

**SILVESTRE SAVINO NETO**

**DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA :  
relação entre marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Orientador:** Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

**BELÉM**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**SILVESTRE SAVINO NETO****DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA :  
relação entre marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Área de concentração:** Biologia Celular

**Orientador:** Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento.

**BANCA EXAMINADORA :**

---

Orientador : Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento (UFPA)

---

Examinador : Prof. Dr. Guilherme Benjamin Brandão Pitta (UNCISAL)

---

Examinador : Prof.Dr. Luiz Carlos Lima da Silveira (UFPA)

---

Examinador : Prof. Dra. Maria da Conceição Nascimento Pinheiro (UFPA)

---

Examinador : Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma ( UFPA)

Aprovada em : 15 / 05 / 2009

Conceito : Aprovado

À Carol, minha esposa, pelo amor, dedicação e cumplicidade na construção de nossos ideais maiores: Beatriz, Thiago, Victor.

À minha mãe Arlena, meu pai Pascoal (in memoriam), pela educação recebida, transmitindo um legado de integridade, dedicação e de trabalho.

À minha família pela presença nos momentos importantes da minha vida.

Ao Prof. Dr. Irary Novah Moraes (in memoriam) dedico este trabalho como reconhecimento da sua importância na minha formação profissional e pessoal, reafirmando o compromisso de continuidade com os ideais, princípios e valores que nortearam os anos de profícua convivência.

Ao Prof. Dr. Joamel Bruno de Mello e Prof. Dr. Pedro Nahas ( in memoriam ) pelos ensinamentos recebidos durante minha formação profissional no Hospital Jaraguá-SP.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento, agradeço a oportunidade, a maneira amigável e atenciosa com que me recebeu e orientou durante todo este período;

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, em especial ao Prof. Luís Maués, cuja ajuda foi de grande importância na realização deste trabalho;

Ao Dr. Alberto Arruda do Amaral e a Dra. Isabella Pinheiro Costa do Amaral, diretores do Laboratório Amaral Costa, agradeço a amizade e a disponibilidade oferecida, que foi indispensável para realização de parte dos exames desta pesquisa;

À coordenação da Pós-Graduação, aos professores e funcionários;

Ao Prof. Dr. Manoel Ayres, agradeço os ensinamentos de Bioestatística, a sua amizade e fidalguia no meu acolhimento;

A Sra. Vilma Costa Bastos, bibliotecária do Instituto de Ciências da Saúde, agradeço a sua maneira atenciosa e profissional na revisão das normas de apresentação deste estudo;

Ao corpo clínico e de funcionários da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, em especial a equipe de enfermagem, representadas pelas enfermeiras Socorro Ruivo e Graça Tappenbeck;

Aos pacientes e voluntários que participaram deste estudo, meu muito obrigado;

Certamente um trabalho desta natureza teve um número de participantes anônimos, mas que tornaram possível a sua realização. A eles meus agradecimentos.

“O programa foi escrito no coração, o melhor papel, e com a vontade, a melhor das penas”.

Machado de Assis, 1883.

## RESUMO

O trabalho tem como objetivo estudar a resposta inflamatória, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial utilizando biomarcadores de risco da doença aterosclerótica em pacientes com doença vascular obstrutiva periférica (DAOP) dos membros inferiores. Foi realizado um estudo transversal, onde os níveis séricos dos biomarcadores inflamatórios e da coagulação (fibrinogênio, Proteína C Reativa ultrasensível e homocisteína), dos marcadores de estresse oxidativo (Glutaciona, Catalase e Superóxido Dismutase) e do nitrito como marcador de disfunção endotelial, foram dosados em 30 pacientes portadores de DAOP dos membros inferiores com idade entre 45 e 75 anos, divididos em dois grupos, o primeiro com doença em fase inicial ou intermediária (Fontaine IIa) e o segundo com doença em fase avançada (Fontaine IIb e III), além do grupo controle, sendo usado o teste de regressão linear para avaliação dos resultados. A avaliação dos resultados mostrou que os níveis plasmáticos da PCRus e do fibrinogênio estavam elevados nos dois grupos ( $p < 0,05$ ), os níveis plasmáticos da catalase, glutaciona e superóxido dismutase estavam diminuídos nos dois grupos ( $p < 0,05$ ), tendo a homocisteína apresentado  $p > 0,05$ , sendo observado relação de dependência entre os marcadores inflamatórios com os marcadores de estresse oxidativo e de disfunção endotelial. Na doença em fase inicial ou intermediária essa relação foi maior entre a PCRus e os três marcadores de estresse oxidativo, sendo a catalase a com maior relação, tendo  $R^2 = 41,68\%$ , seguida da superóxido dismutase com  $R^2 = 3,07\%$  e da glutaciona com  $R^2 = 2,57\%$ , apresentando um coeficiente de determinação final  $R^2 = 47,32\%$ . Também foi observado relação de dependência dos marcadores de estresse oxidativo com os marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial no grupo de DAOP inicial ou intermediária, verificando-se maior associação entre catalase e PCRus e glutaciona e PCRus, com coeficiente de determinação  $R^2 = 41,62\%$  e  $p = 0,0091$  e coeficiente de

determinação  $R^2 = 3,28\%$  e  $p = 0,039$  respectivamente, com coeficiente de determinação final  $R^2 = 44,90\%$ , demonstrando haver relação de dependência nas mesmas proporções entre inflamação e estresse oxidativo na fase inicial ou intermediária da DAOP. Quando observado os pacientes do Grupo B, o fibrinogênio apresentou relação de dependência com os três marcadores de estresse oxidativo, com  $R^2 = 37,34\%$ , a PCRus com coeficiente de determinação  $R^2 = 11,60\%$ , que somados apresentam um coeficiente de determinação de  $R^2 = 48,94\%$ , não se verificando relação de dependência entre estresse oxidativo e marcadores inflamatórios nesse grupo. A avaliação de dependência dos marcadores inflamatórios em relação aos de estresse oxidativo dos grupos A e B mostra um coeficiente de determinação  $R^2 = 96,32\%$ , enquanto que o marcadores de estresse oxidativo relacionados com os marcadores inflamatórios, apresentam um coeficiente de determinação  $R^2 = 44,90\%$ . Estes resultados mostram que os marcadores inflamatórios tiveram uma dependência de  $96,32\%$  em relação aos marcadores de estresse oxidativo, sugerindo que o estresse oxidativo predomina sobre a inflamação, corroborando para a hipótese de que o estresse oxidativo é o principal fator que desencadeia o processo inflamatório na patogênese da DAOP.

**Palavras-chave :** Biomarcadores. Estresse oxidativo. Doença vascular . Inflamação. Endotélio.

### ABSTRACT

This work has as objective to investigate the inflammatory response, the oxidative stress and the endothelial malfunction by using biomarkers of the arteriosclerotic disease risk in patients carrying obstructive peripheral vascular disease ( PVD) of the inferior limbs. This cross-sectional study where seric levels of the inflammatory biomarkers and coagulation (fibrinogen, C-Reactive Protein – us and homocistein), of the oxidative stress markers (Glutathione, Catalase and Superoxide Dismutase) and of the nitritum as a marker of the endothelial malfunction, have been dosed in 30 patients, bearers of the PVD of inferior limbs, aged between 45 and 75, distributed into two groups, the first group carrying the disease in its initial or intermediate phase (Fontaine I and IIa) and the second group in advanced phase (Fontaine IIb and III), besides the control group. The linear regression test was employed with the purpose of evaluating results. the CRPus and fibrinogen plasma levels showed an increased in both groups ( $p < 0.05$ ), the catalase, glutathione and superoxide dismutase plasma levels showed a decrease in both groups ( $p < 0.05$ ), the homocistein showed  $p > 0.05$ , and a dependence relation of the inflammatory markers, oxidative stress markers and the endothelial malfunction was observed. During the initial phase of the disease, this relation was more relevant between the CRPus and the three oxidative stress markers, being the catalase the one with more evident relation,  $R^2 = 41.68\%$ ; followed by the superoxide dismutase,  $R^2 = 3.07\%$  and the glutathione,  $R^2 = 2.57\%$ , presenting a final total coefficient of  $R^2 = 47.32\%$ ; a dependence relation was also observed among oxidative stress markers, the inflammatory markers and the endothelial malfunction in the PVD initial or intermediate group, and greater association among catalase, CRPus and glutathione was detected with determination coefficient of  $R^2 = 41.62\%$  and  $p = 0.0091$  and determination coefficient of  $R^2 = 3.28\%$  and  $p = 0.039$  respectively, with final determination coefficient of  $R^2 = 44.90\%$ ,

demonstrating an existing dependence relationship in equal proportions among inflammation and oxidative stress in PVD initial or intermediate phase. When Group B patients were assessed the results showed that fibrinogen holds a dependence relation with the three oxidative stress markers, with  $R^2 = 37.34\%$ , the CRP with determination coefficient of  $R^2 = 11.60\%$ , that reach up a determination coefficients of  $R^2 = 48.94\%$ . Dependence relation between oxidative stress and inflammatory markers was not observed in this group. The evaluation of inflammatory markers dependency when groups A and B oxidative stress markers were considered, they showed a coefficient of determination of  $R^2 = 96.32\%$ , whereas the oxidative stress markers in relation to the inflammatory markers present a determination coefficient of  $R^2 = 44.90\%$ . These results showed that the inflammatory markers had 96.32% dependency in relation to the oxidative stress, suggesting that the oxidative stress predominates over the inflammation. These results validate the hypothesis that oxidative stress is the main factor to start the inflammatory process in the PVD pathogenesis.

**Key words:** Biomarkers. Oxidative stress. Vascular disease. Inflammation. Endothelium.

### LISTA DE ABREVIATURAS

- (O<sup>2-</sup>) - ânion superóxido
- <sup>1</sup>O<sub>2</sub> - Oxigênio singlet
- ADP – adenosina difosfato
- AVC - acidente vascular cerebral
- CAT - catalase (CAT)
- CMLV - células do músculo liso vascular
- CO - monóxido de carbono
- DAOP - Doença Arterial Obstrutiva Periférica
- DAC - Doença aterosclerótica coronariana
- DCV - doenças cardiovasculares
- DM - Diabetes Melito
- ECA -enzima conversora da angiotensina
- ECE - enzima conversora de endotelina
- EDCFs - fatores constritores derivados do endotélio.
- EDHF - fator hiperpolarizante derivado do endotélio
- EDRFs - fatores relaxantes derivados do endotélio.
- ELAM - moléculas de adesão endotelial de leucócitos
- EROS - espécies reativas de oxigênio
- ET1 - endotelina
- Fg - fibrinogênio

- FGF -fator de crescimento básico do fibroblasto
- FGF- $\beta$  - fator de transformação de crescimento- $\beta$
- G6PD - glicose-6-fosfato desidrogenase
- GPx - glutathiona peroxidase
- GSH - glutathiona
- GSH-Rd - glutathiona-redutase
- GSSG - glutathiona oxidada
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio
- HDL – lipoproteínas de alta densidade
- He - Homocisteína
- HHe - hiperhomocisteinemia
- HO<sub>2</sub><sup>·</sup> - radical hidroperoxila
- ICAM - molécula de adesão intercelular
- I-likeGF - fator de crescimento semelhante a insulina
- IRC - Insuficiência Renal Crônica
- ITB - índice de pressão tornozelo-braço
- JUPITER -Justification for the use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin
- LDL – lipoproteínas de baixa densidade
- MCP-1( monocyte chemoattractant protein)
- MLV - músculo liso vascular
- NADPH - nicotinamida adenina dinucleotideo- fosfato oxidase
- NADPH - nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida
- NO - óxido nítrico .
- OH – radical hidroxila
- 8-OHdG - 8-Hydroxy-2-deoxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)
- ONOO- peroxinitrito
- PCRus - Proteína C Reativa Ultrassensível
- PDGF - fator de crescimento das plaquetas (PDGF),
- PECAM - molécula de adesão plaquetária endotelial

- PGH2 - endoperóxidos
- PGI2 - prostaciclina
- SOD - superóxido dismutase
- TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$
- TXA2 - tromboxano
- VCAM - molécula de adesão de células vasculares
- VLDL- lipoproteínas de densidade muito baixa
- TGB $\beta$  - (fator de crescimento tecidual)
- FTC- $\beta$  ( fator de transformação de crescimento)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1	GERAL .....	20
2.2	ESPECÍFICOS.....	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
3.1	ENDOTÉLIO.....	21
3.2	TEORIAS DA ARTERIOSCLEROSE.....	27
<b>3.2.1</b>	<b>Hipótese da resposta à lesão.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Hipótese oxidativa1.....</b>	<b>28</b>
3.3	DESEQUILÍBRIO REDOX , RESPOSTA VASCULAR À LESÃO E ARTERIOSCLEROSE.....	29
3.4	RADICAL LIVRE.....	30
<b>3.4.1</b>	<b>Radical superóxido.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Radical hidroperoxila.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Radical hidroxila.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Peróxido de hidrogênio.....</b>	<b>31</b>

<b>3.4.5</b>	<b>Oxigênio singlet.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.6</b>	<b>Características dos radicais livres.....</b>	<b>32</b>
3.5	ANTIOXIDANTES.....	33
<b>3.5.1</b>	<b>Enzimas antioxidantes.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.1.1</b>	<b>Glutationa-redutase.....</b>	<b>35</b>
3.5.1.2	Glatitiona-peroxidase.....	35
3.5.1.3	Catalase.....	36
3.5.1.4	Superóxido dismutase.....	36
<b>3.5.2</b>	<b>Sistema antioxidante não enzimático.....</b>	<b>36</b>
3.5.2.1	Glutationa.....	36
3.6	ESTRESSE OXIDATIVO.....	37
3.7	DETECÇÃO LABORATORIAL DAS LESÕES OXIDATIVAS.....	44
3.8	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA...	44
<b>3.8.1</b>	<b>Fatores de risco conhecidos.....</b>	<b>45</b>
3.8.1.1	Idade avançada.....	45
3.8.1.2	Tabagismo.....	45
3.8.1.3	Diabetes Melito.....	45
3.8.1.4	Hiperlipidemia.....	46
3.8.1.5	Hipertensão Arterial.....	46
<b>3.8.2</b>	<b>Fatores de risco emergentes.....</b>	<b>47</b>
3.8.2.1	Raça e etnia.....	47
3.8.2.2	Genéticos.....	47
3.8.2.2	Insuficiência Renal Crônica.....	47
3.8.2.4	Inflamação.....	48
3.8.2.5	Estados de Hipercoagulabilidade.....	48
3.9	NOVOS MARCADORES DE RISCO PARA A DOENÇA VASCULAR DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DE HACKAM E ANAUD (2003).....	51
<b>3.9.1</b>	<b>Marcadores inflamatórios de risco para doença cardiovascular.....</b>	<b>52</b>
3.9.1.1	Proteína C Reativa (PCR).....	52
3.9.1.2	Efeitos da Proteína C Reativa na	52

