sido sugerido recentemente que a PCR pode afetar a via do NO, o que pode ser interessante em termos da associação entre disfunção endotelial e aterosclerose. Estudos prévios em pacientes com DAOP mostraram níveis plasmáticos moderadamente elevados de

PCR e também que isso está associado a um maior risco de desenvolver eventos cardiovasculares (TRACY et al., 1997; RIDKER et al., 1998). Em estudos anteriores, vimos que a PCR elevada tem uma associação linear com a gravidade clínica com a qual a DAOP se apresenta (DE HARO et al., 2008; AKKOCA et al., 2017). De Haro et al. (2009) observaram aumento dos níveis de PCR-US nos pacientes com DAOP e, também, houve correlação linear entre esses níveis e o grau de gravidade clínica. No nosso estudo, corroboramos com esses achados ao observarmos níveis de PCR aumentados nos pacientes com DAOP e ferida em comparação ao pacientes com DAOP sem ferida e indivíduos saudáveis. Esse achado sugere a existência de um substrato inflamatório na etiopatogenia da DAOP. Tanto a PCR como outras citocinas podem ser responsáveis pela perda de equilíbrio no sistema endotelial e a subsequente disfunção endotelial. Diferente do estudo de De Haro encontramos no nosso estudo correlação positiva entre os níveis de PCR e o nitrito, assim como vimos uma correlação positiva entre PCR e os níveis de VEGF-A, TGF- β 1 e PDGF-BB que, embora fraca, implica em uma relação entre inflamação e disfunção endotelial na etiopatogenia da DAOP.

De acordo com um relatório do estudo de Selvin et al. (2006), a elevação de HbA1c foi associada à maior incidência de DAOP em adultos diabéticos, sugerindo um papel para produtos avançados de glicação e gravidade da hiperglicemia na aterosclerose acelerada nos membros inferiores. O controle glicêmico inadequado está associado a uma cicatrização comprometida, imunidade e neuropatia periférica pelo acúmulo no tecido e reticulação em matriz extracelular, prejudicando a cicatrização de pacientes com úlceras de pés diabéticos (AUBERT et al., 2014). A concentração de HbA1c reflete nos níveis glicêmicos médios no sangue durante um período de 3 a 6 meses e tem sido usada como um marcador para o controle glicêmico em vários ensaios clínicos (SAUDEK; DERR; KALYANI, 2006; PATEL et al., 2008). Arya et al. (2018) sugerem um possível papel do controle glicêmico mais restrito na redução da amputação e necessidade de nova revascularização em diabéticos, bem como uma possível utilidade da triagem para diabetes usando níveis de HbA1c antes da revascularização em vez de um diagnóstico pré-existente de DM, já que o baixo controle glicêmico (HbA1c alta) está incrementalmente associado com aumento do risco de amputação em pacientes com DAOP submetidos à revascularização, sugerindo portanto uma possível utilidade da triagem para diabetes usando HbA1c em pacientes com DAOP programados para revascularização.

De Haro et al. (2009) revelaram uma correlação do nível de NO com glicose e HbA1c, sugerindo que o nível plasmático de NO pode dar uma ideia sobre a integridade funcional do

leito microvascular e condição diabética, e o mesmo foi observado nos nossos resultados. Diabetes e hiperglicemia crônica também levam à produção aumentada de superóxido. O superóxido pode reagir com o NO para produzir peroxinitrito, que é citotóxico, pró-inflamatório e pode contribuir para mais danos e disfunções vasculares (BARBATO; TZENG, 2004). Também observamos uma correlação positiva dos níveis de hemoglobina glicada e os níveis de TGF- β 1. No entanto, ainda são poucos os trabalhos que mostram ou realizam essas correlações entre HbA1c e mediadores inflamatórios.

CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo nos permitem concluir que:

- a) A ET-1 mostrou-se presente e importante em todos os estágios da doença estudados, podendo ser considerada um alvo no tratamento da DAOP, já que inibidores dos seus receptores têm um uso difundido e satisfatório em outras condições clínicas;
- b) O VEGF-A, mostrou-se presente de forma significativa nos pacientes com DAOP em fase avançada, sugerindo um papel preditivo de severidade da doença, e com isso, reforçando a necessidade do avanço dos estudos, considerando a implantação da terapia angiogênica;
- c) Este estudo contribui para a associação entre a função endotelial e os processos inflamatórios ao verificar a correlação positiva entre PCR e VEGF-A, TGF- β 1, NO e PDGF-BB;
- d) A correlação positiva da HbA1c com alguns mediadores, como o NO e o TGF- β 1, reforça a importância do controle glicêmico rigoroso nos pacientes com DAOP associada ao diabetes *mellitus*.

A DAOP é uma doença multifatorial, com muitas citocinas envolvidas no seu processo de desenvolvimento, portanto um único marcador pode não ser capaz de definir seu prognóstico ou severidade. Estima-se que estes resultados apresentados no nosso estudo corroborem com o estabelecimento de mediadores inflamatórios que sirvam de marcadores para a DAOP e seus estágios, sendo assim uma melhor compreensão do papel das citocinas envolvidas na DAOP poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias que possam contribuir para evitar a evolução da doença na sua fase inicial, melhorar a dor e cicatrização de feridas, acompanhar o resultado do tratamento estabelecido e também evitar e/ou reduzir a necessidade de amputações pós-operatórias - tendo desta forma um impacto significativo na qualidade de vida do paciente.

REFERÊNCIAS

- ABDELSALAM, S.; STATHOPOULOU, M.G.; DADÉ, S.; SALEH., et al. Angiogenesis related genes NOS3, CD14, MMP3 and IL4R are associated to VEGF gene expression and circulating levels in healthy adults. *BMC Medical Genetics*, [S.l.], n. 16, p. 90, 2015.
- AKKOCA, M.; USANMAZ, S.E.; KOKSOY, C., et al. Plasma nitric oxide level is correlated with microvascular functions in the peripheral arterial disease. *Clin Hemorheol Microcirc*, [S.l.], v. 65, n. 2, p. 151-162, 2016.
- ALONSO, D.; RADOMSKI, M.W. The Nitric Oxide-Endothelin-1 Connection. *Heart Failure Reviews*, [S.l.], n. 8, p. 107-115, 2003.
- ALVIM, R.O.; DIAS, F.A.L.; OLIVEIRA, C.M., et al. Prevalência de Doença Arterial Periférica e Fatores de Risco Associados em uma População Rural Brasileira: Estudo Corações de Baependi. *Int J Cardiovasc Sci*, [S.l.], v. 31, n. 4, p. 405-413, 2018.
- AMARANTE, R.D.M.; CASTRO, R.; LAGE, A.V., et al. Diabetes Mellitus como fator de risco na aterogênese. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa*, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 87-93, 2007.
- ANDERSEN, C.A. Noninvasive assessment of lower extremity hemodynamics in individuals with diabetes. *Eur J Vasc*, [S.l.], n. 52, v. 3, p. 76-80, 2010.
- ANDERSON, T.J. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fair Rev*, [S.l.], n. 8, p. 71-86, 2003.
- ANITSCHKOW, N.; CHALATOW, S. Ueber experimentelle Cholester-insteatose und ihre Bedeutung fuer die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentrbl Allg Pathol Pathol Anat*, [S.l.], v. 24, p. 1-9, 1913.
- APPIAH, D.; SCHREINER, P.J.; MACLEHOSE, R.F., et al. Association of Plasma γ' Fibrinogen With Incident Cardiovascular Disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, [S.l.], n. 35, p. 2700-6, 2015.
- ARMULIK, A.; ABRAMSSON, A.; BETSHOLTZ, C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, [S.l.], n. 97, p. 512-523, 2005.
- ARYA, S.; BINNEY, Z.O.; KHAKHARIA, A., et al. High Hemoglobin A1c Associated With Increased Adverse Limb Events In Peripheral Arterial Disease Patients Undergoing Revascularization. *J Vasc Surg*, [S.l.], v. 67, n. 1, p. 217-228, 2018.
- AUBERT, C.E.; MICHEL, P.L.; GILLERY, P., et al. Association of peripheral neuropathy with circulating advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and other risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diab Metab Res Rev*, [S.l.], v. 30, n. 8, p. 679-685, 2014.
- BACON, C.R.; CARY, N.R.; DAVENPORT, A.P. Distribution of endothelin receptors in

atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovascular Pharmacol*, [S.l.], n. 26, p. 439-441, 1995.

BAO, P.; KODRA, A.; TOMIC-CANIC, M., et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*, [S.l.], v. 153, n. 2, p. 347-358, 2009.

BARANI, J.; MATTIASSON, I.; LINDBLAD, B., et al. Cardiac Function, Inflammatory Mediators and Mortality in Critical Limb Ischemia. *Angiol*, [S.l.], v. 57, n. 4, p. 437, 2006.

BARBATO, J.E.; TZENG, E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg*, [S.l.], n. 40, p. 187-193, 2004.

BARBOSA, J.H. P.; SOUZA, I.T.; SANTANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F.A. Determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. *Quim Nova*, [S.l.], v. 39, n. 5, p. 608-620, 2016.

BARTON, M.; YANAGISAWA, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *J Physiol Pharmacol*, [S.l.], n. 86, p. 485-498, 2008.

BATTEGAY, E.J.; RAINES, E.W.; SEIFERT, R.A., et al. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell*, [S.l.], n. 63, p. 515-524, 1990.

BECKER, F.; RICCO, J.B.; SETACCI, C., et al. Definitions, Epidemiology, Clinical Presentation and Prognosis. *Eur J Vasc End Surg*, [S.l.], v. 42, n. 2, p. 54-512, 2011.

BJORKERUD, S. Effects of transforming growth factor-beta 1 on human arterial smooth muscle cells in vitro. *Arterioscler Thromb*, [S.l.], n.11, p. 892-902, 1991.

BOSEVSKI, M.; BOSEVSKA, G.; STOJANOVSKA, L. Influence of fibrinogen and C- RP on progression of peripheral arterial disease in type 2 diabetes: a preliminary report. *Cardiovasc Diabetol*, [S.l.], v. 12, p. 29, 2013.

BOTI, C.; MAIONE, C.; DOGLIOTTI, G., et al. Circulating cytokines present in the serum of peripheral arterial disease patients induce endothelial dysfunction. *J Biol Regul Homeost Agents*, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 67-79, 2012.