Arteriosclerose.....	
<b>3.9.2 Marcadores de inflamação, hemostasia e de trombose de risco cardiovascular.....</b>	<b>60</b>
3.9.2.1 O fibrinogênio (Fg), fator 1 da Coagulação.....	60
<b>3.9.3 Outros marcadores de risco cardiovascular(coagulação).....</b>	<b>63</b>
3.9.3.1 A Homocisteína.....	63
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODO.....</b>	<b>66</b>
4.1 TIPO DE ESTUDO.....	66
4.2 AMOSTRA.....	66
4.3 PROCESSO DE SELEÇÃO.....	66
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	67
4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	67
4.6 PROCEDIMENTOS.....	67
<b>4.6.1 Técnica de mensuração do índice tornozelo-braquial.....</b>	<b>67</b>
<b>4.6.2 Coleta do Material.....</b>	<b>68</b>
<b>4.6.3 Dosagem da proteína C reativa ultrasensível.....</b>	<b>68</b>
<b>4.6.4 Dosagem do fibrinogênio.....</b>	<b>69</b>
<b>4.6.5 Dosagem de homocisteína.....</b>	<b>69</b>
<b>4.6.6 Dosagem da atividade da enzima catalase.....</b>	<b>69</b>
<b>4.6.7 Dosagem da atividade da enzima superóxido dismutase.....</b>	<b>69</b>
<b>4.6.8 Dosagem de glutathiona.....</b>	<b>69</b>
<b>4.6.9 Dosagem de nitrito.....</b>	<b>69</b>
4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	70
4.8 ASPECTOS ÉTICOS.....	70
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>110</b>
<b>APÊNDICES</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular é a principal causa de morte e incapacidade que mais cresce no mundo e estima-se que até 2020 supere as doenças infecciosas nesse quesito. A doença coronariana, cérebro-vascular e arterial periférica correspondem às principais manifestações da arteriosclerose, tendo alcançado um grande progresso no diagnóstico, prevenção e tratamento nos últimos trinta anos (HACKAM; ANAND, 2003). Representam a maior causa de morte em países ocidentais e no Brasil, são responsáveis pela morte de 300 mil pessoas/ano e correspondem a 16% dos gastos do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2008).

Um dos mais importantes avanços na epidemiologia da doença foi a identificação dos fatores de risco para a doença cardiovascular, através de estudos prospectivos como o de Framingham, onde a hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo e o diabetes melito foram identificados como os mais importantes fatores de risco clássicos da doença (KANNEL ; MCGEE, 1985). A partir desses avanços, o conhecimento da arteriosclerose evoluiu drasticamente com o crescimento da biologia vascular (ALEXANDER ; DZAU , 2000).

O estudo pioneiro de Furchgott e Zawadzki (1980) demonstrou que a célula endotelial controla o tônus vascular, a coagulação, a trombólise, a remodelação vascular, a resposta inflamatória e imune provocando alterações funcionais adaptativas através da liberação de várias substâncias com atividades pró e anticoagulantes, capazes de promover a adesão de moléculas e com ações vasoativas. A homeostase vascular é o resultado da regulação dinâmica dessas funções, sendo o óxido nítrico (NO) a principal substância anti-aterogênica.

O óxido nítrico (NO) é produzido na célula endotelial vascular a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido-nítrico-sintase (NOs). Além da sua ação vasodilatadora, o NO inibe a adesão e a agregação plaquetária, impede a proliferação do músculo liso vascular, limita o recrutamento vascular de leucócitos e inibe a produção do fator tecidual que é um determinante crítico na geração do trombo. Enquanto o NO é a principal substância vasodilatadora liberada pelo endotélio, a endotelina 1 (ET1) age contrariamente ao NO, tendo um efeito vasoconstritor, além de aumentar a atividade central e periférica do sistema nervoso simpático, de possuir ação natriurética e de estimular o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Na presença de fatores inflamatórios e dos fatores de risco cardiovascular mais frequentes, há perda da ação protetora do endotélio, com aumento da propensão à vasoconstrição, trombose, inflamação e proliferação celular na parede do vaso. Assim, a perda da atividade biológica do NO é denominada de disfunção endotelial (FÖRSTERMANN; MÜNDEL, 2006).

A geração de radicais livres é o processo final de lesão celular da maioria dos fatores de risco cardiovasculares, sendo denominado de estresse oxidativo. Ocorre um estresse oxidativo quando os mecanismos de defesa vascular são esgotados por excesso de produção de radicais livres ou não são eficientes para tamponar o efeito destas espécies. Pode ser prevenido ou sofrer reparo por intervenções que bloqueiam vias metabólicas da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) ou que simulam ou multiplicam os efeitos dos mecanismos de defesa fisiológicos. No interstício vascular, as altas concentrações da superóxido dismutase (SOD) sugerem um papel defensivo (STRALIN; KARLSSON; JOHANSSON, 1995).

Não está claro se todo estresse oxidativo vascular é acompanhado, necessariamente de disfunção do relaxamento dependente do endotélio. O estresse oxidativo vascular leva à

inativação do óxido nítrico de origem endotelial e é um importante fator de disfunção endotelial na arteriosclerose. A modificação oxidativa da LDL (lipoproteína de baixa densidade) é a primeira teoria consistente de aterogênese a unificar os componentes celulares e lipídicos na placa de ateroma. Na lesão vascular o estresse oxidativo ocorre como parte da resposta vascular à lesão e parece estar envolvido nas fases iniciais como mediador do programa gênico de reparação. Há evidências que sugerem que a atividade enzimática da nicotinamida adenina dinucleotídeo- fosfato (NADPH) oxidase vascular é um dos principais mecanismos produtores de superóxido na resposta de reparação vascular na arteriosclerose (LAURINDO, 2003).

A produção de EROS é usualmente um processo enzimático, estimulado por agonistas específicos, cujos níveis estão anormais em condições patológicas. O radical superóxido, uma das principais EROS de interesse biológico, reage de modo rápido e favorável com o NO, inibindo sua bioatividade e gerando espécies reativas oxidantes secundárias, como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um potente oxidante capaz de oxidar moléculas de LDL, causar disfunção vascular e nitrificar os resíduos de tirosina das proteínas. O equilíbrio interativo entre estas moléculas é determinante da função celular, por meio da regulação de proteínas específicas e lipídeos. Desta forma, a disfunção endotelial decorrente da ação dos radicais livres pode ser resumida como uma disfunção da sinalização redox vascular, ou seja, uma transdução de sinais celulares mediada por reações de transferência de elétrons, envolvendo radicais livres, que são intermediários dotados da existência independente e que apresentam um elétron desemparelhado na última camada (HAMILTON et al. 2004).

A produção excessiva de EROS ou uma diminuição das defesas antioxidantes leva à toxicidade celular por mecanismos de desequilíbrio na sinalização das células vasculares, com as EROS agindo como segundo mensageiro intracelular, ou pela toxicidade química direta das EROS pela alta reatividade destas espécies contra todos os componentes químicos celulares, que pode danificar o DNA e levar à apoptose. Uma das principais vias finais do estresse oxidativo é a perda da bioatividade do NO, com conseqüente redução da capacidade vasodilatadora dependente do endotélio. A perda da atividade biológica do NO denominada de disfunção endotelial, pode ser o evento desencadeante da doença arteriosclerótica em humanos (LOSCALZO, 2003).

Atualmente, um dos assuntos mais debatidos sobre a doença cardiovascular é se a proteína C-reativa (PCR), um componente da resposta inflamatória de fase aguda, é ou não um fator causal na patogênese da arteriosclerose. Caso seja, as implicações poderiam ser de longo alcance e incluiriam novas abordagens para a prevenção e tratamento do infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (SCIRICA; MORROW, 2006; PEPYS; HIRSCHFIELD; TENNENT, 2006). O grande apoio para o papel da PCR na patogênese da arteriosclerose vem em grande parte de estudos epidemiológicos que observaram uma associação entre níveis elevados no plasma de PCR e eventos cardiovasculares (SCIRICA; MORROW, 2006; DANESH; WHEELER; HIRSCHFIELD, 2004; RIDKER, 2007). A força do teste estatístico de tais associações é pelo menos tão robusto quanto a dos fatores de risco estabelecidos como hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia (RIDKER, 2007). Porém, a estatística não determina causalidade, os questionamentos sobre a PCR decorrem do fato de que a mesma poderá estar elevada em outros grupos de fatores de risco cardiovasculares múltiplos, como fumo, hipertensão, obesidade, falta de atividade física e baixo estado sócio-econômico (EVERETT et al. 2006 ).

Ben-Yehuda (2007) faz críticas ao uso da PCRus como marcador de risco da doença cardiovascular citando vários estudos como o de Wang et al. (2006); Khera et al. (2006); Sattar et al. (2007), nos quais a dosagem da PCRus mostra resultados modestos quando comparados com fatores de risco tradicionais. Questiona que diante desses resultados divergentes, como podemos fazer uso dessa literatura, se há uma explicação biológica ou de metodologia para essa variabilidade. Entretanto, apesar da divergência de publicações não se pode excluir a possibilidade da arteriosclerose ativar a elevação dos níveis de PCRus (SCHUNKERT; SAMANI, 2008).

A arteriosclerose pode ser considerada como uma doença inflamatória crônica do sistema arterial, com implicações clínicas importantes, sendo que somente cerca de 50% dos pacientes apresentam hiperlipidemia, que é o objetivo principal do tratamento preventivo, fazendo com que exista um grande interesse na identificação do papel na patogênese da DAOP. A proteína C-reativa ultrasensível (PCRus) e o fibrinogênio são marcadores plasmáticos não específicos da fase aguda da inflamação e o seu estudo tem tido um interesse especial durante os últimos anos por várias razões. Estas razões incluem o papel direto e o seu potencial na patogênese e progressão da doença e o seu uso como marcadores para monitorar tratamentos potenciais.

Entretanto, ainda não foi estabelecido por quais mecanismos que os níveis elevados de PCRus e fibrinogênio na fase aguda da inflamação estão envolvidos na geração, desenvolvimento e gravidade da DAOP. Um dos possíveis mecanismos pelos quais a inflamação levaria à ocorrência da DAOP poderia ser por alteração das propriedades funcionais do endotélio, ativando uma série de mudanças relacionadas diretamente ao começo, progressão e gravidade clínica da arteriosclerose (DE HARO et al. 2008).

Atualmente, estuda-se a doença arteriosclerótica não apenas como decorrência de acúmulo de lipídeos nas paredes dos vasos, mas também como consequência da disfunção endotelial e da ativação do sistema inflamatório, estresse oxidativo e alterações da coagulabilidade (MALLIKA; GOSWAMI; RAJAPPA, 2007).

Muitos indivíduos desenvolvem doença cardiovascular na ausência de anormalidades no perfil de lipoproteínas. Por isso, a viabilidade de se efetivar tratamentos para a prevenção de doenças cardiovasculares e seus desfechos negativos, traduz-se em uma necessidade imperativa de identificar indivíduos de baixo, médio e alto risco, dentro de uma determinada população para a aplicação de intervenções eficazes, antes dos problemas manifestarem-se. Esta nova idéia a respeito do conhecimento da patogênese da arteriosclerose levanta questionamentos e abre oportunidades na prevenção e terapia desta doença. Portanto, o entendimento da biologia básica da inflamação, do estresse oxidativo e da disfunção endotelial na arteriosclerose proporcionaria um melhor suporte clínico que poderia alterar o caminho da prática da medicina preventiva e propiciar benefícios para a saúde pública.

Neste estudo utilizaremos como base as dosagens séricas de proteína C reativa ultrasensível (PCRus), fibrinogênio e homocisteína como marcadores inflamatórios e da coagulação em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica dos membros inferiores, pois representam um grupo de exames laboratoriais disponíveis no exercício da atividade clínica. Para avaliação do estresse oxidativo serão dosadas a catalase e superóxido dismutase representando o mecanismo de defesa antioxidante enzimático e a glutatona o não enzimático, e o óxido nítrico para disfunção endotelial através do seu metabólito nitrito.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Estudar a resposta inflamatória, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial utilizando biomarcadores de risco da doença arteriosclerótica em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) dos membros inferiores.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- a)** Investigar a existência de relação entre os biomarcadores inflamatórios, da coagulação, do estresse oxidativo e de disfunção endotelial com os fatores de risco tradicionais da doença arterial obstrutiva periférica dos membros inferiores;

- b) Investigar a existência de relação entre os biomarcadores inflamatórios e da coagulação com os marcadores de estresse oxidativo e de disfunção endotelial, em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica dos membros inferiores;
- c) Avaliar se há relação entre os marcadores de inflamação, da coagulação, do estresse oxidativo e da disfunção endotelial, conforme o grau e evolução da DAOP;

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 ENDOTÉLIO**

O organismo necessita de suprimento adequado de sangue para os tecidos e para que isso ocorra depende do endotélio íntegro e funcional. O endotélio recobre todos os vasos do organismo, desde o coração, artérias de grande, médio e pequeno calibre, até arteríolas e capilares, além de toda rede venosa e vasos linfáticos (NASCIMENTO; PATRIARCA; HEIMANN, 2003).

As artérias conduzem o sangue e regulam o bombeamento do coração, permitindo uma perfusão sanguínea para nutrição celular. Os capilares desempenham um papel importante no

transporte de substâncias, nutrição celular e remoção de produtos do metabolismo celular, tendo pouca importância na regulação do tônus vascular devido a falta de elementos musculares na sua parede. A célula endotelial controla o tônus vascular, a coagulação, a trombólise, a remodelação vascular e a resposta inflamatória e imune (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

O endotélio íntegro forma uma extensa rede de proteção entre os componentes do sangue e os tecidos, permitindo a sua fluidez, evitando a sua coagulação, requerendo para isso a manutenção da sua integridade. Quando ocorre perda da sua continuidade, tentam refazer suas conexões intercelulares, como o que observamos nos implantes de vasos sintéticos, onde as células endoteliais replicam e migram, recobrando toda a superfície vascular novamente. A célula endotelial, através de sua extensa rede de transmissão de informações, detecta alterações da pressão arterial, fluxo sanguíneo, balanço oxidativo, coagulação, sinal de inflamação e ativação do sistema imune (NASCIMENTO; PATRIARCA; HEIMANN, 2003).