BOULTON, A.J., et al. The global burden of diabetic foot disease. *The Lancet*, [S.l.], v. 366, n. 9498, p. 1719-1724, 2005.

BRANDÃO, A.C.; TRINDADE, D.M.; PINHEL, M.A. Avaliação do prefill lipídico na doença arterial periférica. *J Vasc Br*, [S.l.], n. 4, p. 129-36, 2005.

BREVETTI, G.; GIUGLIANO, G.; BREVETTI, L., et al. Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation*, [S.l.], n. 122, p. 862-1875, 2010.

BROWNRIGG, J. R., et al. Diagnosis and assessment of peripheral arterial disease in the diabetic foot. *Diab Med*, [S.l.], v. 32, n. 6, p. 738-747, 2015.

BRUNELLI, S.; FUSCO, A.; TRABALLES, M. Functional Outcome After Lower Limb Amputation: Is Hyperhomocysteinemia a Predictive Factor? *An Observational Study Medicine*, [S.l.], v. 94, n. 49, p.1-6, 2015.

CAMACHO, C.C.; MELICIO, L.A.D.; SOARES, A.M.V.C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq Ciênc Saúde*, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 41-48, 2007.

CARDILLO, C.; KILCOYNE, C.M.; WACLAWI, M., et al. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension*, [S.l.], n. 33, p. 753-758, 1999.

CASEY, D.P.; NICHOLS, W.W.; CONTI, C.R., et al. Relationship between endogenous concentrations of vasoactive substances and measures of peripheral vasodilator function in patients with coronary artery disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, [S.l.], v. 37, n. 1, p. 24-28, 2010.

CHAO, J.T.; MARINEZ-LEMUS, L.A.; KAUFMAN, S.J., et al. Modulation of alpha7-integrin-mediated adhesion and expression by platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, [S.l.], v. 290, n. 4, p. C972-eC98, 2006.

CHEN, N.; CHEN, L.; JIANG, S., et al. Predictive value of P selectin and endothelin 1 for vascular restenosis after interventional procedures for peripheral artery disease. *Exp Therap Med*, [S.l.], n. 17, p. 3907-3912, 2019.

CHEN, P. H.; UNGER, V.; HE, X. Structure of Full-Length Human PDGFR β Bound to Its Activating Ligand PDGF-B as Determined by Negative-Stain Electron Microscopy. *J Mol Biol*, [S.l.], v. 427, n. 24, p. 3921-3934, 2015.

CIMMINIELLO, C., et al. Platelet -derived growth factor (PDGF) in patients with different degrees of chronic arterial obstructive disease. *Ang J Vasc Dis*, [S.l.], v. 5, n. 4, p. 290-293, 1999.

COBBOLD, S.P.; CASTEJON, R.; ADAMS, E., et al. Induction of foxP3⁺ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol*, [S.l.], n. 172, p. 6003-10, 2004.

CONTE, S.M.; VALE, P.R. Peripheral Arterial Disease. *Heart, Lung Circ*, [S.l.], v. 27, n. 4, p. 427-432, 2018.

CONTRAN, S.R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Patologia estrutural e funcional*. 8ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

COOKE, J.P.; WILSON, A.M. Biomarkers of Peripheral Arterial Disease. *J Am College Cardiol*, [S.l.], v. 55, n. 19, p. 2017-23, 2010.

CRIQUI, M.H.; ABOYANS, V. Epidemiology of Peripheral Artery Disease. *Circ Res*, [S.l.], 2015.

DE HARO et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) with bosentan. *BMC Cardiovasc Dis*, [S.l.], v. 12, p. 5, 2012.

- DE HARO, J.; ACIN, F.; LOPEZ-QUINTANA, A., et al. Direct association between C-reactive protein serum levels and endothelial dysfunction in patients with claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, [S.l.], n. 35, p. 480-486, 2008.
- DE HARO, J.; ACIN, F.; LOPEZ-QUINTANA, A., et al. Meta-analysis of randomized, controlled clinical trials in angiogenesis: Gene and cell therapy in peripheral arterial disease. *Heart Vessels*, n. 24, p. 321-328, 2009.
- DE HARO, J.; BLEDA, S.; VARELA, C.; ESPARZA., et al. Effect of bosentan on claudication distance and endothelium-dependent vasodilation in hispanic patients with peripheral arterial disease. *Am J Cardiol*, [S.l.], n. 117, p. 295-301, 2016.
- DE HARO, M.; FLO, A.; CASARIEGO, V. Onset of peripheral arterial disease : role of endothelin in endothelial dysfunction. *Int Cardiovasc Thor Surg*, [S.l.], n. 10, p. 760-765, 2010.
- DiCHIARA, M.R.; KIELY, J.M.; GIMBRONE, M.A. Jr., et al. Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. *J Exp Med*, [S.l.], n. 192, p. 695-704, 2000.
- DUY, M.; CARPENTER, L.C.; KOUTAKIS, P., et al. Transforming growth factor-beta 1 produced by vascular smooth muscle cells predicts fibrosis in the gastrocnemius of patients with peripheral artery disease. *J Trans Med*, [S.l.], n. 14, p. 39, 2016.
- ESTIRADO, E.; LAHOZ, C.; LAGUNA, F., et al. Metabolic syndrome in patients with peripheral arterial disease. *Rev Clin Esp*, [S.l.], n. 214, p. 437-444, 2014.
- FANTINI, G.A., CONTE, M.S. Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury. *Am Surg*, [S.l.], v. 61, n. 4, p. 316-319, 1995.
- FENG, B.; CAO, Y.; CHEN, S., et al. Reprint of miRNA-1 regulates endothelin -1 in diabetes. *Life Sci*, [S.l.], n. 118, p. 275-280, 2014.
- FIDDIAN, R.V.; BYAR, D.; EDWARDS, E.A. Factors affecting flow through a stenosed vessel. *Arch Surg*, [S.l.], n. 88, p. 83-6, 1964.
- FINDLEY, C.M.; MITCHELL, R.G.; DUSCHA, B.D., et al. Plasma Levels of Soluble Tie2 and VEGF Distinguish Critical Limb Ischemia from Intermittent Claudication in Patients with Peripheral Arterial Disease. *J Am Coll Cardiol*, [S.l.], v. 52, n. 5, p. 387-393, 2008.
- FOLESTAD, E.; KUNATH, A.; WAGSAER, D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. *Mol Asp Med*, [S.l.], v. 62, p. 1-11, 2018.
- FORESYTHE, R.O., et al. Peripheral arterial disease and revascularization of the diabetic foot. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 435-444, 2015.
- FREDRIKSSON, L.; LI, H.; ERIKSSON, U. The PDGF family: Four gene products form five

dimeric isoforms. *Cyt Growth Factor Rev*, [S.l.], v. 15, n. 4, p. 197-204, 2004.

GANGULY, P; ALAM, S. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*, [S.l.], p. 1-10, 2015.

GARDNER, A.W.; PARKER, D.E.; MONTGOMERY, P.S., et al. Impaired vascular endothelial growth factor a and inflammation in patients with peripheral artery disease. *Angiol*, [S.l.], v. 65, p. 683-690, 2014.

GRAINGER, D.J. Transforming Growth Factor and Atherosclerosis: So Far, So Good for the Protective Cytokine Hypothesis. *Arter Thromb Vasc Biol*, [S.l.], n. 24, p. 399-404, 2004.

GRAINGER, D.J.; METCALFE, J.C. A pivotal role for TGF-beta in atherogenesis? *Biol Rev Camb Philos Soc*, [S.l.], n. 70, p. 571-596, 1995.

GROTENDERST, G.R.; CHANG, T.; SEPPA, H.E.J., et al. Platelet-derived growth factor in a chemottractant for vasseular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, [S.l.], n. 113, p. 261-266, 1982.

GU, Z.C.; ZANG, Y.Z.; PAN, M.M., et al. The safety of endothelin receptor antagonists in the treatment of pulmonary arterial hypertension Protocol for a systemic review and network meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, [S.l.], v. 97, n. 11, p. e0122, 2018.

HANKE, H.; LENZ, C.; FINKING, G. The Discovery of the pathophysiological aspects of atherosclerosis - Review. *Acta Chir Belg*, [S.l.], v. 101, n. 4, p. 162-9, 2001.

HANSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Eng J Med*, [S.l.], n. 352, p. 1685-95, 2005.

HAZARIKA, S.; DOKUN, A.O.; LI, Y., et al. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circ Res*, [S.l.], n. 101, p. 948-56, 2007.

HELLSTEN, Y.; NYBERG, M.; JENSEN, L.G., et al. Vasodilatador interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *J Physiol*, [S.l.], n. 17, v. 590, p. 6297-305, 2012.

HIATT, W.R.; HOAG, S.; HAMMAN, R.F. Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease: The San Luis Valley Diabetes Study. *Circulation*, [S.l.], v. 91, p. 1472-1479, 1995.

HIATT, W.R.; ZAKHARYAN, A.; FUNG, E.T., et al. A validated biomarker panel to identify peripheral artery disease. *Vasc Med*, [S.l.], n.17, p. 386-393, 2012.

HINCHLIFFE, R. J., et al. IWGDF guidance on the diagnosis, prognosis and management of peripheral artery disease in patients with foot ulcers in diabetes. *Diab Metabol Res Rev*, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 37-44, 2016.

HIRASHIKI, A.; ADACHI, S.; NAKANO, Y., et al. Effects of bosentan on peripheral endothelial function in patients with pulmonary arterial hypertension or chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Pulm Circulation*, v. 6, n. 2, p. 168-173, 2016.

HOOI, J.D.; KESTER, A.D.; STOFFERS, H.E., et al. Incidence of and risk factors for asymptomatic peripheral arterial disease: A longitudinal study. *Am J Epidemiol*, [S.l.], n. 153, p. 666-672, 2001.

HOSODA, K.; NAKAO, K.; HIROSHIARA, I., et al. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett*, [S.l.], v. 287, p. 26, 1991.

HOWARD, P.G.; PLUMPTON, C.; DAVENPORT, A.P. Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens*, [S.l.], n.10, p. 1379-1389, 1992.

HUCKLE, W.R.; DRAG, M.D.; ACKER, W.R., et al. Effects of L-749,329 an ETA /ETB Endothelin Receptor Antagonist, in a Porcine Coronary Artery Injury Model of Vascular Restenosis. *Circulation*, [S.l.], n. 103, p. 1899-1905, 2001.

HYE-RYONG SHIM, A., et al. Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, [S.l.], v. 107, n. 25, p. 11307-11312, 2010.

INAMPUDI, C.; AKINTOYE, E.; ANDO, T., et al. Angiogenesis in peripheral arterial disease. *Curr Op Pharmacol*, [S.l.], n. 39, p. 60-67, 2018.

INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S., et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separated genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, [S.l.], n. 86, p. 2863-2867, 1989.

JALKANEN, J.; HAUTERO, O.; MAKSIMOW, M., et al. Correlation between increasing tissue ischemia and circulating levels of angiogenic growth factors in peripheral artery disease. *Cytokine*, [S.l.], n. 110, p. 24-28, 2018.

JALKANEN, J.; MAKSIMOW, M.; HOLLMEN, S., et al. Compared to intermittent claudication critical limb ischemia is associated with elevated levels of cytokines. *PLoS One*, [S.l.], v. 11, n. 9, p. e0162353, 2016.

JANKOWICH, M.; CHOUDHARY, G. Endothelin-1 levels and cardiovascular, Endothelin-1 levels and cardiovascular events. *Trends Cardiovasc Med*, v. pii, n. S1050-1738, p. 1830233-0, 2019.

JEREMYA, J.Y.; SHUKLAA, N.; ANGELINIA, G.D., et al. Endothelin-1 (ET-1) and vein graft failure and the therapeutic potential of ET-1 receptor antagonists. *Pharmacol Res*, [S.l.], n. 63, p. 483-489, 2011.

JONES, M.R.; APELBERG, J.; NAVES-ACIEN, A. Smoking, Menthol Cigarettes and Peripheral Arterial Disease in U.S. Adults. *Nicotine Tob Res*, [S.l.], v. 15, n. 7, p. 1183-89, 2013.

JONES, N.; ILJIN, K.; DUMONT, D.J., et al. Tie receptors: new modulators of angiogenic

and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol*, [S.l.], v. 2, p. 257-67, 2001.

JORAS, M.; POREDOS, P.; FRAS, Z. Endothelial dysfunction in Buerger's disease and its relation to markers of inflammation. *Eur J Clin Invest*, [S.l.], v. 36, p. 376-382, 2006.

JUDE, E. B., et al. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diab Care*, [S.l.], v. 24, n. 8, p. 1433-1437, 2001.

KALANI, M. The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes. *Vasc Health Risk Manag*, [S.l.], v. 4, n. 5, p. 1061-1068, 2008.

KANAAN, R.; STRANGE, C. Use of multitarget tyrosine kinase inhibitors to attenuate platelet-derived growth factor signalling in lung disease. *Eur Resp Rev*, [S.l.], v. 26, n. 146, 2017.

KAZLAUSKAS, A. PDGFs and their receptors. *Gene*, [S.l.], v. 614, p. 1-7, 2017.

KELLY, J.J.; WHITWORTH, J.A. Endothelin-1 as a mediator in cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, [S.l.], v. 26, n. 2, p. 158-161, 1999.

KIKUCHI, R.; NAKAMURA, K.; MACLAUHLAN, S., et al. An anti-angiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med*, [S.l.], v. 20, n. 12, p. 1464-1471, 2014.

KINBONGARD, P.; BAARS, T.; MÖHLENKAMP, S., et al. Aspirate from human stented native coronary arteries vs. saphenous vein grafts: more endothelin but less particulate debris. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, [S.l.], n. 305, p. 1222-1229, 2013.

KIRKBY, N.S.; DUTHIE, K.M.; MILLE, E.R., et al. Non-endothelial cell endothelin-B receptors limit neointima formation following vascular injury. *Cardiovasc Res*, [S.l.], n. 95, p. 19-28, 2012.

KRISHNA, S.M.; MOXON, J.V.; GOLLEDGE, J. A Review of the Pathophysiology and Potential Biomarkers for Peripheral Artery Disease. *Int J Mol Sci*, [S.l.], n. 16, p. 11294-11322, 2015.

KUMAR, V. *Patologia Básica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2013.

LAUSTIOLA, K.E. Atherothrombotic mechanisms in smoking. *J Int Med*, [S.l.], n.230, p. 469-75, 1991.

LEÃO, S.C.; DASHWOOD, M.R.; ANDRADE, M.S., et al. Analysis of immunostaining and western blotting of endothelin 1 and its receptors in mitral stenosis. *Braz J Cardiovasc Surg*, [S.l.], v. 30, n. 2, p. 211-8, 2015.

LEE, C.; LI, X. Platelet-derived growth factor-C and -D in the cardiovascular system and diseases. *Mol Asp Med*, [S.l.], v. 62, p. 12-21, 2018.

MAJESKY, M.W.; LINDNER, V.; TWARDZIK, D.R., et al. Production of transforming growth factor 1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest*, [S.l.], n. 88, p. 904-910, 1991.

MAKDISSE, M. *Índice tornozelo-braquial: importância e uso na prática clínica*. São Paulo: Editora Segmento Farma, 2004.

MAKDISSE, M.; NETO, R.N.; CHAGAS, A.C.P., et al. Adaptação transcultural e validação do Questionário de Claudicação de Edimburgo. *Arq Bras Cardiol*, [S.l.], v. 88, p. 501-506, 2007.

MALMSEDT, J.; LEANDER, K.; WAHLBERG, E., et al. Outcome after leg bypass surgery for critical limb ischemia is poor in patients with diabetes: a population-based cohort study. *Diabetes Care*, [S.l.], v. 31, n. 5, p. 887-892, 2008.

MALONE, M.; LAU, N.S.; WHITE, J., et al. The effect of diabetes mellitus on costs and length of stay in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, [S.l.], v. 48, n. 4, p. 447-451, 2014.

MARCHAND F. *Ueber Atherosclerosis*. Verhandlungen der Kongresse fuer Innere Medizin. 21 Kongresse, 1904.

MARKS, D.S.; VITA, J.A.; FOLTS, J.D., et al. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest*, [S.l.], v. 96, p. 2630-8, 1995.

MASCARENHAS, J.V., et al. Peripheral arterial disease. *End Metab Clin*, [S.l.], v. 43, n. 1, p. 149-166, 2014.

McCAFFREY, T.A. TGF-betas and TGF-beta receptors in atherosclerosis. *Cyt Grow Fact Rev*, [S.l.], n. 11, p. 103-114, 2000.

MCDERMOTT, M.M.; GURALNIK, J.M.; CORSI, A., et al. Patterns of inflammation associated with peripheral arterial disease: The inchianti study. *Am Heart J*, [S.l.], v. 150, p. 276-281, 2005.

McNAMARA, D.; BEDI, B.; AURORA, H., et al. L-Arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Commun*, [S.l.], n. 193, p. 291-6, 1993.

METCALFE, J.C.; GRAINGER, D.J. Transforming growth factor-beta and the protection from cardiovascular injury hypothesis. *Biochem Soc Trans*, [S.l.], n. 23, p. 403-6, 1995.

MIYOSHI, T.; LI, Y.; SHIH, D.M., et al. Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci*, [S.l.], v. 79, p. 525-531, 2006.

MIRALLES, J.H.; AGUILLAR, E.M.; FLOREZ, A., et al. Nitric oxide: Link between endothelial dysfunction and inflammation in patients with peripheral arterial disease of the lower limbs. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, [S.l.], n. 9, p. 107-112, 2009.

- MORELAND, S.; MC MULLAN, D.N.; DELANEY, C.L., et al. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET-B-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, [S.l.], n. 184, p. 100-106, 1992.
- MURABITO, J.M., KEYES, M.J., GUO, C.Y., et al. Cross-sectional relations of multiple inflammatory biomarkers to peripheral arterial disease: the Framingham Offspring Study. *Atherosclerosis*, [S.l.], n. 203, p. 509-14, 2008.
- NADAR, S.K.; BLANN, A.; BEEVERS, D.G., et al. Abnormal angiopoietins 1&2, angiopoietin receptor Tie-2 and vascular endothelial growth factor levels in hypertension: relationship to target organ damage [a sub-study of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)]. *J Intern Med*, [S.l.], v. 258, p. 336-343, 2005.
- NATIVEL, M.; POTIER, L.; ALEXANDRE, L., et al. Lower extremity arterial disease in patients with diabetes: a contemporary narrative review. *Cardiovasc Diabetol*, [S.l.], v. 17, n. 138, 2018.
- NIKOL, S.; ISNER, J.M.; PICKERING, J.G., et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions. *J Clin Invest*, [S.l.], n. 90, p. 1582-1592, 1992.
- NORGREN, L.; HIATT, W.R.; DORMANDY, J.A. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Aerial Disease - TASC II. *J Vasc Surg*, [S.l.], v.45, 2007.
- NORMAN, P.E.; EIKELBOOM, J.W.; HANKEY, G.J. Peripheral arterial disease: prognostic significance and prevention of atherothrombotic complications. *Med J Aust*, [S.l.], v. 81, p. 150-4, 2004.
- NOVO, S. Classification, epidemiology, risk factors, and natural history of peripheral arterial disease. *Diab Obes Metab*, [S.l.], v. 4, n. Suppl 2, p. 1-6, 2002.
- NOYES, A.M.; ABBOTT, J.D.; GOSH, K., et al. Association between health status and sociodemographic, clinical and treatment disparities in the Patient-centered Outcomes Related to Treatment Practices in Peripheral Arterial Disease: Investigating Trajectories (PORTRAIT) registry. *Vasc Med*, [S.l.], v. 23, n. 1, p. 32-38, 2018.
- OUMA, G.O.; JONAS, R.A.; USMAN, M.H., et al. Targets and delivery methods for therapeutic angiogenesis in peripheral artery disease. *Vasc Med*, [S.l.], v. 17, p. 174-192, 2012.
- OZAKI, K.; TANAKA, T. Molecular genetics of coronary artery disease. *J Hum Genet*, [S.l.], v. 61, n. 1, p. e71-e77, 2016.
- OZAN, F., et al. Evaluation of major and minor lower extremity amputation in diabetic foot patients. *Turk J Med Sci*, [S.l.], v. 47, n. 4, p. 1116-2017, ago. 2017.
- PEPYS, M.B.; HIRSCHFIELD, G.M. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*, [S.l.], n. 111, p. 1805-1812, 2003.