O endotélio é uma monocamada de epitélio pavimentoso, podendo ser considerado um órgão endócrino ativo em resposta a estímulos humorais, neurais e mecânicos. As substâncias vasoativas produzidas são denominadas como fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCFs). O óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO) são EDRFs e a endotelina (ET1), produtos da ciclooxigenase como endoperóxidos (PGH<sub>2</sub>), tromboxano (TXA<sub>2</sub>), espécies reativas de oxigênio (EROS) como o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) são EDCFs (DIEDRICH et al. 1990). São liberados também pelo endotélio interleucinas, fatores de crescimento, inibidores de plasminogênio e fator de Von Willebrand (SCHIEFFER et al. 1997).

O óxido nítrico desempenha um papel protetor dos vasos sanguíneos através do estímulo fisiológico da força de arraste e a tensão de cisalhamento (shear stress) exercida pelo fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais, levando a produção basal de NO, mantendo o vaso em um estado de constante vasodilatação (REINHARDT et al. 1996). A função do endotélio não se restringe apenas a regulação do tônus vascular, estendendo-se ainda à regulação da proliferação e

migração de células do músculo liso vascular e adesão de leucócitos. Exerce potente efeito anti-aterogênico prevenindo a adesão e agregação plaquetária (ZAKHARY et al. 1996).

A disfunção endotelial relacionada à produção diminuída de NO e aumentada de ET1 parece estar envolvida na maioria dos fatores de risco cardiovasculares (SADER; CELERMAJER, 2001).

As substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio são o óxido nítrico que é o mais potente agente vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária, da coagulação e da proliferação celular; a bradicinina, um vasodilatador dependente da ação do óxido nítrico; a prostaciclina, produzida através da ação da ciclooxigenase sobre o ácido araquidônico, sendo também um potente inibidor da agregação plaquetária; a serotonina e a histamina que atuam em receptores específicos, promovendo a vasodilatação através do AMPc e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio ( EDHF ) ao qual acredita-se ser um produto da via ciclooxigenase, promovendo a abertura dos canais de potássio, fechamento dos canais de cálcio, hiperpolarização da célula do músculo liso vascular e o seu relaxamento (NASCIMENTO; PATRIARCA; HEIMANN, 2003).

As substâncias vasoconstritoras produzidas pelo endotélio compreendem o sistema renina-angiotensina que é composto pela renina, angiotensinogênio, enzima conversora da angiotensina (ECA) que medeia a conversão da angiotensina I em angiotensina II e o receptor da angiotensina II. No músculo liso vascular foram identificados dois tipos de receptor da angiotensina II, os receptores ATI e ATII. Os receptores ATI provocam vasoconstrição e produção de ânion superóxido através da NAD(P)H oxidase, enquanto o ATII causa vasodilatação mediada pelo endotélio através do óxido nítrico. O óxido nítrico diminui a atividade da ECA (SIRAGY; CAREY, 1997).

A enzima conversora de endotelina (ECE) converte a endotelina inativa em ativa ligando-se aos receptores A ou B no músculo liso causando vasoconstrição. A ativação do receptor tipo A provoca vasoconstrição e proliferação de células do músculo liso vascular e síntese de angiotensina II e esta pode estimular a produção de endotelina. A angiotensina II e a endotelina

são os mais potentes estimuladores de proliferação celular. A endotelina se apresenta sob a forma de três isoformas, ET1, ET2, ET3. Na membrana plasmática da célula endotelial foi identificada a enzima ECE-1 que pode ser inibida pelo ânion superóxido, porém não sendo inibida pelo NO. Este efeito pode funcionar como um gatilho biológico para evitar a vasoconstrição intensa que poderia ser causada pelos dois agentes vasoconstritores (LOPEZ-ONGIL, 2000).

A angiotensina II, o fator de crescimento tecidual (TGF $\beta$ ) e o LDL (lipoproteínas de baixa densidade) podem estimular a síntese de endotelina, participando ativamente na fisiopatologia da arteriosclerose. A angiotensina II estimula a vasoconstrição, a liberação de endotelina e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). As espécies reativas de oxigênio oxidadas (EROx) estimulam a proliferação celular e podem aumentar o efeito proliferativo e vasoconstritor da angiotensina II através da inativação do agente anti-proliferativo e vasodilatador óxido nítrico. As EROx produzidos pela célula endotelial, podem permanecer dentro da célula e inativar o NO, lesar cadeias enzimáticas, proteínas, LDL e membrana celular ( KUNUSCH; MEDFORD, 1999).

O Tromboxano A<sub>2</sub>, serotonina (no endotélio lesado), ácido aracdônico, prostaglandina H<sub>2</sub>, trombina e a nicotina possuem ação vasoconstritora. O fator de crescimento das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento básico do fibroblasto(FGF), o fator de crescimento semelhante a insulina (I-likeGF), angiotensina II, endotelina e o ânion superóxido são ativadores do crescimento das células do músculo liso vascular (CMLV) liberado pelo endotélio (NASCIMENTO; PATRIARCA; HEIMANN, 2003).

A angiotensina II estimula a proliferação de células do músculo liso vascular (MLV) através da ativação da ATI ou pela produção de ânio superóxido ou pela inativação de óxido nítrico. O endotélio também produz substâncias inibidores do crescimento das células musculares lisas vascular e neste grupos se incluem o óxido nítrico, um potente agente antiproliferativo, prostaciclina, bradicinina, sulfato de heparina e o FTC- $\beta$ . (NASCIMENTO; PATRIARCA; HEIMANN, 2003).

O endotélio libera moléculas de adesão com a finalidade de evitar a ruptura da integridade vascular durante o processo inflamatório, sendo constituídas pela molécula de adesão intercelular (ICAM), molécula de adesão de células vasculares (VCAM) e moléculas de adesão endotelial de leucócitos (ELAM). Regulam a migração linfocitária e a interação entre as células ativadas e a resposta imunológica. Os leucócitos, monócitos e linfócitos circulam como células não aderentes, mas para que o sistema imune atue de forma efetiva, tornam-se aderentes para poder cruzar a barreira endotelial. O óxido nítrico é o principal modulador das moléculas de adesão (NASCIMENTO; PATRIARCA; HEIMANN, 2003).

O processo arteriosclerótico ocorre em parte a partir da infiltração de células da circulação sanguínea para locais específicos do endotélio. A compreensão desses mecanismos permite entender como uma resposta inflamatória sistêmica pode trazer conseqüências locais sobre placas de arteriosclerose responsáveis pelas manifestações clínicas da doença vascular periférica. Essa nova classe de moléculas chamadas de moléculas de adesão, desempenham seu papel através da mediação entre as diversas células envolvidas no processo inflamatório vascular, participam de processos como migração celular, sinalização e aderência, estando presentes em diversas células como plaquetas, monócitos e células musculares lisas. A interrupção de muitas dessas interações celulares já apresentam aplicações na prática clínica limitando e até interrompendo o desenvolvimento de placas arterioscleróticas, reduzindo sua lenta evolução bem como suas rupturas agudas (SERRANO JUNIOR; FERNANDES; LUZ, 2003).

As moléculas de adesão, de acordo com sua estrutura e função, podem ser divididos em três grupos: integrinas, selectinas e a super família de imunoglobulinas (SERRANO JUNIOR; FERNANDES; LUZ, 2003).

As Integrinas são heterodímeros que compreendem uma unidade  $\alpha$  e  $\beta$  ligadas não covalentemente. A combinação entre as diversas unidades  $\alpha$  e  $\beta$  formam os diversos tipos de integrinas existentes. As unidades  $\beta$  dividem as integrinas em três subfamílias principais; as integrinas  $\beta 1$  que correspondem às moléculas de aparecimento tardio (very late appearing antigen, VLA), que aparecem em linfócitos após a estimulação mitogênica; as integrinas  $\beta 2$  que constituem as moléculas associadas a linfócitos, sendo a principal a LFA-1 (Leukocyte Function-

Associated Antigen-1) e as integrinas  $\beta 3$  ou citoadesinas que formam as integrinas de plaquetas, constituindo a glicoproteína IIb/IIIa e o receptor de vitronectina (SERRANO JUNIOR; FERNANDES; LUZ, 2003).

As integrinas  $\beta 1$  são responsáveis pela adesão celular à proteínas de matriz extracelular, as  $\beta 2$  são encontradas exclusivamente em leucócitos e interagem com fibrinogênio e moléculas de imunoglobulinas e as  $\beta 3$ , encontradas em plaquetas, são passíveis de ativação e responsáveis pela agregação plaquetária através da adesão com o fibrinogênio, a fibronectina e o fator de Von Willebrand (SERRANO JUNIOR; FERNANDES; LUZ, 2003).

As Selectinas são proteínas que se ligam a sítios comuns de carboidratos cuja função principal é a de promover a migração de leucócitos para diversos tecidos, em especial o endotélio. Dividi-se em três grupos, a L-selectina (CD62L), a E-selectina (CD62E) e a P-selectina (CD62P), sendo que a primeira se expressa apenas em leucócitos e as demais no endotélio, tendo todas a mesma função de regulação da interação leucócito-endotélio. Realizam o início da adesão de leucócitos ao endotélio em função de suas propriedades de ligação de baixo grau de aderência e rápida ativação e desativação, permitindo o rolamento de leucócitos sobre o endotélio (SERRANO JUNIOR; FERNANDES; LUZ, 2003).

A Superfamília de Imunoglobulinas têm como função principal o reconhecimento das integrinas presentes nos leucócitos e plaquetas, além da transdução de sinais intercelulares. Os principais componentes desse grupo são as moléculas de adesão vascular-1 (VCAM1), molécula de adesão intercelular-1 e -2 (ICAM-1 e ICAM-2) e a molécula de adesão plaquetária endotelial (PECAM) (SERRANO JUNIOR; FERNANDES; LUZ, 2003).

A interação entre o endotélio, células inflamatórias e as plaquetas ocorre de acordo com os seguintes mecanismos (SERRANO JUNIOR; FERNANDES; LUZ, 2003):

**Interação Leucócito-Endotélio:** os leucócitos se aderem, inicialmente, ao endotélio se agarrando e rolando em sua superfície para uma posterior fixação e migração entre as células endoteliais para sua localização definitiva no espaço subendotelial.

**Rolamento Celular no Endotélio:** a adesão leucocitária ocorre através das selectinas, tendo sua velocidade reduzida na circulação, entrando em contato próximo com o endotélio. A L-selectina faz com que os leucócitos aderidos se liguem a outros leucócitos circulantes, perpetuando a resposta inflamatória. A E-selectina estimula a produção de macrófagos e de citocinas pelo endotélio. A P-selectina faz com que as plaquetas participem da reação formando um conglomerado inicial frouxamente ligado ao endotélio, em uma resposta inflamatória, imunológica e hemostática e com interações entre diversos tipos de célula.

**Ativação de Leucócitos:** a redução da velocidade expõe essas células a fatores locais, como quimiocinas e citocinas que promovam a expressão nessas células das integrinas  $\beta 2$  para uma fixação mais definitiva.

**Fixação dos Leucócitos ao Endotélio:** inicia-se o processo de ligação entre integrinas de leucócitos com membros da super família de imunoglobulinas ICAM- 1, ICAM-2 e VCAM-1 expressos na célula endotelial. Os leucócitos se fixam ao endotélio e iniciam sua migração final. O fibrinogênio funciona também como um receptor ICAM-1, sendo possível que atue como uma via de adesão entre o endotélio e os leucócitos.

**Migração de Leucócitos:** ocorre pela migração das células ativadas e aderidas através das junções intercelulares do endotélio por mecanismo de reorientação de posicionamento das integrinas ou participação de outros sinais indutores como o PECAM, e a partir desse ponto os leucócitos migram pela matriz extracelular guiados pela expressão de quimiocinas nos tecidos.

**Interação Plaquetas-Endotélio:** as plaquetas circulantes não aderem ao endotélio íntegro devido a ação da prostaciclina e do óxido nítrico. Na disfunção endotelial a sua aderência ocorre de forma semelhante aos leucócitos. A primeira forma de aderência de plaquetas se dá através da

interação do complexo de glicoproteínas Ib-IX-V com moléculas de Von Willebrand ou fibrinogênio presentes na célula endotelial. As plaquetas são estimuladas por fatores como a adenosina difosfato (ADP), epinefrina e colágeno, posteriormente ocorre ativação da integrina, via final de ativação plaquetária. Essa integrina ativada se liga ao fibrinogênio, outras plaquetas e à molécula de Von Willebrand formando agregados plaquetários no local. Com o estímulo da trombina, que transforma fibrinogênio em fibrina, as plaquetas contraem fortalecendo ainda mais sua fixação ao endotélio.

O endotélio também libera fatores trombolíticos como o ativador tecido-específico do plasminogênio, trombomodulina e ativador do inibidor do Plasminogênio. O fator tecidual ativador do plasminogênio facilita a fibrinólise, sendo também estimulado pela bradicinina e óxido nítrico. O inibidor do ativador de fibrinogênio provoca a formação de trombos intravasculares e é estimulado pela angiotensina II e pela endotelina. O endotélio libera a trombomodulina que modula a formação do trombo intravascular, sendo o óxido nítrico um potente inibidor da trombogênese. O endotélio deve ser interpretado como um sensor biológico integrado, capaz de detectar o menor sinal de inflamação ou ativação de resposta imune ou agressão sistêmica através de estímulo mecânico, biofísico ou metabólico como ocorre no diabetes, hipertensão arterial, arteriosclerose, tabagismo, dislipidemia, hiperinsulinemia, senilidade, processando a informação e respondendo de forma localizada ou global para corrigir a alteração e manter a integridade do vaso sanguíneo (NASCIMENTO; PATRIARCA; HEIMANN, 2003).

### 3.2 TEORIAS DA ARTERIOSCLEROSE

Mallika, Goswami e Rajappa (2007) em estudo de revisão descrevem as duas principais hipóteses para o desenvolvimento da doença.