- PEREIRA, C.; MINAME, M.H.; MAKDISSE, M.R., et al. Peripheral arterial disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, [S.l.], n. 242, p. 174-178, 2015.
- PICCINATO, C.L.; CHERRI, J.; MORIYA, T. Hipertensão e doença arterial periférica. *Rev Bras Hipertens*, [S.l.], n. 8, p. 306-15, 2001.
- PICHIULE, P.; CHAVEZ, J.C.; LAMANNA, J.C. Hypoxic Regulation of Angiopoietin-2 Expression in Endothelial Cells. *J Biol Chem*, [S.l.], v. 279, p. 12171-12180, 2004.
- QIANG, G.; CAOHUAN, Z.; YUXIA, Z., et al. Effect of Sancaijiangtang on plasma nitric oxide and endothelin-1 levels in patients with type 2 diabetes mellitus and vascular dementia : a single-blind randomized controlled trial. *J Trad Chinese Med*, [S.l.], n. 35, p. 375-380, 2015.
- RICHARD, V. L'endothéline: de la découverte aux avancées pharmacothérapeutiques. *Presse Med*, [S.l.], n. 43, p. 742-755, 2014.
- RIDKER, P.M.; CUSHMAN, M., STAMPFER, M.J., TRACY, R.P., HENNEKENS, C.H. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*, [S.l.], v. 97, p. 425-428, 1998.
- RIDKER, P.M.; STAMPFER, M.J.; RIFAI, N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA*, [S.l.], n. 285, p. 2481-2485, 2001.
- ROOS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, [S.l.], n. 362, p. 801-809, 1993.
- SACKS, D.; BAKAL, C.; BEATY, P.T., et al. Position Statement on the Use of Ankle Brachial Index in the Evaluation of Patients with Peripheral Vascular Disease. *J Vasc Interv Radiol*, [S.l.], v. 14, p. S389, 2003.
- SAUDEK, C.D.; DERR, R.L.; KALYANI, R.R. Assessing glycemia in diabetes using self-monitoring blood glucose and hemoglobin A1c. *JAMA*, v. 295, n. 14, p. 1688-1697, 2006.
- SCHULICK, A.H.; TAYLOR, A.J.; ZUO, W., et al. Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*, [S.l.], v. 95, p. 6983-6988, 1998.
- SELVIN, E.; WATANAKI, K.; STEFFES, M.W.; CORESH, J.; SHARRETT, A.R. HbA1c and peripheral arterial disease in diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Diab Care*, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 877-882, 2006.
- SERRANO, C.; FERNÁNDEZ, J.; LUZ, P. Moléculas de adesão, inflamação e endotélio. *End Doen Cardiovasc*, [S.l.], p. 97-114, 2003.
- SETACC, C.; DONATO, G.; TERA, A., et al. Chapter IV: Treatment of critical limb ischemia. *Eur J Vasc and Endovas Surg*, [S.l.], v. 42, p. 43-59, 2011.

SETACCI, C. *Critical limb ischemia. New developments and perspectives*. Turin: Edizioni Minerva Medica, 2010.

SIGNORELLI, S.S.; ANZALDI, M.; FIORE, V., et al. Patients with unrecognized peripheral arterial disease (PAD) assessed by ankle-brachial index (ABI) present a defined profile of proinflammatory markers compared to healthy subjects. *Cytokine*, [S.l.], v.59, p.294-298, 2012.

SIGVANT, B.; WIBERG-HEDMAN, K.; BERGQVIST, D., et al. A population-based study of peripheral arterial diseases prevalence with special focus on critical limb ischemia and sex differences. *J Vasc Surg*, [S.l.], n. 45, p. 1185-91, 2007.

SILVESTRE, J.S.; MALLAT, Z.; TAMARAT, R., et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: Role in ischemia-induced angiogenesis. *Circ Res*, [S.l.], n. 89, p. 259-264, 2001.

SINWAR, P.D. Treatment outcomes in diabetic patients with chronic limb-threatening ischemia. *J Vasc Surg*, [S.l.], v. 68, n. 2, p. 487-494, ago. 2018.

SMITH, J.D.; BRYANT, S.R.; COUPER, L.L., et al. Soluble transforming growth factor-beta type II receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth. *Circ Res*, [S.l.], v. 84, p. 1212-1222, 1999.

SOLANKI, J.D.; MAKWANA, A.H.; SHAH, C.J. Is the peripheral arterial disease in low risk type 2 diabetic patients influenced by body mass index, lipidemic control and statins? *J Pharmacol Pharmacother*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 87-92, 2016.

STARY, H.C.; CHANDLER, A.B.; GLAGOV, S.; GUYTON, J.R. et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesion of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. *Am Heart Assoc Arterioscl Thromb*, [S.l.], v. 14, p. 840-56, 1994.

STEHR, A.; TOPEL, I.; MULLER, S., et al. Vegf: A surrogate marker for peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, [S.l.], v. 39, p. 330-332, 2010.

STOFFERS, H.E.; RINKENS, P.E.; KESTER, A.D., et al. The prevalence asymptomatic and unrecognized peripheral arterial occlusive disease. *Int J Epidemiol*, [S.l.], n. 24, p. 282-90, 1996.

STOUFFER, G.A.; OWENS, G.K. Angiotensin II-induced mitogenesis of spontaneously hypertensive rat-derived cultured smooth muscle cells is dependent on autocrine production of transforming growth factor-beta. *Circ Res*, [S.l.], v. 70, p. 820-828, 1992.

SUZUKI, A.; KAJIKURI, A.; ITOH, T. Effects of endothelin-1 on endothelial cells in the porcine coronary artery. *Circ Res*, [S.l.], v. 69, p. 1361-1368, 1991.

TABAS, I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differentiation*, [S.l.], v. 11, p. S12-S16, 2004.

TANG, B.; GONG, J.P.; SUN, J.M., et al. Construction of a plasmid for expression of rat platelet-derived growth factor C and its effects on proliferation, migration and adhesion of endothelial progenitor cells. *Plasmid*, [S.l.], v. 69, n. 3, p. 195e201, 2013.

THYGESEN, K.; ALPERT, J.S.; JAFFE, A.S., et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, [S.l.], v. 60, n. 16, p. 1581e1598, 2012.

TRACY, R.P., et al. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, [S.l.], v. 17, n. 6, p. 1121-7, 1997.

TROJANOWSKA, M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatol*, [S.l.], v. 47, n. suppl. 5, p. 5-7, 2009.

TSAI, P.H.; LUI, J., et al. Effect of lower extremity bypass surgery on inflammatory reaction and endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients. *Mediators of Inflammation*, [S.l.], Article ID 417301, 4 pages, 2009.

TSUI, J.C.; SHI-WEN, X. Endothelin-1 in peripheral arterial disease: a potential role in muscle damage. *Pharmacol Res*, [S.l.], v. 63, n. 6, p. 463-472, 2011.

TSUI, J.C.S., DASHWOOD, M.R. A Role for Endothelin-1 in Peripheral Vascular Disease. *Curr Vasc Pharmacol*, [S.l.], n. 3, p. 325-332, 2005.

TZOULAKI, I.; MURRAY, G.D.; LEE, A.J., et al. C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study. *Circulation*, [S.l.], v. 112, p. 976-83, 2005.

VALENTINE, R.J.; GUERRA, R.; STEPHAN, P., et al. Family history is a major determinant of subclinical peripheral arterial disease in young adults. *J Vasc Surg*, [S.l.], v. 39, p. 351-6, 2004.

VAQUERO, M. The impact of peripheral arterial disease: A proposal for a new classification. *Cir Esp*, [S.l.], n. 94, p. 266-273, 2016.

VARU, V.N.; HOGG, M.E.; KIBBE, M.R. Critical limb ischemia. *J Vasc Surg*, [S.l.], v. 51, p. 230-41, 2010.

VOGEL, R.A. Cholesterol lowering and endothelial function. *Am J Med*, [S.l.], v. 107, p. 479-487, 1999.

VU, J.D.; VU, J.B.; PIO, J.R., et al. Impact of C-reactive protein on the likelihood of peripheral arterial disease in United States adults with the metabolic syndrome, diabetes mellitus, and preexisting cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, [S.l.], v. 96, p. 655-8, 2005.

WANG, F.; TIEWEI LI, B.S; CONG, X., et al. The Value of Big Endothelin-1 in the Assessment of the Severity of Coronary Artery Calcification. *Clin Appl Thromb Hemost*, [S.l.], v. 24, n. 7, p. 1042-1049, 2018.

WASSEL, C.L.; LAMINA, C.; NAMBI, V., et al. Genetic determinants of the ankle-brachial index: A meta- analysis of a cardiovascular candidate gene 50K SNP panel in the candidate gene association resource (CARE) consortium. *Atherosclerosis*, [S.l.], v. 222, n. 1, p. 138-147, 2012.

WATSON, K.; WATSON, B.D.; PATER, K.S. Peripheral arterial disease: a review of disease awareness and management. *Am J Geriatr Pharmacother*, [S.l.], v. 4, p. 365-79, 2006.

WEISS, D.J., et al. Oxidative damage and myofiber degeneration in the gastrocnemius of patients with peripheral arterial disease. *J Trans Med*, [S.l.], v. 11, p. 230, 2013.

WIECZÓR, R.; GADOMSKA, G.; RUSZKOWSKA-CIASTEK, B., et al. Impact of type 2 diabetes on the plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors type 1 and type 2 in patients with peripheral arterial disease. *Biom Biotech*, [S.l.], v. 16, n. 11, p. 948-956, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of atherosclerosis lesions. Report of a study group. Definition of terms. *WHO Tech Rep Ser*, [S.l.], v. 143, p. 13-20, 1958.

XIAO, Q.; ZENG, L.; ZHANG, Z., et al. Stem cell-derived Sca-1 progenitors differentiate into smooth muscle cells, which is mediated by collagen IV-integrin alpha1/beta1/alphaV and PDGF receptor pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, [S.l.], v. 292, p. C342-C352, 2007.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S., et al. A novel potent vasoconstrictor constrictive produced by vascular endothelial cells. *Nature*, [S.l.], v. 332, p. 411-415, 1988.

YANG, H.; XU, J.X.; KONG, X.Z., et al. Relations between Plasma von Willebrand Factor or Endothelin-1 and Restenosis following Carotid Artery Stenting. *Med Princ Pract*, [S.l.], v. 21, n. 6, p. 538-42, 2012.