#### **3.2.1 Hipótese da resposta à lesão**

Nesta hipótese o endotélio ajuda a regular a homeostase do sistema cardiovascular. Esta proposta é apoiada no fato de que o endotélio íntegro é capaz de libertar fatores antitrombóticos e fibrinolíticos, além de um potente vasodilatador que é o óxido nítrico (NO). Em vasos sanguíneos normais, o óxido nítrico e a acetilcolina induzem vasodilatação, mas com o dano do endotélio, ocorre alteração dessa função. O endotélio lesado causa respostas anormais da acetilcolina, aumentando a produção de agentes vasoconstritores como o tromboxane A<sub>2</sub> e da prostaglandina, além disso desenvolvem mecanismos de sinalização intracelular anormais que aumentam o cálcio intracelular e de fatores vasoconstritores derivados do endotélio (FLEMING, 2003).

A lesão endotelial ativa a adesão e agregação plaquetária no local do dano, favorecendo a entrada de monócitos na íntima, e a proliferação da camada média da parede arterial. Este efeito causa um abaulamento na parede arterial local, com aumento da invasão de monócitos, podendo haver progressivamente uma redução da luz arterial. Esta combinação de alterações bioquímicas e anatômicas contribui para o estresse oxidativo e aumento do dano vascular, sendo consideradas precursoras das alterações aterogênicas da parede arterial (FLEMING, 2003).

### **3.2.2 Hipótese oxidativa**

A condição prévia para a captação de macrófago e acumulação celular de colesterol é a modificação oxidativa das lipoproteínas de baixo-densidade (LDL). A iniciação do processo de oxidação é induzido pela geração intracelular de lipoperoxidases que é transferido ao LDL pelo desenvolvimento de radicais livres, superóxidos. Estas espécies iniciam uma série de reações químicas que são chamadas de peroxidação lipídica. Estas reações químicas são mantidas pela conversão de lecitina à liso-lecitina, catalisado pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub>. A peroxidação lipídica contribui para a destruição dos componentes de lipídio da membrana plasmática e aumenta a liberação de ácidos gordurosos por fragmentação ácida gordurosa e pela formação das espécies reativas intermediárias, como as lipoperoxidases. Estas subjagam LDL e são geradas continuamente por íons de Cu<sup>2+</sup> junto com radicais peroxis. As lipoperoxidases são tóxicas para a membrana plasmática e também combinam com a apolipoproteína B (apo B) e fosfolípidos para impedir que o LDL se ligue ao seu receptor. O LDL pode sofrer acetilação a uma forma oxidada que não pode então se ligar com receptores nativos. O LDL oxidado (Ox-

LDL) contém liso-fosfatidilcolina que é um quimiotáxico potente para macrófagos. A liso-fosfatidilcolina regula a expressão das moléculas de adesão das células vasculares como a molécula de adesão intercelular -1 (ICAM- 1) que está presente dentro do endotélio e aumenta a adesão de monócitos. O LDL oxidado fagocitado, inibe a motilidade dos monócitos. Os macrófagos que contêm o LDL fagocitado, são chamados de células espumosas, devido a aparência de lipídeos na microscopia (SCHOEN, 1996).

### 3.3. DESEQUILÍBRIO REDOX, RESPOSTA VASCULAR À LESÃO E ARTERIOSCLEROSE

Na disfunção endotelial, há evidências da participação das espécies reativas de oxigênio (EROS) na sinalização do crescimento, proliferação, senescência e apoptose, caracterizando uma disfunção redox. Estas descobertas são importantes para o melhor conhecimento da fisiopatologia da arteriosclerose, vasculopatia diabética, hipertensiva e re-estenose pós angioplastia. A teoria oxidativa da arteriosclerose ampliou o papel fisiopatológico dos radicais livres (LAURINDO, 2003).

As EROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), a hidroperoxila ( $HO_2^-$ ), a hidroxila ( $OH^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Normalmente, a redução completa do  $O_2$  ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROS é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (COHEN, 1989). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. As EROS e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema

pró e antioxidante com predomínio dos oxidantes, com dano consequente (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

### 3.4 RADICAL LIVRE

O conceito de radical livre está relacionado com o equilíbrio redox, que se caracteriza pelo balanço de reações de transferência de elétrons. Radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, ocorrendo um desemparelhamento, podendo doar este elétron, atividade redutora ou retirar um elétron de outra substância, atividade oxidante. Verifica-se que os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução. Vários elementos químicos podem centrar radicais livres, porém o oxigênio por questões de natureza química tem propensão para formar radicais livres de importância biológica, como o radical superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH^-$ ). O termo espécies reativas de oxigênio (EROS) é usado para designar radicais livres e intermediários relacionados, como por exemplo o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que não é um radical livre, mas participa frequentemente da produção dos mesmos (LAURINDO, 2003).

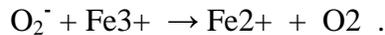
A reatividade de um radical livre é o principal determinante de seus efeitos e de sua toxicidade, resultando ao mesmo tempo de fatores termodinâmico (tendência espontânea de ocorrer a reação) e cinético (velocidade com que a reação ocorre) (GROW; ISCHIROPOULOS, 2001). Os principais radicais livres são:

#### 3.4.1 Radical superóxido ( $O_2^-$ )

O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de  $O_2^-$ , seja enzimático, fagocítico ou químico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Gerado continuamente por diversos processos celulares (cadeia de transporte de elétrons

na mitocôndria, no microsomo, através de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase), ou pela redução monoelétrica de  $O_2$ . Rapidamente desaparece em solução aquosa por reação de dismutação:

$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . Em solução aquosa é um forte agente redutor. Sua habilidade em reduzir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  pode acelerar a reação de Fenton:



Em solução aquosa é um oxidante fraco, porém pode formar ERN:

$O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$ . É permeável a membranas, em fagócitos como neutrófilos e macrófagos é um dos microbicidas mais importantes (GOULART et al. 2007).

### 3.4.2 Radical hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ )

Representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

### 3.4.3 Radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ )

É considerada a EROS mais reativa em sistemas biológicos e o mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa. A combinação extremamente rápida do  $OH^{\cdot}$  com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Assim, se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. Além disso, o radical hidroxila pode inativar várias proteínas ao oxidar seus grupos sulfidrilas ( $-SH$ ) a pontes dissulfeto ( $-SS$ ). Também, pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, a peroxidação lipídica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

### 3.4.4 Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o  $H_2O_2$  é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação

que produz o  $\text{OH}^\cdot$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao  $\text{Fe}^{++5}$ . É um intermediário formado pela reação de dismutação do  $\text{O}_2^\cdot$  catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) pela redução de 2 elétrons na molécula do  $\text{O}_2^\cdot$  e pela ação de diversas enzimas oxidases in vivo, localizadas nos peroxissomas. É muito difusível dentro e entre as células in vivo. É um fraco agente oxidante e um fraco agente redutor, reage lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas. Na presença de metal de transição gera  $\cdot\text{OH}$ , através da reação de Fenton  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$ . Assim, é altamente tóxico para as células (GOULART et al. 2007).

### 3.4.5 Oxigênio singlet ( $^1\text{O}_2$ )

Não é um radical, mas a forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. É um estado eletronicamente excitado do oxigênio, produzido por reações fotoquímicas ou por outras radiações; reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana, iniciando processos de peroxidação. O  $^1\text{O}_2$  tem significado biológico possível, mas não comprovado (GOULART et al. 2007).

Embora as EROS possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra a infecção, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir o microorganismo. Contudo, poderão ocorrer vários eventos nosológicos se houver estímulo exagerado na produção dessas espécies, e a ele estiver associada a uma falha da defesa antioxidante (GOULART et al. 2007).

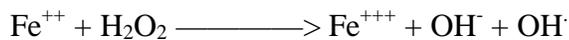
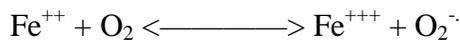
### 3.4.6 Características dos radicais livres

- Possibilidade de formar produtos tóxicos a partir de radicais pouco reativos: o radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) e o óxido nítrico (NO) podem gerar o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que é uma espécie reativa nitrogenada extremamente lesiva ao endotélio e está envolvido na fisiopatologia da arteriosclerose (AUGUSTO et al. 2002).

- Possibilidade de reações em cadeias: Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. Assim como na formação das EROS, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (HERSHKO, 1989).

- Interação com íons metálicos: O estudo sobre os mecanismos de lesão oxidativa tem, progressivamente, confirmado a ação catalítica dos metais nas reações que levam a estas lesões. O papel dos metais na formação *in vitro* das EROS é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss. Embora o cobre possa também catalisar a reação de Haber-Weiss, o ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomolécula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Como pode ser observado a seguir, nas reações de Fenton e de Haber-Weiss são formados diferentes tipos de EROS:

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:

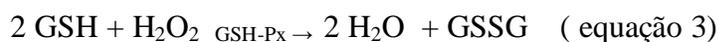
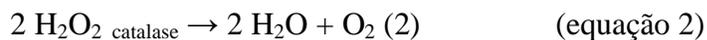
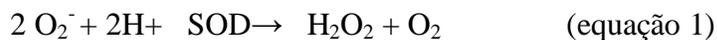


A combinação das reações de Fenton e Haber Weiss é considerada um dos principais mecanismos geradores de radicais hidroxila, sendo este um potente oxidante.

### 3.5 ANTIOXIDANTES

O termo é utilizado quando um composto em baixa concentração relativa a um substrato oxidável, retarda ou impede a oxidação do mesmo (LAURINDO, 2003).

O sistema de defesa antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$  (Equação 1), a catalase (CAT) que atua na decomposição de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$  (Equação 2) e a glutatona peroxidase (GSH-Px), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização da glutatona como co-fator (Equação 3). O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutatona (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e  $\beta$ -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Os metais de transição são potenciais formadores de espécies reativas através da reação com outros compostos, uma vez que sofrem reações redox. Decorre, daí, a necessidade de serem transportados associados a proteínas, impedindo que essas reações ocorram.



Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutatona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutatona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutatona-redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros.

Com exceção da vitamina E (-tocoferol) que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes estão no meio intracelular (HEBBEL, 1986). O sistema antioxidante enzimático e a glutatona estão presentes, predominantemente, no meio intracelular, daí a utilização do eritrócito para sua análise. Por outro lado, o sistema antioxidante não enzimático localiza-se, principalmente, no meio extracelular, sendo por isso analisado em plasma e soro (GOULART, 2007).

### **3.5.1 Enzimas antioxidantes**

#### **3.5.1.1 Glutationa-redutase (GSH-Rd)**

Após exposição da glutatona (GSH) ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a glutatona oxidada (GSSG). A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT; MC LEAN, 1990). Habitualmente, a reserva intracelular de GSH-Rd é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos. A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses. Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GSH-Rd. É a enzima necessária para manter a glutatona em sua forma reduzida e, possivelmente, para controlar o estado redox de NADPH em tecidos onde GSSG está disponível. A recuperação de GSH por GSH-Rd é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, pois, baixas concentrações de GSH estão associadas ao estresse oxidativo (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

#### **3.5.1.2 Glutationa-peroxidase (GSH-Px)**

A GSH-Px catalisa a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG. Apresenta-se sob 4 formas: GSHPx 1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GSHPx 2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GSHPx 3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em

mamíferos, e a GSHPx 4 que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo também, o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA (CZUCZEIK, 2003). A família de GSHPx integra o grupo de selenoproteínas que tem em seu sítio ativo o selênio (Se), obtido da dieta ligado à metionina em alimentos de origem animal (selenometionina) e ligado à cisteína em alimentos de origem vegetal (selenocisteína). O Se é reconhecidamente um nutriente antioxidante, com recomendações de obtenção na dieta considerando sua atividade antioxidante e nutricional (AMAYA-FARFAN; DOMENE; PADOVANI, 2001).

#### 3.5.1.3 Catalase (CAT)

A catalase cujo sítio ativo contém o grupo heme, está enclausurada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, fonte de peróxidos orgânicos, produtos carbonílicos e oxigênio singlete. A catalase é, também, encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (GOULART et al. 2007). A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ . Sua atividade é dependente de NADPH e a suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo  $H_2O_2$  em eritrócitos humanos normais (SCOTT, 1991). Em modelo de estresse oxidativo decorrente de agressão térmica, os eritrócitos exibem diminuição da atividade da catalase durante o processo hemolítico termodependente (HATHERILL; TILL; WARD, 1991).

#### 3.5.1.4 Superóxido dismutase (SOD)

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria. Esta enzima também tem papel antioxidante já que catalisa a dismutação do radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , na presença do próton  $H^+$  (CHARYA et al., 1991).

### 3.5.2 Sistema antioxidante não enzimático

Relaciona-se a um grupo de antioxidantes que podem ser agrupados em compostos produzidos *in vivo*, como é o caso da glutathiona, da ubiquinona e do ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta tais como vitaminas E, C,  $\beta$ -caroteno e outros.

#### 3.5.2.1 Glutathiona

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo (*L*- $\gamma$ -glutamil-*L*-cisteinilglicina) que exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua função como cofator da família de enzimas glutathiona peroxidases (GSHPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutathiona (GSSG). É um tampão redox sulfidrílico que mantém os resíduos cisteinila da hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito, no estado reduzido. A GSH é o único tiol não proteico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de EROS. A falha nesta função resulta na formação de meta-hemoglobina e consequente incapacidade do eritrócito em transportar oxigênio, além de causar uma variação na forma do eritrócito, impedindo sua passagem para órgãos vitais (ALVES; MACEDO; KUBOTA, 2003).

Além dos antioxidantes citados, a vitamina E confere proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um importante antioxidante lipofílico, mas esta função poderá estar limitada em situações de sobrecarga de ferro. O caroteno interage com as EROS, especialmente quando ocorrem baixas tensões de  $O_2$ , enquanto que a vitamina E se mostra mais eficiente quando há altas tensões de  $O_2$  no meio. A vitamina C, ou ascorbato, é um antioxidante hidrossolúvel que pode neutralizar diretamente as EROS, porém pode funcionar como pró-oxidante quando em dose elevada, ou quando exposta a metal, levando à lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Ao lado dos antioxidantes vitamínicos disponíveis em medicamentos, destacam-se também os derivados tióis, entre eles a N-acetilcisteína e mercaptopropionilglicina (MGP). Tais derivados são antioxidantes sintéticos que contêm o grupo -SH em sua composição. A capacidade antioxidante da N-acetilcisteína foi demonstrada pela melhora da complacência pulmonar, mas

não da sobrevivência de pacientes com síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) que receberam a droga endovenosa (KOLLEF; SHUSTER, 1995).

### 3.6 ESTRESSE OXIDATIVO

Ocorre um estresse oxidativo quando os mecanismos de defesa vascular são esgotados por excesso de produção de radicais livres ou não são eficientes para tamponar o efeito destas espécies. Pode ser prevenido ou reparado por intervenções que bloqueiam vias metabólicas de geração de EROS ou que simulam ou multiplicam os efeitos de mecanismos de defesa fisiológicos. No interstício vascular, as altas concentrações da superóxido dismutase (SOD) sugerem um papel defensivo (STRALIN, 1995).

Em vasos, o rápido consumo do óxido nítrico (NO) pelo radical superóxido ( $O_2^-$ ), leva a disfunção do relaxamento dependente do endotélio que é um marcador sensível de estresse oxidativo vascular. Não está claro se todo estresse oxidativo vascular é acompanhado, necessariamente de disfunção do relaxamento dependente do endotélio. O estresse oxidativo vascular leva à inativação do óxido nítrico de origem endotelial e é um importante fator de disfunção endotelial na arteriosclerose. A modificação oxidativa da LDL é a primeira teoria consistente de aterogênese a unificar os componentes celulares e lipídicos na placa de ateroma. Na lesão vascular o estresse oxidativo ocorre como parte da resposta vascular à lesão e parece estar envolvido nas fases iniciais como mediador do programa gênico de reparação. Há evidências que sugerem que a atividade enzimática da NADPH oxidase vascular é um dos principais mecanismos produtores de superóxido na resposta de reparação vascular na arteriosclerose (LAURINDO, 2003).

Brevetti et al. (2003) estudaram pacientes com DAOP relacionando disfunção endotelial com fatores clássicos cardiovasculares, fatores inflamatórios e gravidade da DAOP. A casuística teve 88 pacientes portadores de DAOP com ITB < 0,90 e 30 do grupo controle. A função endotelial foi mensurada pela medida da dilatação da artéria braquial (MDAB), a inflamação pelos níveis séricos de PCRus e fibrinogênio e a gravidade da DAOP pelo ITB. Para análise estatística dos resultados foi utilizada análise multivariada que mostrou associação da PCRus, fibrinogênio e ITB com MDAB menor que 6.2% não ocorrendo relação com fatores de risco clássicos. Um Segundo modelo que incluiu PCR, fibrinogênio e ITB, teve todas essas três

variáveis relacionadas independentemente com MDAB menor que 6.2%. Concluíram que a inflamação e a gravidade da doença obstrutiva estão implicadas na fisiopatologia e disfunção endotelial da DAOP.

Harrison et al. (2003) relatam que fatores de risco da arteriosclerose aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) pelo endotélio, músculo liso vascular e células adventícias. As EROS iniciam o processo da arteriosclerose envolvendo importantes sistemas enzimáticos como xantina oxidase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) e óxido nítrico sintase. Forças físicas regulam a produção de EROS e cortes oscilatórios presentes nos sítios de desenvolvimento da arteriosclerose estimulam a produção de superóxidos, sinalizando a cascata de ativação da NADPH oxidase pela angiotensina II. O estresse oxidativo em pacientes com doença da artéria coronária é aumentado pela redução da superóxido dismutase, normalmente uma importante enzima de proteção contra os ânion superóxido.

Jandrić-Balen et al. (2003) estudaram a atividade dos mecanismos de defesa antioxidantes em 211 pacientes, dividindo-os em 4 grupos : pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) e Diabetes Melito (DM), Pacientes com DAOP e sem DM, pacientes sem DAOP e com DM e pacientes sem DAOP e sem DM. Os resultados observados no grupo com DAOP e sem DM e no grupo sem DAOP e com DM mostraram que a atividade da Glutathione e catalase estiveram significativamente diminuídas, enquanto que a da superóxido dismutase estava elevada. Não se observou diferença estatística entre os grupos com DAOP e DM e entre sem DAOP e com DM. Também não se observou diferença estatística entre grupos com DAOP e sem DM e o grupo sem DAOP e sem DM. O estudo conclui que foi observado diferença estatística significativa dos mecanismos de defesa antioxidantes entre pacientes diabéticos e não diabéticos, o que não ocorreu na DAOP.

Loscalzo (2003) menciona que as espécies reativas de oxigênio (EROS) são produtos normais do metabolismo celular oxidativo. Bioquimicamente os radicais livres ativos derivam de moléculas de oxigênio servindo como um sinalizador normal para as moléculas na parede vascular. Entretanto, o seu excesso ocorre na presença de fatores de risco cardiovascular ou na

arteriosclerose estabelecida. O estresse oxidativo que as espécies reativas de oxigênio causam, promovem disfunção endotelial, lesão celular vascular, oxidação de lipoproteínas, acelerando a aterotrombose. As enzimas antioxidantes são importantes em limitar o estresse oxidativo vascular e incluem a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glicose-6-fosfato desidrogenase.

Jeremy e Angeline (2004) citam que o ânion superóxido é a chave dos fatores de risco para a doença cardiovascular, incluindo aterogênese, injúria de reperfusão, re-estenoses de angioplastia e falências de enxertos vasculares. Reage com óxido nítrico (NO) formando o peroxidonitrito (ONOO-) resultando na depleção endógena vascular de NO, o qual está associada com doença cardiovascular. Os fatores de risco cardiovasculares como diabetes, dislipidemia e hiperhomocisteinemia estão relacionados com estresse oxidativo.

Rajasekhar et al. (2004) realizaram um estudo de caso-controle em 139 pacientes com doença arteriosclerótica coronariana submetidos a angiografia, com idade entre 29-75 anos e 59 pessoas da população local sem doença coronariana com idade entre 29-72 anos do grupo controle. Foram dosados colesterol, LDL, HDL, VLDL, triglicerídeos, glutatona peroxidase e superóxido dismutase séricos. A Vitamina A e E foram medidas utilizando método de cromatografia líquida (HPLC). Na análise estatística foi empregada uma Regressão Binária tendo como resultado níveis significantes elevados de colesterol total, LDL, quando comparados com baixos níveis de HDL no grupo controle. Não se observou diferença significativa nos níveis de atividade das enzimas glutatona e superóxido dismutase entre pacientes e grupo controle.

Abramson et al. (2005) mencionam que o aumento do marcador inflamatório (PCRus) está associado com risco elevado para a doença coronariana e que as causas desta elevação não estão ainda esclarecidas e, que alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo pode ter um efeito pró-inflamação, mas até a presente data a relação entre estresse oxidativo e PCR em pessoas doentes é escassa. Fizeram um estudo com 126 pessoas adultas com doença coronariana e como marcadores de estresse oxidativo utilizaram o teste de radicais livres (FORT), que reflete o nível orgânico de hidroperóxidos e o potencial redox da glutatona (GSH/GSSG). Utilizando um modelo de Regressão Linear, o FORT foi associado positivamente com PCR, e em contraste a

Glutathione mostrou pequena associação com PCR. Concluem que adultos sem doença coronariana, o estresse oxidativo está significativamente associado com PCR quando mensurados pelo FORT, sugerindo que o estresse oxidativo pode ser um determinante da elevação dos níveis da PCR promovendo um processo inflamatório pró-arteriosclerótico nos estágios iniciais do desenvolvimento da doença coronariana.

Ashfaq et al. (2006) baseados na hipótese de que o estresse oxidativo é um importante fator no início da doença vascular, investigaram a relação entre marcadores de estresse oxidativo e arteriosclerose em fase inicial. Foram selecionados 140 pessoas não fumantes, sem doença arteriosclerótica manifestada clinicamente, no qual foi medido a espessura da camada íntima e média da carótida através de ultrassom *doppler*. O estresse oxidativo foi estimado pela mensuração dos níveis séricos de glutathione (GSH /GSSG) e cisteína (Cys /CySS). Concluíram que glutathione reduzida (GSH/GSSG), mede in vivo o estresse oxidativo, sendo um preditor de risco independente na presença da arteriosclerose inicial, e que estes achados dão suporte para o papel do estresse oxidativo na patogênese da arteriosclerose e que esta mensuração pode ajudar na identificação precoce de pacientes assintomáticos.

Heistad (2006) ressalta que o estresse oxidativo desenvolve um papel chave na fisiopatologia das doenças cardiovasculares graves. Na arteriosclerose, hipertensão, diabetes, acidente vascular cerebral os radicais superóxidos estão aumentados nos vasos sanguíneos, prejudicando a função vasomotora do endotélio, presumivelmente causada em grande parte pela inativação do óxido nítrico por superóxidos. A disfunção endotelial é um risco preditivo cardiovascular e provavelmente a chave da fisiopatologia da arteriosclerose e suas complicações. Enzimas antioxidantes, especialmente as três isoformas da superóxido dismutase (SOD) modulam os níveis de superóxido, protegendo contra a disfunção vasomotora. Finaliza, comentando que muitas respostas para questões relacionadas ao estresse oxidativo e arteriosclerose permanecem sem ser esclarecidas, propiciando uma área extensa para pesquisa.

Pipinos et al. (2006) referem que a função mitocondrial está alterada em pacientes com doença arterial periférica e pode contribuir para suas manifestações clínicas. Estudaram o músculo gastrocnêmio obtidos de pacientes com doença arterial periféricas (n = 25) e controles (n = 16). Nos pacientes com DAOP foi demonstrado reduções significantes nas atividades

enzimáticas e respiração mitocondrial quando comparadas ao controle, observando-se aumento significativo da peroxidação lipídica. As atividades das enzimas antioxidante estavam alteradas, com uma diminuição significativa da atividade da superóxido dismutase e aumento significativo da catalase e glutatona peroxidase. Concluem que a doença arterial periférica está associada com alteração da função mitocondrial e evidência de estresse oxidativo.

Singh e Jialal (2006) mencionam que as doenças cardiovasculares são as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental, sendo que esta incidência vem aumentando nos países em desenvolvimento. Novas evidências dão suporte para o papel do estresse oxidativo na arteriosclerose, indicando maior produção crônica e aguda de espécies reativas de oxigênio (EROS) que estão relacionadas as condições fisiopatológicas do desenvolvimento das doenças cardiovasculares. As EROS mediam vários caminhos que levam a inflamação vascular na arteriosclerose, desde a formação das estrias gordurosas até a progressão da lesão e rotura da placa. Modelos animais de estresse oxidativo dão suporte para noção de que as EROS tem um papel causal na arteriosclerose.

Dohi et al. (2007) relatam que a inflamação e o estresse oxidativo estão implicados na patogênese da arteriosclerose e baseando-se nesta linha de pesquisa fizeram um estudo com o objetivo de avaliar as inter-relações entre inflamação (PCRus), estresse oxidativo (8-isoprostane) e fatores de risco cardiovasculares tradicionais em 551 pacientes com idade de 53 +/- 11 anos, sendo 400 do sexo masculino e 151 feminino. Como resultado tiveram a PCR positivamente correlacionada com idade, sexo masculino, índice de massa corporal, pressão sanguínea, hábito de fumar, creatinina, ácido úrico, triglicérides, índice de resistência a insulina e 8-isoprostane. O 8-isoprostane teve correlação positiva com idade, hábito de fumar, pressão de pulso e PCR. Na análise por Regressão Múltipla o índice de massa corporal ( $r = 0,177$ ), HDL ( $r = 0,162$ ), ácido úrico ( $r = 0,141$ ), e 8-isoprostane ( $r = 0,097$ ) estavam independentemente correlacionados com a PCR ( $p < 0,001$ ), enquanto que o fumo ( $r = 0,341$ ), idade ( $r = 0,217$ ), e pressão de pulso ( $r = 0,091$ ) estavam independentemente correlacionados com 8-isoprostane ( $p < 0,001$ ). Concluem que os níveis de PCR estão associados não somente com os fatores de risco cardiovasculares, mas também com o estresse oxidativo, havendo inter-relação significativa entre inflamação, estresse oxidativo e fatores de risco cardiovasculares tradicionais.

Kotur-Stevuljevic et al. (2007) relatam que o estresse oxidativo e a inflamação são condições importantes para serem classificados como novos fatores de risco para a DAC. Nesse estudo avaliaram a relação entre estresse oxidativo e inflamação, utilizando como parâmetros o malonaldeído (MDA), ânio superóxido, atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) como marcadores de estresse oxidativo e da PCR e fibrinogênio como marcadores inflamatórios, além do perfil lipídico. Os pacientes foram divididos em 3 grupos : O primeiro composto por 188 pacientes com DAC submetidos a angiografia apresentando oclusão >50% em pelo menos uma artéria coronária, o segundo grupo com 47 pacientes com oclusão menor de 50% e o terceiro com 197 pacientes sem DAC do grupo controle. Os resultados mostraram que a concentração plasmática de MDA e anion superóxido estavam significativamente elevados em combinação com a diminuição significativa da SOD no grupo com DAC em relação ao controle. Na análise estatística utilizaram a regressão múltipla stepwise, tendo o fibrinogenio e a PCR mostrado correlação independente com o MDA. A regressão binária indicou que o MDA e o ânio superóxido estavam significamente associados com o desenvolvimento da DAC, concluindo que a relação entre parâmetros de estresse oxidativo e inflamatórios sugerem um grande envolvimento mútuo no desenvolvimento da arteriosclerose, pelo menos na progressão da DAC.

Loffredo et al. (2007) investigaram a existência de relação entre a medida da dilatação da artéria braquial, óxido nítrico e estresse oxidativo em pacientes com DAOP. A disfunção endotelial foi mensurada pela medida da dilatação da artéria braquial e pela dosagem sérica de nitrito/nitrato (NOx), e do 8-Hydroxy-2-deoxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) como marcador de estresse oxidativo em 25 pacientes com DAOP e 40 do grupo controle. Comparado com o grupo controle os pacientes DAOP tiveram uma medida da dilatação da artéria braquial menor (  $p < 0,001$ ); aumento do estresse oxidativo demonstrado pela elevação dos níveis séricos de 8-OHdG (  $p < 0,001$ ), e redução sérica do óxido nítrico reduzido ( NOx) (  $p < 0,001$ ). A análise por regressão linear simples mostrou que o NO estava correlacionado com a medida da dilatação da artéria braquial (  $r = 0,45$ ;  $p = 0,02$ ) e 8-OHdG (  $r = 0,672$ ;  $p < 0,001$ ).