YANO, M.; OKADA, K.; TAKADA, J., et al. Endothelin-converting enzyme and its in vitro and in vivo inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol*, [S.l.], n. 17, p. 26-28, 1991.

YOUNG, D.F.; CHOLVIN, N.R.; KIRKKEIDE, R.L. Hemodynamics of arterial stenoses at elevated flow rates. *Circ Res*, [S.l.], n. 89, p. 307-10, 1977.

ZHANG, Y.; ZHANG, W.; WANG, K., et al. Expression of platelet derived growth factor in the vascular walls of patients with lower extremity arterial occlusive disease. *Exp Ther Med*, [S.l.], v. 9, p. 1223-1228, 2015.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do HMSA

HOSPITAL MUNICIPAL SOUZA AGUIAR - HMSA
SERVIÇO DE CIRURGIA VASCULAR E ENDOVASCULAR
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UERJ
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - FCM
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA - LIP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título do projeto: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOTELINA-1 EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE MEMBROS INFERIORES.

Nome dos pesquisadores responsáveis: PROFA. DRA. THAIS PORTO AMADEU E PROFA. DRA. LUCIANA SILVA RODRIGUES

Nome dos médicos responsáveis: DRA. ROSANA PALMA , DRA. RITA DE CASSIA PROVIETT.

Nome e telefone de contato para questões e problemas: DRA. ROSANA PALMA – TEL.: (21) 31112705 .

Justificativa do projeto:

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) é uma doença frequente e com muito comprometimento na qualidade de vida do paciente. Iniciaremos uma nova pesquisa que tem por finalidade identificar novas formas de acompanhamento, prognóstico, e de tratamento adjuvante.

A DAOP constitui uma forma de aterosclerose que resulta em um reduzido fluxo sanguíneo para o membro inferior, portanto, durante o exercício físico há uma dificuldade de aumentar o fluxo para a demanda da musculatura, causando dor. Com a progressão da doença, pode haver aparecimento de úlceras e gangrena, que podem ser complicadas por infecção. Os casos mais graves exigem intervenção cirúrgica para revascularização. Alguns pacientes não apresentam boa resposta a médio prazo e, conseqüentemente, pioram, acarretando na reinternação para nova revascularização ou amputação do membro. Existem marcadores da doença no sangue e pretendemos correlacionar os níveis deles nos diferentes momentos acessados, com os desfechos da cirurgia de revascularização através do monitoramento da evolução da ferida e da dor.

Esta pesquisa consiste em usar o sangue para tentar identificar marcadores que sejam específicos no acompanhamento da DAOP.

Você, então, está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa e é importante que leia esse documento com atenção para decidir se você aceita ou não ser incluído no grupo que vai participar desse estudo.

Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será respeitada e o seu tratamento médico acontecerá normalmente como de todos os pacientes que frequentam esse serviço clínico,

não havendo nenhum prejuízo para a sua assistência médica enquanto durar o seu tratamento. Da mesma forma, se você aceitar participar da pesquisa e a qualquer momento quiser desistir dessa participação, a sua assistência médica continuará acontecendo normalmente.

Para o seu tratamento e para a pesquisa serão necessárias a realização de eco doppler, coleta de sangue e imagem fotográfica e desenho da ferida. Esses materiais serão utilizados para a realização dos exames já comumente usados para o diagnóstico da DAOP. Um pouco do sangue será armazenado no Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Você, participante do estudo, poderá entrar em contato com o pesquisador ou médico responsável para saber detalhes sobre os resultados. Mas, para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto veja a seção seguinte.

Procedimentos e riscos:

Coleta de sangue: Um profissional bem treinado neste procedimento fará a punção da veia do seu braço. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico aquele usado quando se tira sangue para exame. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (mancha roxa) no local, e infecção (muito raramente). A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e não causará nenhuma complicação.

Fotografia da ferida: Durante o acompanhamento, a ferida será fotografada, desenhada em papel transparente e não constará seu nome.

Benefícios: Os exames realizados poderão contribuir para o acompanhamento e tratamento da DAOP. Os voluntários do estudo já tem uma doença no membro inferior e necessitarão realizar estes procedimentos. Esse estudo beneficiará futuramente toda a população, pois a identificação de marcadores específicos nos permitirá o desenvolvimento de novos métodos de tratamento.

Ressarcimento de Despesas: Não haverá nenhum tipo de compensação financeira para os participantes da pesquisa. Por outro lado, todos os exames serão feitos no Hospital Municipal Souza Aguiar e no Laboratório de Imunopatologia (UERJ), e não serão cobrados.

Confiabilidade: As pessoas que vão punccionar o seu sangue e realizar todos os outros exames, assim como os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constará o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra.

Responsabilidade: A Comissão de Ética em Pesquisa responsabilizará o coordenador do estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o mesmo.

Declaração: O médico da equipe de pesquisa colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contatar a pesquisadora responsável: Dra. Rosana Palma (médica da equipe de cirurgia vascular do HMSA).

Participação voluntária: Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não. Mesmo se decidir participar, você é livre para desistir do estudo a qualquer momento sem dar um motivo ou explicação. Isto não afetará seu cuidado médico futuro de qualquer forma.

Anuência para fazer parte do estudo:

Assinando este documento você concorda que:

- 1 - Você teve uma chance para fazer perguntas;
- 2 - Você é voluntário(a) para participar deste estudo.

Nome: _____ Data: ____/____/____

Assinatura _____

Pesquisador supervisor da assinatura do termo de consentimento:

Nome: _____ Data: ____/____/____

Assinatura _____

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do HFA

HOSPITAL FEDERAL DO ANDARAÍ - HFA
SERVIÇO DE CIRURGIA VASCULAR E ENDOVASCULAR
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UERJ
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - FCM
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA - LIP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título do projeto: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOTELINA-1 EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE MEMBROS INFERIORES.

Nome dos pesquisadores responsáveis: PROFA. DRA. THAIS PORTO AMADEU E PROFA. DRA. LUCIANA SILVA RODRIGUES

Nome dos médicos responsáveis: DRA. ROSANA PALMA.

Nome e telefone de contato para questões e problemas: DRA. ROSANA PALMA – TEL 25757000.

Justificativa do projeto:

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) é uma doença frequente e com muito comprometimento na qualidade de vida do paciente. Iniciaremos uma nova pesquisa que tem por finalidade identificar novas formas de acompanhamento, prognóstico, e de tratamento adjuvante.

A DAOP constitui uma forma de aterosclerose que resulta em um reduzido fluxo sanguíneo para o membro inferior, portanto, durante o exercício físico há uma dificuldade de aumentar o fluxo para a demanda da musculatura, causando dor. Com a progressão da doença, pode haver aparecimento de úlceras e gangrena, que podem ser complicadas por infecção. Os casos mais graves exigem intervenção cirúrgica para revascularização. Alguns pacientes não apresentam boa resposta a médio prazo e, conseqüentemente, pioram, acarretando na reinternação para nova revascularização ou amputação do membro. Existem marcadores da doença no sangue e pretendemos correlacionar os níveis deles nos diferentes momentos acessados, com os desfechos da cirurgia de revascularização através do monitoramento da evolução da ferida e da dor.

Esta pesquisa consiste em usar o sangue para tentar identificar marcadores que sejam específicos no acompanhamento da DAOP.

Você, então, está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa e é importante que leia esse documento com atenção para decidir se você aceita ou não ser incluído no grupo que vai participar desse estudo.

Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será respeitada e o seu tratamento médico acontecerá normalmente como de todos os pacientes que frequentam esse serviço clínico,

não havendo nenhum prejuízo para a sua assistência médica enquanto durar o seu tratamento. Da mesma forma, se você aceitar participar da pesquisa e a qualquer momento quiser desistir dessa participação, a sua assistência médica continuará acontecendo normalmente.

Para o seu tratamento e para a pesquisa serão necessárias a realização de eco doppler, coleta de sangue e imagem fotográfica e desenho da ferida. Esses materiais serão utilizados para a realização dos exames já comumente usados para o diagnóstico da DAOP. Um pouco do sangue será armazenado no Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Você, participante do estudo, poderá entrar em contato com o pesquisador ou médico responsável para saber detalhes sobre os resultados. Mas, para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto veja a seção seguinte.

Procedimentos e riscos:

Coleta de sangue: Um profissional bem treinado neste procedimento fará a punção da veia do seu braço. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico aquele usado quando se tira sangue para exame. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (mancha roxa) no local, e infecção (muito raramente). A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e não causará nenhuma complicação.

Fotografia da ferida: Durante o acompanhamento, a ferida será fotografada, desenhada em papel transparente e não constará seu nome.

Benefícios: Os exames realizados poderão contribuir para o acompanhamento e tratamento da DAOP. Os voluntários do estudo já tem uma doença no membro inferior e necessitarão realizar estes procedimentos. Esse estudo beneficiará futuramente toda a população, pois a identificação de marcadores específicos nos permitirá o desenvolvimento de novos métodos de tratamento.

Ressarcimento de Despesas: Não haverá nenhum tipo de compensação financeira para os participantes da pesquisa. Por outro lado, todos os exames serão feitos no Hospital Municipal Souza Aguiar e no Laboratório de Imunopatologia (UERJ), e não serão cobrados.

Confiabilidade: As pessoas que vão punccionar o seu sangue e realizar todos os outros exames, assim como os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constará o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra.

Responsabilidade: A Comissão de Ética em Pesquisa responsabilizará o coordenador do estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o mesmo.

Declaração: O médico da equipe de pesquisa colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contatar a pesquisadora responsável: Dra. Rosana Palma (médica da equipe de cirurgia vascular do HFA).

Participação voluntária: Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não. Mesmo se decidir participar, você é livre para desistir do estudo a qualquer momento sem dar um motivo ou explicação. Isto não afetará seu cuidado médico futuro de qualquer forma.

Anuência para fazer parte do estudo:

Assinando este documento você concorda que:

- 1 - Você teve uma chance para fazer perguntas;
- 2 - Você é voluntário(a) para participar deste estudo.

Nome: _____ Data: ____/____/____

Assinatura _____

Pesquisador supervisor da assinatura do termo de consentimento:

Nome: _____ Data: ____/____/____

Assinatura _____

APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos indivíduos saudáveis (Controles)

HOSPITAL MUNICIPAL SOUZA AGUIAR - HMSA
SERVIÇO DE CIRURGIA VASCULAR E ENDOVASCULAR
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - UERJ
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - FCM
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA - LIP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Título do projeto: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOTELINA-1 EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE MEMBROS INFERIORES.

Nome dos pesquisadores responsáveis: PROFA. DRA. THAIS PORTO AMADEU E PROFA. DRA. LUCIANA SILVA RODRIGUES

Nome dos médicos responsáveis: DRA. ROSANA PALMA , DRA. RITA DE CASSIA PROVIETT.

Nome e telefone de contato para questões e problemas: DRA. ROSANA PALMA – TEL.: (21) 31112705 .

Justificativa do projeto:

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) é uma doença frequente e com muito comprometimento na qualidade de vida do paciente. Iniciaremos uma nova pesquisa que tem por finalidade identificar novas formas de acompanhamento, prognóstico, e de tratamento adjuvante.

A DAOP constitui uma forma de aterosclerose que resulta em um reduzido fluxo sanguíneo para o membro inferior, portanto, durante o exercício físico há uma dificuldade de aumentar o fluxo para a demanda da musculatura, causando dor. Com a progressão da doença, pode haver aparecimento de úlceras e gangrena, que podem ser complicadas por infecção. Os casos mais graves exigem intervenção cirúrgica para revascularização. Alguns pacientes não apresentam boa resposta a médio prazo e, conseqüentemente, pioram, acarretando na reinternação para nova revascularização ou amputação do membro. Existem marcadores da doença no sangue e pretendemos correlacionar os níveis deles nos diferentes momentos acessados, com os desfechos da cirurgia de revascularização através do monitoramento da evolução da ferida e da dor.

Esta pesquisa consiste em usar o sangue para tentar identificar marcadores que sejam específicos no acompanhamento da DAOP.

Você, então, está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa e é importante que leia esse documento com atenção para decidir se você aceita ou não ser incluído no grupo que vai participar desse estudo (grupo controle).

Se você decidir que não quer participar dessa pesquisa, a sua decisão será respeitada.

Para a pesquisa será necessária a realização de coleta de sangue. Esses materiais serão utilizados para a realização dos exames já comumente usados para o diagnóstico da DAOP. Um pouco do sangue será armazenado no Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Você, participante do estudo, poderá entrar em contato com o pesquisador ou médico responsável para saber detalhes sobre os resultados. Mas, para maiores detalhes sobre os riscos, inconveniências, desconfortos e outras informações pertinentes relativas à sua participação neste projeto veja a seção seguinte.

Procedimentos e riscos:

Coleta de sangue: Um profissional bem treinado neste procedimento fará a punção da veia do seu braço. O procedimento toma de 5 a 10 minutos, e é idêntico aquele usado quando se tira sangue para exame. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (mancha roxa) no local, e infecção (muito raramente). A quantidade de sangue necessária para o estudo é muito pequena, e não causará nenhuma complicação.

Benefícios: Os exames realizados poderão contribuir para o acompanhamento e tratamento da DAOP. Os voluntários do estudo já tem uma doença no membro inferior e necessitarão realizar estes procedimentos. Esse estudo beneficiará futuramente toda a população, pois a identificação de marcadores específicos nos permitirá o desenvolvimento de novos métodos de tratamento.

Ressarcimento de Despesas: Não haverá nenhum tipo de compensação financeira para os participantes da pesquisa. Por outro lado, todos os exames serão feitos no Hospital Municipal Souza Aguiar e no Laboratório de Imunopatologia (UERJ), e não serão cobrados.

Confiabilidade: As pessoas que vão punccionar o seu sangue e realizar todos os outros exames, assim como os pesquisadores que estão coordenando este estudo irão tratar sua identidade com padrões profissionais de confiabilidade. Nas amostras não constará o seu nome, e ninguém (exceto os pesquisadores envolvidos no estudo) será capaz de identificar você como doador desta amostra.

Responsabilidade: A Comissão de Ética em Pesquisa responsabilizará o coordenador do estudo por qualquer transtorno que aconteça durante o mesmo.

Declaração: O médico da equipe de pesquisa colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contatar a pesquisadora responsável: Dra. Rosana Palma (médica da equipe de cirurgia vascular do HMSA).

Participação voluntária: Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não. Mesmo se decidir participar, você é livre para desistir do estudo a qualquer momento sem dar um motivo ou explicação.

Anuência para fazer parte do estudo:

Assinando este documento você concorda que:

- 1 - Você teve uma chance para fazer perguntas;
- 2 - Você é voluntário(a) para participar deste estudo.

Nome: _____ Data: ____/____/____

Assinatura _____

Pesquisador supervisor da assinatura do termo de consentimento:

Nome: _____ Data: ____/____/____

Assinatura _____

APÊNDICE D - Questionário Aplicado aos Pacientes do HMSA

Hospital Municipal Souza Aguiar - UERJ
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOTELINA-1 EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL
OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE MEMBROS INFERIORES.

Dados Sócio Demográficos	
Nome:	
Prontuário HMSA:	
Prontuário LIP:	
Nº SUS:	
Data da consulta:	
Endereço – Rua:	
Endereço – Nº:	
Endereço – Complemento:	
Endereço – Bairro:	
Endereço – Cidade/UF:	
Endereço – CEP:	
Telefone – Residencial:	
Telefone – Celular:	
Telefone – Comercial:	
Data Nascimento:	
Idade:	
Peso:	
Altura:	
Gênero:	
Naturalidade:	
Etnia:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Branco 2. Negro 3. Pardo 4. Sem dado
Estado Civil:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Não casado 2. Casado 3. Sem dado
Escolaridade:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Analfabeto 2. Ensino Fundamental 3. Ensino Médio 4. Ensino Superior 5. Sem dado
Profissão:	
Critérios de Elegibilidade	
Doença Arterial Obstrutiva Periférica por ecodoppler, ITB e arteriografia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não
Idade > 18 anos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não
Concordância na participação do estudo e assinatura TCLE	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não
Anamnese	
Tempo de evolução da doença (em semanas)	
AIDS (critério de exclusão)	

	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 3. Sem dado
Comorbidades <ol style="list-style-type: none"> 1. Diabetes 2. Colagenose 3. Insuficiência cardíaca (critério de exclusão) 4. Neoplasia 5. Cirrose hepática 6. Hipotireoidismo Outras (_____) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 3. Sem dado
Uso de medicamentos <ol style="list-style-type: none"> 1. Anti-hipertensivos 2. Hipoglicemiantes 3. AAS 4. Cilostazol 5. Sinvastatina 6. Outros (_____) 	<input type="checkbox"/> Beta bloqueador <input type="checkbox"/> BRA <input type="checkbox"/> IECA <input type="checkbox"/> Bloqueador do canal de cálcio <input type="checkbox"/> Atensina <input type="checkbox"/> Diuréticos <input type="checkbox"/> Daonil <input type="checkbox"/> Metformin <input type="checkbox"/> Insulina NPH
Descrição de sintomas no diagnóstico:	
Tabagista Quantos maços por dia? (___)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não
Etilista	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não

Exames complementares	
Ht	_____
Hb	_____
Leuco	_____
Plaquetas	_____
INR	_____
Relação PTT	_____
TAP	_____
Glicemia de jejum	_____
Hemoglobina glicosilada	_____
Proteínas totais	_____
Albumina	_____
LDH	_____
Colesterol	
Triglicerídeos	
HDL	
LDL	
TGO	
TGP	
Gama GT	
Fosfatase Alcalina	

Bilirrubina total e Fração HIV PCR	
Data (dd/mm/aaaa):	
ITB	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 3. Sem dado
Data (dd/mm/aaaa):	
Resultado ITB	
Eco doppler arterial	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 3. Sem dado
Data (dd/mm/aaaa):	
Resultado do eco doppler arterial	
Arteriografia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Sim 2. Não 3. Sem dado
Data (dd/mm/aaaa): Resultado:	
Fotografia da ferida:	
Medida da ferida:	
Descrição da ferida:	

APÊNDICE E - Questionário Aplicado aos Pacientes do HFA

Hospital Federal do Andaraí - UERJ
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOTELINA-1 EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL
OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE MEMBROS INFERIORES.

Dados Sócio Demográficos	
Nome:	
Prontuário HFA:	
Prontuário LIP:	
Nº SUS:	
Data da consulta:	
Endereço – Rua:	
Endereço – Nº:	
Endereço – Complemento:	
Endereço – Bairro:	
Endereço – Cidade/UF:	
Endereço – CEP:	
Telefone – Residencial:	
Telefone – Celular:	
Telefone – Comercial:	
Data Nascimento:	
Idade:	
Peso:	
Altura:	
Gênero:	
Naturalidade:	
Etnia:	4. Branco 5. Negro 6. Pardo 4. Sem dado
Estado Civil:	3. Não casado 4. Casado 3. Sem dado
Escolaridade:	5. Analfabeto 6. Ensino Fundamental 7. Ensino Médio 8. Ensino Superior 5. Sem dado
Profissão:	
Critérios de Elegibilidade	
Doença Arterial Obstrutiva Periférica por ecodoppler, ITB e arteriografia	3. Sim 4. Não
Idade > 18 anos	3. Sim 4. Não
Concordância na participação do estudo e assinatura TCLE	3. Sim 4. Não
Anamnese	
Tempo de evolução da doença (em semanas)	
AIDS (critério de exclusão)	4. Sim

	5. Não 3. Sem dado 4.
Comorbidades 7. Diabetes 8. Colagenose 9. Insuficiência cardíaca (critério de exclusão) 10. Neoplasia 11. Cirrose hepática 12. Hipotireoidismo Outras (_____)	3. Sim 4. Não 3. Sem dado
Uso de medicamentos 7. Anti-hipertensivos 8. Hipoglicemiantes 9. AAS 10. Cilostazol 11. Sinvastatina 12. Outros (_____)	() Beta bloqueador () BRA () IECA () Bloqueador do canal de cálcio () Atensina () Diuréticos () Daonil () Metformin () Insulina NPH
Descrição de sintomas no diagnóstico:	
Tabagista Quantos maços por dia? (___)	1. Sim 2. Não
Etilista	1. Sim 2. Não

Exames complementares	
Ht	_____
Hb	_____
Leuco	_____
Plaquetas	_____
INR	_____
Relação PTT	_____
TAP	_____
Glicemia de jejum	_____
Hemoglobina glicosilada	_____
Proteínas totais	_____
Albumina	_____
LDH	_____
Colesterol	
Triglicerídeos	
HDL	
LDL	
TGO	
TGP	
Gama GT	
Fosfatase Alcalina	

Bilirrubina total e Fração HIV PCR	
Data (dd/mm/aaaa):	
ITB	4. Sim 5. Não 3. Sem dado
Data (dd/mm/aaaa):	
Resultado ITB	
Eco doppler arterial	4. Sim 5. Não 3. Sem dado
Data (dd/mm/aaaa):	
Resultado do eco doppler arterial	
Arteriografia	5. Sim 6. Não 3. Sem dado
Data (dd/mm/aaaa): Resultado:	
Fotografia da ferida:	
Medida da ferida:	
Descrição da ferida:	

APÊNDICE F - Questionário Aplicado aos Indivíduos Saudáveis (Controles)

Hospital Municipal Souza Aguiar - UERJ
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ENDOTELINA-1 EM PACIENTES COM DOENÇA ARTERIAL
OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE MEMBROS INFERIORES.