Förstermann (2008) relata que as células endoteliais controlam a homeóstase vascular gerando fatores que regulam o tonos vascular, inibe a função das plaquetas, previne a adesão de

leucócito e limita a proliferação do músculo liso vascular. O fator dominante responsável por muitos desses efeitos é o óxido nítrico derivado do endotélio (NO). A deficiência orgânica endotelial causada por inativação aumentada ou síntese reduzida de NO, só ou em combinação, é visto junto como fatores de risco para doença cardiovascular. A disfunção endotelial pode promover vaso-espasmo, trombose, inflamação vascular e proliferação intimal. O estresse oxidativo vascular aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio contribuindo para os mecanismos de disfunção vascular. O estresse oxidativo é causado, principalmente, por um desequilíbrio entre a atividade endógena de enzimas pró-oxidantes ( NADPH oxidase, xantino oxidase e cadeia mitocondrial respiratória) e enzimas antioxidantes ( superóxido dismutase, glutathione peroxidase , heme oxigenase , catalase ). Além disso, antioxidantes de pequeno-peso molecular poderiam ter um papel na defesa contra o estresse oxidativo e concentrações aumentadas de espécies reativas de oxigênio reduzem a bioatividade do NO por inativação química, formando peroxinitrito tóxico que em troca pode desacoplar a NO sintase endotelial gerando radicais superóxido, que vão contribuir para o estresse oxidativo.

### 3.7 DETECÇÃO LABORATORIAL DAS LESÕES OXIDATIVAS

Os métodos mais utilizados para aferição indireta das EROS e, conseqüentemente, das lesões oxidativas são os espectrofotométricos e cromatométricos, que medem a atividade enzimática (SOD, catalase, GSH-Px e GSH-Rd) e/ou a concentração de tripeptídeos (GSH, GSSG) e aldeídos (MDA). Estas medidas podem ser realizadas em tecidos, sangue e outros fluidos. A lipoperoxidação de membranas é habitualmente monitorada pelo método do MDA (malonaldeído) e o estresse oxidativo, por dosagens de GSH e GSSG e/ou pelo cálculo da razão GSSG/GSH.

### 3.8 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA ( DAOP)

A Doença Arterial Obstrutiva Periférica (DAOP) tem por definição a arteriosclerose que acomete a aorta e seus ramos. Apresenta uma prevalência de 10 a 25% na população acima de 55 anos, sendo que aumenta com a idade, e cerca de 70 a 80% dos pacientes acometidos com a doença são assintomáticos e apenas a minoria requer tratamento cirúrgico ou amputações (NORMAN; EIKELBOOM; HANKEY, 2004).

Pacientes com DAOP tem risco aumentado de morte por doença cardiovascular, como acometimento coronariano e cerebrovascular. Em 10 anos, este risco aumenta quatro vezes quando comparado com pacientes sem DAOP (NORMAN; EIKELBOOM; HANKEY, 2004).

O índice de pressão tornozelo-braço (ITB) é um método simples, não invasivo para o diagnóstico da patologia, sendo considerado doentes os pacientes que apresentam valores menores que 0.9. O índice tornozelo-braquial menor que 0.9 é um preditor de risco para morbidade e mortalidade coronariana e cerebrovascular, pois metade dos pacientes com DAOP tem sintomas dessas doenças (NORMAN; EIKELBOOM; HANKEY, 2004).

Os fatores de risco para a doença são divididos em dois grupos (BARTOLOMEW; OLIN, 2006):

- Fatores de risco conhecidos
- Fatores de risco emergentes

### **3.8.1 Fatores de risco conhecidos**

Os fatores de risco tradicionais para a DAOP como idade avançada, tabagismo, diabetes, dislipidemia e hipertensão arterial são semelhantes ao da doença arteriosclerótica de outros territórios, como coração e cérebro, descritos em diversos estudos como o Framingham Heart Study, Risk and Treatment New Resources for Survival (PARTNERS), National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) e Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) (MURITBTO et al. 1997; HIRSCH et al. 2001; SELVIN; ERLINGER, 2004; WATTANAKIT; FOLSOM; SELVIN, 2005).

#### **3.8.1.1 Idade avançada**

A prevalência da DAOP aumenta com a idade. No estudo de Framingham e no NHANES verificou-se uma grande associação com idade a partir dos 70 anos, sendo que neste último a prevalência foi de 4,3% em pacientes com 40 anos e de 14,5% com 70 anos ou mais (MURITBTO et al. 1997; SELVIN; ERLINGER, 2004). No estudo PARTNERS, os grupos de

paciente entre 50 e 69 anos e de 70 anos ou mais, associados ao tabagismo e ao diabetes a prevalência foi de 29% (HIRSCH et al.2001).

### 3.8.1.2 Tabagismo

O tabagismo é o mais importante fator de risco para a DAOP, bem como para o aparecimento de suas manifestações como a claudicação intermitente e isquemia crítica. Aumenta cerca de quatro vezes o risco para a doença e acelera em torno de uma década o aparecimento da claudicação intermitente. Quando comparamos a evolução de pacientes com DAOP não fumantes com os fumantes, observamos neste grupo uma menor taxa de sobrevida por eventos cardiovasculares e piora da isquemia dos membros, com taxas de amputações duas vezes maiores. A associação da DAOP com o tabagismo é duas vezes maior quando comparada com a doença coronariana, não se sabendo claramente os motivos (BARTOLOMEW; OLIN, 2006).

### 3.8.1.3 Diabetes Melito

O diabetes aumenta o risco da DAOP de 1,5 a 4 vezes, estando associada a eventos cardiovasculares e aumento da mortalidade (KANNEL; MCGEE, 1985; MCDERMOTT; LIU; CRIQUI, 2005) . No estudo de Framingham que se baseou em respostas de questionários respondidos pelos pacientes, encontrou-se uma associação de 20% de DAOP e diabetes (BARTOLOMEW; OLIN 2006). Quando o diagnóstico foi feito através do índice tornozelo-braquial (ITB) como no estudo NHANES constatou-se uma incidência de 26% (SELVIN; ERLINGER, 2004). Recentemente, no estudo ARIC foi encontrado nos pacientes diabéticos em terapia com insulina elevada associação com DAOP (WATTANAKIT; FOLSOM; SELVIN, 2005). Em pacientes americanos diabéticos, de origem africana e hispânicos, foi encontrada uma elevada incidência de DAOP quando comparados a brancos e não hispânicos (KANNEL; MCGEE , 1985; SMITH; MILANI; ARNETT, 2004).

Pacientes com DAOP diabéticos tem risco elevado de complicações como úlceras isquêmicas, gangrenas, sendo a causa mais comum de amputação nos Estados Unidos. O diabetes pode contribuir para o desenvolvimento da DAOP por várias razões, como na sua associação com

tabagismo, hipertensão arterial, dislipidemia que podem favorecer os mecanismos da inflamação vascular, disfunção da célula endotelial e das células musculares lisas, aumento da agregação plaquetária e do fibrinogênio, favorecendo o processo arteriosclerótico (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003).

#### 3.8.1.4 Hiperlipidemia

O nível de colesterol total elevado aumenta o risco de claudicação intermitente em até duas vezes de acordo com o estudo de Framingham (KANNEL; MCGEE, 1985). No estudo de NHANES e PARTNERS, foram observados taxas de hipercolesterolemia em pacientes com DAOP de 60% e 77% respectivamente (HIRSCH et al. 2001; SELVIN; ERLINGER, 2004). Os níveis elevados de colesterol, lipoproteínas de baixa densidade e triglicérides são fatores de risco independentes para a doença, sendo que as proteínas de alta densidade são fatores de proteção (HIRSCH et al. 2001; SELVIN; ERLINGER, 2004).

#### 3.8.1.5 Hipertensão Arterial

Pacientes com ITB menor que 0,9, cerca de 52% tem hipertensão arterial (NEWMAN; SISCOVICK; MANOLIO, 1993). O risco de Claudicação Intermittente nesses pacientes é aumentada em 2,5 a 4 vezes tanto em homens como em mulheres (KANNEL; MCGEE, 1985). No estudo Systolic Hypertension in the Elderly (SHEP) 25 % dos pacientes tiveram o ITB menor que 0,9 (NEWMAN; TYRRELL; KULLER, 1997). Todos esses trabalhos mostram a alta prevalência da hipertensão com a DAOP, sendo a DAOP um fator de risco para a doença isquêmica do coração (CHOBANIAN; BAKRIS; BLACK , 2003).

### **3.8.2 Fatores de risco emergentes**

#### 3.8.2.1 Raça e etnia

Alguns estudos tem mostrado maior prevalência de DAOP em pacientes negros e hispânicos. Entre esses estudos o NHANES mostrou que negros sem descendência hispânica tiveram uma taxa de DAOP três vezes maior que brancos sem descendência hispânica (SELVIN; ERLINGER, 2004). Em outro estudo, o Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis a DAOP teve elevada prevalência em homens e mulheres negras (MCDERMOTT; LIU ; CRIQ, 2005). Em contraste, outros trabalhos não observaram significância entre as taxas de DAOP entre hispânicos e outras populações brancas (CRIQUI; VARGAS; DENENBERG, 2005).

#### 3.8.2.2 Genéticos

A predisposição genética para a DAOP baseia-se na observação de que pacientes sem fatores de risco desenvolvem a doença prematuramente. Entretanto, até o momento não se detectou a presença de um gene responsável pela mesma, mas estudos como o Genetic Determinants of Peripheral Arterial Disease apontam a presença de um fator genético entre as causas do seu desenvolvimento (VALENTINE et al. 2000).

#### 3.8.2.3 Insuficiência Renal Crônica (IRC)

Até pouco tempo, pequeno número de estudos epidemiológicos relacionavam a insuficiência renal crônica com um fator de risco para a DAOP. O estudo NHANES mostrou que 24% de uma população com idade de 40 anos ou mais, portadores de IRC apresentaram a doença ( $ITB < 0,9$ ), contra 3,7% de pacientes com clearance de creatinina  $> 60 \text{ ml/min}^4$ . A prevalência de ITB alterado ( $< 0,9$ ) é elevada, cerca de 30 a 38% em pacientes com doença renal avançada em tratamento dialítico (O'HARE, 2005). A associação entre insuficiência renal crônica e DAOP independe da presença do diabetes, hipertensão arterial, idade, etnia e o seu mecanismo não é conhecido, podendo estar relacionado com os mecanismo de inflamação vascular e os níveis elevados de homocisteína presentes nestes doentes (CHOBANIAN et al. 2003).

#### 3.8.2.4 Inflamação

A presença de marcadores inflamatórios como a proteína C reativa, fibrinogênio, interleucina-6 e leucócitos tem sido observados em doença arteriosclerótica de outros territórios, mas a sua associação com a DAOP não está bem definida (SELVIN; ERLINGER, 2004 ; NEWMAN; TYRRELL; KULLER, 1997; O'HARE, 2005).

O estudo Edinburg Artery Study mostrou que o aumento dos níveis plasmáticos de fibrinogênio estão associados com a presença de DAOP quando comparados a grupos controle, independentes do tabagismo, estando relacionados com a gravidade da doença periférica acompanhada por arteriografia e ITB (MACGREGOR et al. 1999; CHENG et al. 1999). Recentemente, o Inter Society Consensus for the management of Peripheral Arterial Disease (Tasc II), sugere que pacientes com proteína c reativa elevada tem risco aumentado de desenvolver a DAOP (NORGREN et al. 2007).

#### 3.8.2.5 Estados de Hipercoagulabilidade

Também chamado de trombofilias, representam um fator de risco para a DAOP. Pacientes jovens, sem fatores de risco, pacientes com história familiar de arteriosclerose precoce, oclusão de revascularizações arteriais sem motivos técnicos devem ser considerados. Diversos estudos sugerem associação da DAOP e níveis alterados de fatores hemostáticos como lipoproteína A, homocisteína, anticorpo antifosfolípides e dímero D (MCDERMOTT et al. 2005a; MCDERMOTT et al. 2005b; SOFI et al. 2005; MCDERMOTT et al. 2003). Os níveis elevados de dímero D parecem estar relacionados com a piora da claudicação intermitente, enquanto que o aumento da homocisteína e da lipoproteína A parece ser importante em DAOP difusas sem fatores de risco tradicionais para a doença .

O nível elevado de homocisteína é relacionado como um fator de risco para a DAOP, bem como para a sua progressão e falência de intervenções vasculares. A sua prevalência é elevada em pacientes com DAOP, representando cerca de 30% em pacientes jovens, sendo sugerido que possa ser um fator de risco independente para arteriosclerose, maior para a DAOP do que para a coronariana (NORGREN et al. 2007).

Entretanto, outros estudos não mostraram aumento do risco de DAOP com hiperhomocisteinemia (RIDKER; STAMPFER; RIFAI, 2001).

Bellen e Zorn (2002) baseando-se nos valores do índice de pressão tornozelo-braquial, classificam a isquemia em diferentes graus a saber : normal ( ITB=  $1,11 \pm 0,10$ ), pacientes com claudicação intermitente (ITB=  $0,60 \pm 0,15$ ), pacientes com dor em repouso (ITB=  $0,26 \pm 0,13$ ) e gangrena (ITB=  $0,05 \pm 0,08$ ). Valores do índice de pressão dedo/braço em diferentes graus de isquemia : normal em jovens (  $0,86 \pm 0,12$ ), normal em idosos ( $0,91 \pm 0,13$ ), claudicação ( $0,35 \pm 0,15$ ) e dor em repouso ( $0,11 \pm 0,10$ ).

Fontaine (1964) classifica a DAOP dos membros inferiores em estágio I (assintomático), estágio II (claudicação intermitente, sendo IIa limitante e IIb incapacitante), estágio III ( dor em repouso ) e estágio IV ( lesões tróficas e gangrenas ).

Selvin e Erlinger (2004) referem que a DAOP está associada com aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular, sendo um importante marcador subclínico de doença coronariana. Nesse estudo foram avaliados 2174 participantes com idade igual ou superior a 40 anos. A DAOP foi definida quando o índice tornozelo-braquial (ITB) for  $< 0,9$  em um dos membros. A prevalência da DAOP em adultos a partir dos 40 anos de idade foi de 4.3%, e quando a idade foi de 70 anos ou mais a prevalência foi de 14.5%. Mais de 95% das pessoas com DAOP tem um ou mais fatores de risco para doença cardiovascular, necessitando de terapia específica. Níveis séricos elevados de Fibrinogênio e PCRus estão associados com a doença.