Dados Sócio Demográficos	
Nome:	
Prontuário LIP:	
Data da consulta:	
Endereço – Rua:	
Endereço – N°:	
Endereço – Complemento:	
Endereço – Bairro:	
Endereço – Cidade/UF:	
Endereço – CEP:	
Telefone – Residencial:	
Telefone – Celular:	
Telefone – Comercial:	
Data Nascimento:	
Idade:	
Peso:	
Altura:	
Gênero:	
Naturalidade:	
Etnia:	7. Branco 8. Negro 9. Pardo 4. Sem dado
Estado Civil:	5. Não casado 6. Casado 3. Sem dado
Escolaridade:	9. Analfabeto 10. Ensino Fundamental 11. Ensino Médio 12. Ensino Superior 5. Sem dado
Profissão:	
Critérios de Elegibilidade	
Doença Arterial Obstrutiva Periférica por ecodoppler, ITB e arteriografia	5. Sim 6. Não
Idade > 18 anos	5. Sim 6. Não
Concordância na participação do estudo e assinatura TCLE	5. Sim 6. Não
Anamnese	
Tempo de evolução da doença (em semanas)	
AIDS (critério de exclusão)	6. Sim 7. Não 3. Sem dado

Comorbidades 13. Diabetes 14. Colagenose 15. Insuficiência cardíaca (critério de exclusão) 16. Neoplasia 17. Cirrose hepática 18. Hipotireoidismo Outras (_____)	5. Sim 6. Não 3. Sem dado
Uso de medicamentos 13. Anti-hipertensivos 14. Hipoglicemiantes 15. AAS 16. Cilostazol 17. Sinvastatina 18. Outros (_____)	() Beta bloqueador () BRA () IECA () Bloqueador do canal de cálcio () Atensina () Diuréticos () Daonil () Metformin () Insulina NPH
Descrição de sintomas no diagnóstico:	
Tabagista Quantos maços por dia? (___)	1. Sim 2. Não
Etilista	1. Sim 2. Não

Exames complementares	
Ht	_____
Hb	_____
Leuco	_____
Plaquetas	_____
INR	_____
Relação PTT	_____
TAP	_____
Glicemia de jejum	_____
Hemoglobina glicosilada	_____
Proteínas totais	_____
Albumina	_____
LDH	_____
Colesterol	
Triglicerídeos	
HDL	
LDL	
TGO	
TGP	
Gama GT	
Fosfatase Alcalina	
Bilirrubina total e Fração	
HIV	
PCR	
Data (dd/mm/aaaa):	
ITB	6. Sim 7. Não 3. Sem dado

Data (dd/mm/aaaa):	
Resultado ITB	

ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética - HMSA

SECRETARIA MUNICIPAL DE
SAÚDE DO RIO DE
JANEIRO/SMS/ RJ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FATORES ENVOLVIDOS NA DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE MEMBROS INFERIORES ANTES E APÓS REVASCULARIZAÇÃO.

Pesquisador: Thaís Porto Amadeu

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54465916.8.0000.5279

Instituição Proponente: RIO DE JANEIRO SEC MUNICIPAL DE SAUDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.482.744

Apresentação do Projeto:

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) é causada por uma disfunção endotelial, associada à aterosclerose. A DAOP é uma doença com significância de acometimento local, morbidade sistêmica e alta mortalidade. Calcula-se que a prevalência mundial da doença seja de em torno de 15 a 20% na população acima de 55 anos, sendo a maioria dos casos assintomáticos. Os fatores de risco para DAOP são idade, sexo masculino, tabagismo, diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e hiperhomocisteinemia. A oclusão arterial aterosclerótica resulta em um reduzido fluxo sanguíneo para o membro inferior, portanto, durante o exercício físico há uma incapacidade de aumentar o fluxo para a demanda da musculatura, resultando em isquemia e dor. Com a progressão da doença, há um dano maior pela liberação de radicais livres, levando à dor de repouso, além de injúria tecidual, com aparecimento de úlceras e gangrena, que podem ser complicadas por infecção. O tratamento da DAOP

consiste na melhora da dor isquêmica, estímulo à deambulação, cicatrização de ferida e prevenção da perda do membro. A revascularização é uma excelente opção para sobrevivência do membro isquêmico e melhora da qualidade de vida do paciente. O resultado da abordagem endovascular com angioplastia transluminal percutânea com balão e/ou colocação de stent são afetadas pela localização da lesão e morfologia, podendo ocorrer reestenose e recorrência dos sintomas. A

Endereço: Rua Evaristo da Veiga, 16, Sobreloja

Bairro: Centro

CEP: 20.031-040

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2215-1485

E-mail: cepsms@rio.rj.gov.br

**SECRETARIA MUNICIPAL DE
SAÚDE DO RIO DE
JANEIRO/SMS/ RJ**



Continuação do Parecer: 1.482.744

cirurgia aberta é, geralmente, indicada para pacientes que não são candidatos ao procedimento cirúrgico endovascular. Há uma deterioração progressiva nos pacientes em 25% dos casos, com aproximadamente 5% necessitando de reintervenção, e 1 a 2% evoluindo para amputação. Alguns pacientes evoluirão para eventos cardiovasculares e ao óbito. O sucesso do tratamento torna-se limitado pela alta morbidade, com grande risco de perda de membro e o alto custo para o paciente e para o sistema de saúde. O endotélio orchestra as funções vasculares através da síntese e liberação de várias moléculas, tais como o óxido nítrico (NO) e a endotelina, às quais atuam na regulação do tônus vascular e da agregação plaquetária, adesão de monócitos, trombogênese, inflamação, metabolismo lipídico e remodelamento vascular. A disfunção endotelial é um processo sistêmico e um evento inicial na aterosclerose. Assim, alterações no balanço de substâncias derivadas do endotélio têm-se mostrado importantes na fisiopatologia da DAOP.

Objetivo da Pesquisa:

* Objetivo Primário:

- Avaliar os níveis séricos de endotelina-1 antes e após a revascularização de pacientes com doença vascular obstrutiva periférica de membros inferiores e sua correlação com a sua evolução clínica.

* Objetivos Secundários:

1. Avaliar os níveis circulantes de endotelina-1 e outros mediadores vasculares (tais como fator de crescimento endotelial vascular [VEGF], NO e angiotensina) em pacientes com doença vascular obstrutiva de membros inferiores, antes e após cirurgia de revascularização;
2. Comparar os níveis de endotelina-1 e dos mediadores vasculares a partir das técnicas cirúrgicas empregadas (bypass e angioplastia com ou sem stent);
3. Correlacionar os níveis de endotelina-1 e dos mediadores vasculares com os desfechos da cirurgia de revascularização através do monitoramento da evolução da ferida e da dor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

* Riscos:

- Possíveis problemas no pré- e pós-cirúrgico dos pacientes, bem como o óbito de algum paciente fará com que ele seja excluído do projeto.

* Benefícios:

Endereço: Rua Evaristo da Veiga, 16, Sobreloja

Bairro: Centro

CEP: 20.031-040

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2215-1485

E-mail: cepsms@rio.rj.gov.br

**SECRETARIA MUNICIPAL DE
SAÚDE DO RIO DE
JANEIRO/SMS/ RJ**



Continuação do Parecer: 1.482.744

- A identificação de um possível marcador de prognóstico que identifique a evolução clínica da DAOP em membros inferiores antes e após as cirurgias de revascularização podem impactar de maneira significativa a assistência aos pacientes com DAOP, já que poderá auxiliar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas adjuvantes à prática cirúrgica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória, estão satisfatórios.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Sr.(a) Pesquisador(a),

Atentamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata (item V.3., da Resolução CNS/MS N° 466/12).

O CEP/SMS-RJ deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS N° 466/12). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas a este CEP/SMS-RJ, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Acrescentamos que o sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (item IV.3 .d., da Resolução CNS/MS N° 466/12) e deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (item IV.5.d., da Resolução CNS/MS N° 466/12).

Ressaltamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar

Endereço: Rua Evaristo da Veiga, 16, Sobreloja

Bairro: Centro

CEP: 20.031-040

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2215-1485

E-mail: cepsms@rio.rj.gov.br

**SECRETARIA MUNICIPAL DE
SAÚDE DO RIO DE
JANEIRO/SMS/ RJ**



Continuação do Parecer: 1.482.744

da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_650892.pdf	25/01/2016 13:31:38		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Autorizacao.pdf	25/01/2016 13:14:40	Thais Porto Amadeu	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	25/01/2016 13:10:39	Thais Porto Amadeu	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_DAOP.pdf	11/01/2016 10:09:46	Thais Porto Amadeu	Aceito
Outros	ICD_DAOP.doc	11/01/2016 10:07:54	Thais Porto Amadeu	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_DAOP.doc	11/01/2016 09:58:40	Thais Porto Amadeu	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 07 de Abril de 2016

Assinado por:
Salesia Felipe de Oliveira
(Coordenador)

Endereço: Rua Evaristo da Veiga, 16, Sobreloja

Bairro: Centro

CEP: 20.031-040

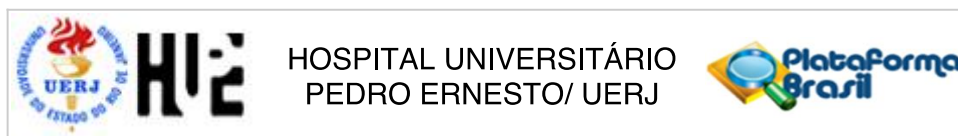
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2215-1485

E-mail: cepsms@rio.rj.gov.br

ANEXO B - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética - HUPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FATORES ENVOLVIDOS NA DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA DE MEMBROS INFERIORES ANTES E APÓS REVASCULARIZAÇÃO.

Pesquisador: Thaís Porto Amadeu

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54465916.8.3001.5259

Instituição Proponente: RIO DE JANEIRO SEC MUNICIPAL DE SAUDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

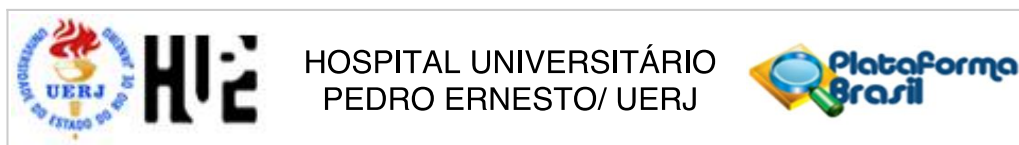
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.542.150

Apresentação do Projeto:

A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) constitui uma forma de aterosclerose e apresenta maior prevalência a partir da sexta ou sétima década de vida. Sendo assim, associa-se aos fatores de risco da aterosclerose e está relacionada à redução em dez anos na expectativa de vida devido às complicações coronarianas e cerebrovasculares. Os casos mais graves exigem intervenção cirúrgica para revascularização. Alguns pacientes não apresentam boa resposta a médio prazo e, conseqüentemente, pioram, acarretando na reinternação para nova revascularização ou amputação do membro. Esses eventos estão associados principalmente à disfunção endotelial, e um dos mediadores que parece estar envolvido é a endotelina - 1 (ET-1), uma molécula vasoconstrictora, de ação pró-inflamatória e proliferativa, que se tem mostrado elevada no plasma e no tecido em condições isquêmicas. Dados da literatura mostram a relação dos níveis aumentados de ET-1 com a isquemia pós-cirúrgica imediata, assim como sua relação com a falência de enxerto e reestenose, destacando assim o papel da ET-1 na hiperplasia intimal. Porém, a maioria dos estudos

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo	CEP: 20.551-030
Bairro: Vila Isabel	
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253	Fax: (21)2264-0853
	E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.542.150

avalia cirurgias em carótidas e coronárias, com pouca ênfase na DAOP. O presente projeto, então, se propõe a avaliar os níveis circulantes de ET-1 antes e após a revascularização por meio de um estudo longitudinal a ser realizado com 40 pacientes portadores de DAOP de membros inferiores, evidenciada por doppler vascular e arteriografia, acompanhados no Serviço de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital Municipal Souza Aguiar do Rio de Janeiro. Amostras de sangue periférico serão coletadas antes e após 1 hora, 2 semanas, 3 e 6 meses da revascularização. Os níveis circulantes de ET-1 serão detectados por ensaio imunoenzimático (ELISA). Além disso, pretendemos correlacionar os níveis de ET-1 nos diferentes momentos acessados, com os desfechos da cirurgia de revascularização através do monitoramento da evolução da ferida e da dor. A realização desse projeto justifica-se pela relevância do impacto da descompensação da DAOP, devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade, além da adaptação psicossocial e econômica dos pacientes amputados. Acreditamos que uma melhor compreensão da fisiopatologia da DAOP poderá auxiliar na identificação de marcadores prognósticos, assim como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas adjuvantes à prática cirúrgica.

Objetivo da Pesquisa:

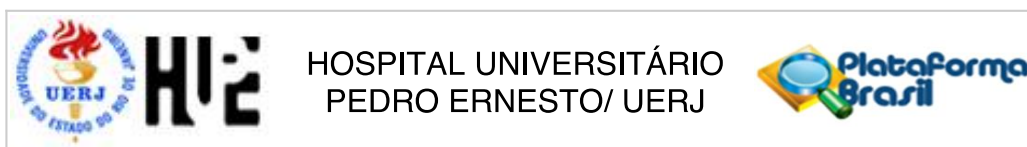
Objetivo Primário:

Avaliar os níveis séricos de endotelina-1 antes e após a revascularização de pacientes com doença vascular obstrutiva periférica de membros inferiores e sua correlação com a sua evolução clínica.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar os níveis circulantes de endotelina-1 e outros mediadores vasculares (tais como fator de crescimento endotelial vascular [VEGF], NO e angiotensina) em pacientes com doença vascular obstrutiva de membros inferiores, antes e após cirurgia de revascularização; 2. Comparar os níveis de endotelina-1 e dos mediadores vasculares a partir das técnicas cirúrgicas empregadas (bypass e angioplastia com ou sem stent); 3. Correlacionar os níveis de endotelina-1 e dos mediadores vasculares com os desfechos da cirurgia de

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.542.150

revascularização através do monitoramento da evolução da ferida e da dor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Possíveis problemas no pré- e pós-cirúrgico dos pacientes, bem como o óbito de algum paciente fará com que ele seja excluído do projeto.

Benefícios:

A identificação de um possível marcador de prognóstico que identifique a evolução clínica da DAOP em membros inferiores antes e após as cirurgias de revascularização podem impactar de maneira significativa a assistência aos pacientes com DAOP, já que poderá auxiliar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas adjuvantes à prática cirúrgica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para avanço do conhecimento e aplicação na prática clínica. A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em conformidade. Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos eminentes ao participante de pesquisa envolvido.

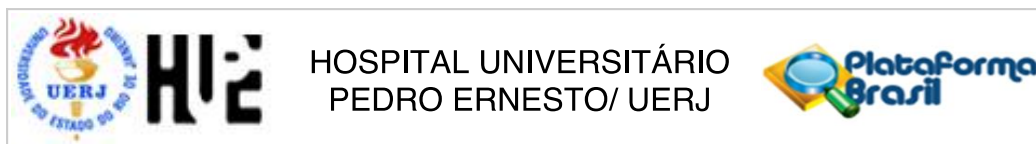
Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências. O projeto pode ser realizado da fora como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO. Para ter acesso ao PARECER CONSUBSTANCIADO: Clicar na "LUPA" (DETALHAR) - Ir em "DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA ", clicar na opção da ramificação (pequeno triangulo

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.542.150

no entrocamento do organograma) de pastas chamada – "Apreciação", e depois na Pasta chamada "Pareceres", o Parecer estará nesse local.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_650892.pdf	25/01/2016 13:31:38		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Autorizacao.pdf	25/01/2016 13:14:40	Thais Porto Amadeu	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	25/01/2016 13:10:39	Thais Porto Amadeu	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_DAOP.pdf	11/01/2016 10:09:46	Thais Porto Amadeu	Aceito
Outros	ICD_DAOP.doc	11/01/2016 10:07:54	Thais Porto Amadeu	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_DAOP.doc	11/01/2016 09:58:40	Thais Porto Amadeu	Aceito

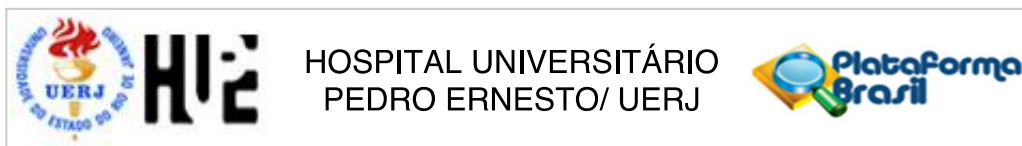
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 1.542.150

RIO DE JANEIRO, 12 de Maio de 2016

Assinado por:
DENIZAR VIANNA ARAÚJO
(Coordenador)

ANEXO C - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética - HFA

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GESTÃO HOSPITALAR NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL FEDERAL DO ANDARAÍ
CENTRO DE ESTUDOS, APERFEIÇOAMENTO E PESQUISA

Rio de Janeiro, 24 de agosto de 2016.

Memorando nº 120 /CEAP/HFA/RJ

À Chefia de Cirurgia Vascular
Dr Carlos Sassi

Assunto: **Autorização de pesquisa**

Termo de Autorização da Chefia

Solicito autorização para a realização, no Hospital do Andaraí, da pesquisa intitulada "Fatores Envolvidos na Doença Arterial Obstrutiva Periférica de Membros Inferiores Antes e Após Revascularização", de autoria da Dra Rosana Palma, com orientação da Prof. Drª Thais Porto Amadeu da UERJ.

Márcion J. Torres do Prado
Presidente do CEAP/HFA
Data: 27/08/16

Atenciosamente,

CEAP – Centro de Estudos Aperfeiçoamento e Pesquisa

Termo de Autorização da Chefia

Declaro que este serviço tem condições para o desenvolvimento do projeto em questão e autorizo sua execução.

Carlos Sassi
Chefia de Cir. Vascular
CR: 22.019.22.8

Chefia da Cirurgia Vascular

Rua Leopoldo, Nº 280 12º andar
Andaraí Rio de Janeiro
CEP: 20541-170
Tel Fax: (21) 2575-7002

MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GESTÃO HOSPITALAR NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL FEDERAL DO ANDARAÍ
CENTRO DE ESTUDOS, APERFEIÇOAMENTO E PESQUISA

007608/2016-31
Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2016.

Memorando nº 126 /CEAP/HFA/RJ

À Direção

Assunto: **Autorização de pesquisa**

Encaminho para apreciação e posterior autorização no que couber, da pesquisa intitulada **“Fatores Envolvidos na Doença Arterial Obstrutiva Periférica de Membros Inferiores Antes e Após Revascularização”**, de autoria da Dr^a Rosana Palma, com orientação da Prof. Dr^a Thais Porto Amadeu da UERJ. Informo que o mesmo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa sob o Parecer nº 1.482.744 e que há interesse do Dr^o Carlos Sassi, Chefe do Serviço de Cirurgia Vascular.

Atenciosamente,

Márcio Inácio do Prado
Diretor do CEAP - HFA

CEAP – Centro de Estudos Aperfeiçoamento e Pesquisa


Direção do Hospital Federal do Andaraí

Autorizo () Não Autorizo

Rua Leopoldo, Nº 280 12º andar
Andaraí Rio de Janeiro
CEP: 20541-170 Tel Fax: (21) 2575-7002