Lane et al. (2006) citam que a DAOP prematura ocorre antes dos 60 anos de idade, estando associada a elevada morbidade cardiovascular, perda de membros e morte. A DAOP foi definida pelo ITB  $< 0,9$ , os dados coletados através de entrevista, exame físico e testes laboratoriais. A DAOP prematura, em populações  $<$  de 60 anos de idade foi de 2.1% e de 12.0 % em populações com mais de 60 anos de idade. A doença coronariana e níveis séricos elevados de fibrinogênio foram os principais fatores de risco em pacientes com DAOP com menos de 60

anos. A doença renal crônica foi o maior fator de risco em pacientes com DAOP com mais de 60 anos, além da hipertensão arterial, tabagismo e hiperhomocisteinemia. Concluem que o ITB deve ser utilizado de rotina em pacientes com risco cardiovascular elevado para a detecção precoce de pacientes subclínicos.

Heiss et al. (2007) analisaram 13778 participantes do estudo ARIC, submetidos a avaliação pelo ITB e exames laboratoriais para marcadores de risco cardiovascular. A Doença Arterial Obstrutiva Periférica foi associada com níveis séricos elevados de fibrinogênio, fator de Von Willebrand, D-dímero e PCRus, sugerindo que a elevação desses marcadores inflamatórios e hemostáticos poderiam estar envolvidos na fisiopatologia da doença.

A doença arterial periférica é uma doença arteriosclerótica sistêmica, associada com elevada morbidade e mortalidade, mas ainda pouco diagnosticada e tratada. A idade avançada, o tabagismo e o diabetes são os seus principais fatores de risco. O conhecimento dos fatores de risco da doença é essencial para o seu diagnóstico precoce e adequado tratamento. O grande avanço da biologia celular e molecular na determinação dos vários índices inflamatórios e dos estados de hipercoagulabilidade na DAOP, poderá nos fornecer respostas para o seu desenvolvimento, manuseio e novas estratégias de prevenção (SAVINO NETO; NASCIMENTO, 2007).

Atualmente, entende-se a doença arterioclerótica não apenas como decorrência de acúmulo de lipídeos nas paredes dos vasos, mas também como consequência da disfunção endotelial e da ativação do sistema inflamatório, estresse oxidativo e alterações da coagulabilidade, o que nos leva a buscar marcadores envolvidos nesses processos que possam prever o risco da doença vascular (MALLIKA; GOSWAMI; RAJAPPA, 2007).

A melhor compreensão da fisiopatologia e o desenvolvimento de tecnologias sensíveis e específicas tornam cada vez mais atrativa a possibilidade de detecção precoce e monitoração das doenças vasculares. Assim, o conceito dos biomarcadores foi introduzido nos últimos anos, um marcador é uma variável mensurável que pode ser uma substância encontrada em uma amostra biológica como sangue ou urina, podendo refletir a fisiopatologia da doença, prever eventos

futuros, bem como indicar a presença da afecção ou danos a um órgão. Um marcador pode ser medido para avaliar o progresso e o tratamento da doença (CHAGAS, 2003).

A doença cardiovascular é a principal causa de morte e incapacidade que mais cresce no mundo e estima-se que até 2020 supere as doenças infecciosas neste quesito. A doença coronariana, cerebrovascular e arterial periférica correspondem às principais manifestações da arteriosclerose, tendo um grande progresso no diagnóstico, prevenção e tratamento nos últimos trinta anos (HACKAM; ANAND, 2003).

Um dos mais importantes avanços foi a identificação dos fatores de risco para a doença cardiovascular, através de grandes estudos prospectivos como o de Framingham , onde a hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo e o diabetes melito foram identificados como os mais importantes fatores de risco ( KANNEL; MCGEE, 1985).

Entretanto, um número significativo de eventos cardiovasculares ocorrem em paciente sem fatores de risco convencionais bem estabelecidos, o que mantém a busca por agentes adicionais. Nos últimos anos, novos marcadores ou fatores de risco tem sido propostos como preditores para a arteriosclerose e suas complicações.

### 3.9 NOVOS MARCADORES DE RISCO PARA A DOENÇA VASCULAR DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DE HACKAM E ANAND (2003) :

- **Marcadores inflamatórios:** proteína C-reativa, interleucina-6, amiloide A sérico, moléculas de adesão celular e vascular, contagem de leucócitos, ligação solúvel CD 40.

- **Marcadores da hemostasia e de trombose:** fibrinogênio, Von Willebrand, ativador inibidor plasminogenio(PAI-1), ativador tecidual plasminogenio, fatores V,VII e VIII, D-dímero, fibrinopeptideo A, fragmentos de protrombia 1 + 2

- **Fatores relacionados a plaquetas:** agregação plaquetária, atividade plaquetária, volume e tamanho das plaquetas.

- **Fatores relacionados com os lipídeos:** lipoproteínas de baixa densidade, lipoproteína A, apolipoproteínas A1 e B, subtipos de lipoproteínas de alta densidade, LDL oxidada.
- **Outros fatores:** homocisteína, lipoproteína associada a fosfolipase A(2), microalbuminúria, resistência a insulina, genótipo PAI-1, genótipo da enzima de conversão da angiotensina, genótipo Apo E, agentes infecciosos como cytomegalovirus, chlamydia pneumonia, helicobacter pylori, herpes simples, fatores físico social.

### **3.9.1 Marcadores inflamatórios de risco para doença cardiovascular**

#### **3.9.1.1 A Proteína C Reativa (PCR)**

É produzida principalmente no tecido hepático em resposta a estímulos da interleucina-6 e TNF- $\alpha$ , sendo responsável pela ativação da cascata do complemento que regula os processos inflamatórios. É um marcador sensível, embora de baixa especificidade da atividade inflamatória, conhecida e utilizada há muitas décadas na clínica diária. O avanço do conhecimento dos processos fisiopatológicos que levam à arteriosclerose, mostram que esta começa com um processo inflamatório, fazendo com que a Proteína C Reativa despertasse um grande interesse para os estudos das doenças cardiovasculares, havendo fortes indícios que tenha participação mais direta no processo aterogênico por sua atuação muito próxima as citocinas, interleucina-1 e 6, bem como na influência que exerce mediando a captação do LDL oxidado pelos macrófagos e a expressão das moléculas das células de adesão. Portanto, além de ser útil na avaliação dos processos inflamatórios de um modo geral, a PCR-ultrasensível (PCRus) é útil na predição de eventos cardiovasculares futuros em indivíduos saudáveis (LIMA et al. 2007).

#### **3.9.1.2 Efeitos da Proteína C Reativa na arteriosclerose**

Paffen e de Maat (2006) relatam que a inflamação tem um papel central em todas as fases da arteriosclerose, do recrutamento inicial de leucócitos circulantes para a parede arterial até a ruptura de placas instáveis que resultam nas manifestações clínicas da doença. A PCR pode ser envolvido em cada uma destas fases por influenciar os processos de ativação do complemento, apoptose, ativação

de células vasculares, recrutamento de monócitos, acumulação de lipídios e trombose, como será descrito a seguir :

#### **- Ativação do complemento**

Pela interação com fatores de complemento, a PCR mostra um efeito direto em células do endotélio arterial, aumentando a expressão de fatores inibitórios nas células endoteliais. Isto sugere que PCR media a ativação do complemento em um sistema que regula a reação inflamatória, porque promove a remoção de restos de tecidos e os efeitos danosos da ativação do complemento em pacientes com doença cardiovascular (SZALAI et al. 1999). Porém, esta também conduz à produção de uma variedade de moléculas pró-inflamatórias, sendo que este mecanismo de regulação do complemento mediado pela PCR também poderia agravar o estado inflamatório no corpo inteiro, bem como na placa aterosclerótica. Então, a interação direta entre PCR e complemento pode ativar e inibir a inflamação em lesões de arteriosclerose (PAFFEN ; de MAAT, 2006).

#### **- Interação com receptores de superfície**

A observação de que PCR é localizada entre monócitos marca a possibilidade de uma interação direta com estas células e com macrófagos monócitos-derivados por ligar-se a um receptor específico. A PCR liga-se a vários receptores em monócitos humanos; para  $\gamma$ FcRIIa (CD32) com alta afinidade e para  $\gamma$ FcRI (CD64) com baixa afinidade aumentado a fagocitose e a liberação de citocinas inflamatórias (MARNELL; MOLD; DU CLOS, 2005). Os receptores de superfície (Fc) foram descritos para mediar o efeito de PCR em células endoteliais aórticas humanas (DEVARAJ.; DU CLOS; JIALAL, 2005a). O  $\gamma$ FcRIIa é conhecido como o receptor de PCR putativo por leucócito e também foi achado em células endoteliais da aorta bovina (BHARADWA et al. 1999; ESCRIBANO-BURGOS et al. 2005). A PCR também se liga a receptores inibitórios, Fc $\gamma$ RIIb, bloqueando a ativação de sinais (MARNELL; MOLD; DU CLOS, 2005). A ligação da PCR com um receptor sugere sua capacidade de induzir um efeito biológico específico, como o envolvimento direto com células de mediação e opsonização. Em adição a PCR com e sem anticorpo anti-CD32 para células endoteliais demonstrou a mediação parcial da PCR na regulamentação de células de superfície para expressão de proteínas, como os receptores endoteliais de células C, por

CD32 (NAN et al. 2005). A interação de PCR com CD36, um receptor que é expressado através de macrófagos e é envolvido na captação de partículas de proteína de baixa densidade (LDL), demonstra um papel direto da PCR por sua interferência com a ligação de LDL para CD36 (ZWAKA; HOMBACH; TORZEWSKI, 2001).

### **- Trombose**

A trombose contribui para a progressão da lesão aterosclerótica e para a precipitação do evento cardiovascular. Ações diretas da PCR contribuem à indução de um estado pró-trombótico aumentando a atividade pró-coagulante (LIBBY; SIMON, 2001) ou a redução da fibrinólise (CUSHMAN et al. 1999). A PCR foi descrita como indutor de um estado pró-trombótico por indução da expressão de fator de tecido em monócitos humanos, mas só na presença e por interação direta com outras células do sangue como linfócitos- T, linfócitos-B e células assassinas naturais (PAFFEN; VOS; BERTINA, 2004). A PCR também pode inibir a fibrinólise aumentando a expressão e atividade do inibidor principal da fibrinólise, o inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI -1) em células endoteliais de aortas humanas (LIP et al. 2002). Considerando que PAI-1 promove aterotrombose e progressão de síndromes coronárias agudas, este efeito da PCR também pode afetar doenças cardiovasculares (DEVARAJ; XU; JIALAL, 2003).

### **- Modulação celular, recrutamento e ativação**

Na superfície da célula endotelial, a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina é auto-regulamentada pela PCR . Por estes processos a PCR induz adesão de plaquetas a células endoteliais, estimula a deficiência orgânica de células endoteliais e o recrutamento de monócitos e linfócitos-T para a parede endotelial. Estes resultados foram informados por vários grupos que também mostraram que a PCR induziu a produção de MCP -1. Esta autoregulação de moléculas de adesão é mediada parte pela produção de endotelina-1, um potente fator vasoconstritor derivado do endotélio e pela produção do interleucina-6 ,de citocinas inflamatórias e interleucina -8 (PAFFEN ; De MAAT, 2006).

### **- Expressão de mediadores inflamatórios**

Cytokinas, chemokines e moléculas de adesão: a PCR induz cytokinas inflamatórias de um modo dose dependente que promove apoio adicional para a hipótese da interação com fagócitos mononucleares o que constitui um papel biológico importante para esta proteína de fase aguda (DEVARAJ; O'KEEFE; JIALAL, 2005b). A análise quantitativa da liberação PCR-induzida de interleucina-6, interleucina-1 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  através de monócitos humanos normal frescamente isolados, revelou diferenças leves a tempo curtos. Todas as três cytokines foram descobertas 4h depois da adição de PCR em vitro, com níveis máximos de TNF $\alpha$  às 8h, de interleucina-1 e interleucina-6 às 16h (BALLOU; LOZANSKI, 1992).

A PCR induz produção e secreção de MCP-1( monocyte chemoattractant protein) em células endoteliais de veia umbilicais humanas, mas não em células endoteliais aórticas. O MCP-1 está presente na lesão arteriosclerótica e também podem se originar de monócitos (DEVARAJ; O'KEEFE; JIALAL, 2004; PAFFEN; de MAAT, 2006).

#### **- Expressão do óxido nítrico (NO)**

Venugopal et al. (2002) referem que a PCR diminui a expressão e bioatividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que resulta em um efeito subsequente de vasodilatação. Entretanto, ainda é incerto se há um papel causal para a PCR na regulação da expressão do NO na reatividade vascular (CLAPP et al. 2005). A PCR contribui para um estado pró-aterogênico e pró-trombotico diminuindo a liberação do NO e do vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), por aumentar o ânion superóxido e induzir diretamente NO sintase (VENUGOPAL; DEVARAJ; JIALAL, 2003). Os estudos de Ikeda; Takahashi; Shimada (2003) e de Lafuente et al. (2005) demonstram que a PCR, provavelmente, está envolvida na regulação dos níveis celulares de NO.

#### **- Apoptose**

A PCR é diretamente envolvida no processo de apoptose (BLASCHKE, 2004). O efeito inibitório da PCR sobre as células de expressão endotelial do NO inibe a sua mobilização, diferenciação, sobrevivência e função, por facilitar a apoptose e bloquear o processo de angiogênese. A apoptose de células musculares lisas vascular também tem um papel importante na progressão de lesões ateroscleróticas contribuindo para a vulnerabilidade da placa. A PCR também está ligada a

fosfatidilcolina a qual participa diretamente da ativação de macrófagos e neutrófilos na retirada de células apoptóticas e necróticas. Porém, os neutrófilos não estão presentes na placa de aterosclerose (DU CLOS, 2000; CHANG et al.2002).

### **- Lipídeos**

A interação entre lipídios e PCR é diversa. Foi sugerido que PCR pudesse ser o fator que une lipoproteína e ativação do complemento em placas de aterosclerose. Ligando a PCR depositada no tecido ao LDL enzimaticamente degradado, aumenta a ativação do complemento, que pode ser pertinente ao desenvolvimento e progressão da arteriosclerose, particularmente em fases iniciais, quando as baixas concentrações de LDL enzimaticamente degradado estiverem presentes (TORZEWSKI et al. 1998). Embora, o envolvimento direto da PCR não foi demonstrado, por esta ligação da PCR com o LDL enzimaticamente degradado, a PCR pode estar envolvida na liberação volumosa de MCP-1 descrito por macrófago, causado por LDL enzimaticamente degradado (KLOUCHE et al. 1998).

Embora os relatos de interação entre PCR e Ox-LDL sejam conflitantes, a ativação do complemento como resultado desta interação é considerada improvável. A maioria das células espumosas subendoteliais mostram coloração positiva para PCR. Foi demonstrado que LDL nativo que foi co-incubado com PCR foi levado através de macrófagos por macropinocitose. A formação de células espumosas na aterogênese humana poderia ser causada em parte por captação de PCR e LDL (ZWAKA; HOMBACH; TORZEWSKI, 2001).

Níveis altos de lipoproteína de alta densidade (HDL) são protetores da arteriosclerose desde que o HDL seja envolvido no transporte do colesterol da periferia para o fígado. O HDL neutraliza a atividade próinflamatória da PCR, inibe a arteriosclerose por prevenção da oxidação do LDL. Não é conhecido se PCR tem um efeito no estado de oxidação do LDL (WADHAM et al. 2004).

Ridker, Stampfer e Rifai (2001) relatam que dos biomarcadores estudados, o HDL-colesterol e a proteína C reativa ultrasensível foram os maiores preditores independentes para o desenvolvimento da doença arterial periférica, sendo que a PCRus fornece informações adicionais sobre o prognóstico da doença, quando comparados ao lipídeos.

Pearson et al. (2003) utilizaram a Classificação de Recomendação do nível de Evidência do American College of Cardiology em trabalhos publicados de ciência básica e clínica para avaliar os marcadores inflamatórios como fator de risco cardiovascular. Esse grupo de trabalho transporta as evidências da inflamação como um mecanismo chave no processo da arteriosclerose para a prática clínica e a saúde pública, através da avaliação das evidências dos trabalhos de ciência básica, estudos epidemiológicos e clínicos. Esses estudos conduzem à informação de que a arteriosclerose é uma resposta inflamatória a uma variedade de fatores de risco que levam ao desenvolvimento de síndromes coronarianas e cerebrovasculares agudas. Baseado nestas considerações, a dosagem da proteína C reativa ultrasensível se mostrou a mais acessível, por estar padronizada e disponível na prática clínica com adequada precisão. Os níveis de PCRus são divididos em categorias de risco: baixo risco ( $< 1.0$  mg/l), médio risco ( $1,0$  a  $3,0$  mg/l) e alto risco  $> 3,0$  mg/l, valores baseados em estudos populacionais. Baseados nas evidências observadas, recomendam que a PCRus possa ser usada como um fator de risco adicional maior para prevenção da doença coronariana primária, podendo a sua dosagem ser utilizada em estudos populacionais de Saúde Pública. A mensuração da PCRus parece ser o melhor teste para avaliar o risco relativo de pacientes com múltiplos fatores de risco cardiovascular de desenvolverem doença cardiovascular em 10 anos, com taxas de 10% a 20% (nível de evidência B). Contudo, os benefícios dessa estratégia, bem como o seu tratamento nela baseada carecem ainda de maior comprovação. Pacientes com risco relativo elevado  $> 20\%$  (PCRus  $> 3,0$  mg/l) devem ser orientados para intensificar o tratamento médico e os fatores de risco tradicionais para a doença cardiovascular. São considerados baixo risco relativo em 10 anos taxas  $< 10\%$  (PCRus  $< 1,0$  mg/l). Em pacientes com doença coronariana ou síndromes coronarianas agudas, a dosagem da PCRus pode ser usada como um marcador independente para provável eventos recorrentes, incluindo morte, infarto agudo do miocárdio e re-estenoses de intervenções percutâneas coronarianas.

Libby e Ridker (2006) comentam o conceito da inflamação no desenvolvimento da arteriosclerose, onde essa nova hipótese associa os fatores de riscos cardiovascular e alterações celulares e moleculares como responsáveis pelo início da doença. Estes novos fundamentos levam a mudanças na prática clínica. A utilização clínica de biomarcadores inflamatórios tem

gerado grande interesse na investigação de sua eficácia quando comparados ou em associação aos fatores de risco tradicionais. A proposição da elevação dos níveis séricos da proteína C reativa ultra-sensível como um indicador de tratamento tem recebido apoio de uma série de trabalhos clínicos.

Tzoulaki et al. (2006) realizaram o chamado Estudo Arterial de Edinburgh, com o objetivo de analisar as complexas relações entre inflamação, coagulação e arteriosclerose. Foram testadas associações entre fatores hemostáticos como o fibrinogênio, D-dímero, antígeno ativador do plasminogênio, fator de Von Willebrand e a arteriosclerose progressiva mensurada pela realização do índice tornozelo-braquial (ITB). O estudo começou com 1592 pacientes, sendo que após 12 anos de controle, apenas 837 terminaram, destes 485 faleceram (30,5%), tendo causa a doença cardiovascular 207 (42,7%). A idade média foi de 64,8 anos, com 50,9% do sexo masculino. Eram diabéticos 6%, tabagistas 26% e ex-fumantes 36%. Nesse estudo as análises de D-dímero e fibrinogênio estavam significativamente e independentemente associadas com ITB alterado, sendo que o D-dímero está associado a progressão da arteriosclerose periférica independentemente da presença de fatores de risco cardiovasculares. A interleucina -6 foi melhor marcador que a PCR na progressão da doença arterial periférica.

Tsimikas, Willerson e Ridker (2006) propõem que a utilização clínica dos biomarcadores dependem destes conseguirem refletir a atividade da doença arteriosclerótica, com acurácia, boa relação custo-benefício, sendo capazes de prevenir futuros eventos da doença. Relatam que a PCRus preenche muitos desses critérios, se não todos, sendo utilizada na prática clínica para melhorar a avaliação de risco vascular na prevenção primária e secundária da doença cardiovascular. A PCRus tem relevância clínica associada a lipoproteína de alta densidade (LDL), pois ambos são monitorados no tratamento com estatinas. Os biomarcadores plasmáticos traduzem um potencial clínico da doença aterotrófica, contribuindo para estratificação de populações de alto risco, favorecendo o diagnóstico e tratamento precoce de paciente com doença vascular assintomática.

Eldrup et al. (2006) propõem novos modelos da avaliação de risco cardiovascular, além dos já existentes baseados nos estudos de Framingham, onde são avaliados a idade, tabagismo, pressão arterial, hipercolesterolemia, diabetes. Argumentam que nesses critérios de risco, muitos pacientes são identificados quando desenvolvem a doença vascular. A utilização de testes não invasivos como o índice tornozelo-braquial, podem detectar pacientes com arteriosclerose antes de haver manifestação da doença isquêmica, selecionando os paciente para tratamento precoce. Utilizaram o índice tornozelo-braquial ( ITB ), dosagem da PCRus e a medida da circunferência abdominal para identificar indivíduos na população geral com arteriosclerose avançada, tendo como critério de inclusão doença isquêmica cardiovascular ( coronariana ou acidente vascular cerebral ). Concluíram que o  $ITB < 0,9$  identifica pacientes com arteriosclerose grave na população geral, enquanto a PCRus e a medida da circunferência abdominal não tem a mesma significância.

Ben-Yehuda (2007) cita que a PCRus tem sido utilizada como estratificação de risco para a doença cardiovascular baseada em evidências epidemiológicas, mas ainda existem algumas controvérsias, pois pode estar elevada em pacientes com obesidade, aumento da circunferência abdominal e resistência a insulina, demonstrando que seu uso tem limitações. Faz críticas ao uso da PCRus como marcador de risco da doença cardiovascular citando vários estudos como o de Wang et al.(2006); Khera et al. (2006); Sattar et al. (2007), nos quais a dosagem da PCRus mostraram resultados modestos quando comparados com fatores de risco tradicionais. Questiona que diante desses resultados divergentes, como podemos fazer uso dessa literatura, se há uma explicação biológica ou de metodologia para essa variabilidade.

Ridker (2007) faz uma revisão de mais de 20 estudos prospectivos, que mostraram que a PCRus é um biomarcador inflamatório de eventos cardiovasculares futuros, adicionalmente a preditores de risco como diabetes e hipertensão. Em muitos trabalhos o impacto relativo da PCRus é pelo menos igual ou maior que as lipoproteínas de baixa densidade, alta densidade, pressão arterial e tabagismo. O seu conhecimento re-classifica um grupo de pacientes do chamado de risco intermediário em paciente de baixo ou alto risco. Contudo, há consenso sobre a PCRus

entre os autores que defendem ou criticam a hipótese inflamatória da arteriosclerose, pois esta é a única que pode imediatamente aumentar os cuidados com os pacientes.

Lima et al. (2007) relatam que a PCR é uma proteína de fase aguda, sintetizada pelo fígado em resposta às citocinas, que reflete inflamação ativa sistêmica tendo a inflamação um papel potencial no início, na progressão e na desestabilização das placas de ateroma. Assim que os macrófagos se infiltram na parede vascular, elaboram citocinas que modulam a migração, a proliferação e a função de células inflamatórias. Marcadores plasmáticos de inflamação crônica têm sido associados ao risco de DAC, sendo a PCR o marcador mais estudado. O desenvolvimento de dosagens de PCRus tem sido instrumento na exploração do papel desse marcador na predição de um possível evento vascular, pois sua habilidade para prever futuros eventos coronarianos em homens e mulheres aparentemente saudáveis tem sido estudados. A PCRus, considerada um marcador de inflamação sistêmica, tem sido consistentemente associada ao risco cardiovascular, e sua determinação parece ser útil na estratificação do risco de eventos coronarianos. Reações inflamatórias na placa aterosclerótica presente nas coronárias contribuem para a sua instabilidade e ruptura, representando um papel importante na patogênese de eventos aterotrombóticos agudos fatais ou não. Marcadores plasmáticos de inflamação crônica têm sido consistentemente associados ao risco de doença arterial coronariana (DAC), sendo a proteína C-reativa ultrasensível (PCRus) um dos marcadores mais estudados. Os autores em seu estudo tiveram como objetivo determinar os níveis plasmáticos da PCRus de um grupo de indivíduos submetidos à angiografia coronariana, buscando estabelecer a possível correlação entre esse parâmetro e a gravidade da DAC. Níveis plasmáticos da PCR foram determinados em amostras de sangue de 17 indivíduos com ausência de ateromatose nas coronárias (controles), 12 pacientes apresentando ateromatose leve/moderada e 28 com ateromatose grave, utilizando-se o conjunto diagnóstico Biotécnica Proteína C Reativa Turbidimetria com metodologia ultra-sensível específica para monitoramento em cardiologia, com linearidade de 0,1 a 15 mg/l. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos três grupos para o parâmetro avaliado, porém as médias obtidas para os grupos ateromatose leve/moderada e ateromatose grave permaneceram acima da faixa de referência indicada pelo método para monitoramento em cardiologia (0,1 a 2,5 mg/dl). As médias obtidas nos três grupos apresentaram elevação crescente dos níveis plasmáticos de PCRus a partir do grupo controle, aumentando com

a gravidade da arteriosclerose coronariana, o que poderia sugerir a progressão do estado inflamatório em função da lesão arteriosclerótica.

### **3.9.2 Marcadores da inflamação, hemostasia e de trombose de risco cardiovascular**

#### **3.9.2.1 O fibrinogênio (Fg), fator I da coagulação**

Consiste em uma glicoproteína de peso molecular (PM) igual à 340.000 daltons, presente no plasma sangüíneo. Este fator da coagulação após a clivagem pela trombina forma monômeros de fibrina, os quais se polimerizam no processo de coagulação. Sofre ativação nos processos de injúria tecidual onde são desencadeados os fenômenos hemostáticos que culminam com a formação de uma rede resistente de fibrina. É sintetizado no fígado e nos megacariócitos, possuindo uma estrutura trinodular onde as duas metades da molécula são simétricas; possui três pares de cadeias de polipeptídeos designadas como Aa, Bb e g. As cadeias Aa, Bb e g, tem 610, 461 e 411 aminoácidos respectivamente, com peso molecular de 66.500 daltons para cadeia Aa, 52.000 daltons para cadeia Bb e 46.000 daltons para cadeia g. Vários fatores parecem influenciar a concentração plasmática de fibrinogênio, como tabagismo, idade, obesidade, nível de colesterol, diabetes mellitus, consumo de álcool, ingestão de fibras, uso de contraceptivos orais e menopausa. Além disso, estimativas de herdabilidade dos níveis plasmáticos de fibrinogênio variam de 27% a 51%. O fibrinogênio possuiria outras funções que poderiam participar no desenvolvimento das doenças vasculares como a regulação das células de adesão, quimiotaxia e proliferação, vasoconstrição no local da lesão da parede vascular e estimulação da agregação plaquetária e determinação da viscosidade sanguínea (BRANDÃO et al. 2004).

O fibrinogênio é reconhecido como fator de risco para a doença arterial coronariana (DAC), acidente vascular cerebral (AVC) e doença arterial periférica (DAOP). Nesse contexto, o fibrinogênio, bem como a fibrina e seus produtos de degradação, pode se acumular na placa aterosclerótica e estimular a proliferação de células musculares lisas. A produção hepática do fibrinogênio poderia ser aumentada, como na forma de gatilho na presença de resposta inflamatória ou a infecções (LEE et al. 1999).

Doweik et al. (2003) investigaram o impacto prognóstico dos níveis elevados de fibrinogênio sobre a mortalidade em pacientes de alto risco com doença arterial obstrutiva periférica. Foram estudados 486 pacientes com DAOP e co-morbidades cardiovasculares por um período de 7 anos. Concluíram que os níveis plasmáticos elevados de fibrinogênio em pacientes com risco cardiovasculares portadores de DAOP aumentam o risco de complicações fatais.

Hackam, Anand (2003) relatam que a doença vascular arteriosclerótica é um grande problema de saúde pública, havendo uma busca contínua para seu diagnóstico e tratamento precoce. Fizeram um estudo cujo objetivo foi fazer uma revisão da literatura de estudos epidemiológicos, de ciência básica e clínicos buscando evidências para a utilização de fatores de risco emergentes como Proteína C Reativa ultrasensível (PCRus), lipoproteína A, fibrinogênio e Homocisteinemia. Foram relacionados 373 estudos sobre fatores de riscos vasculares convencionais e novos, associados com a arteriosclerose. Concluem que os níveis elevados de fibrinogênio, PCRus, lipoproteína A e homocisteína são fatores de risco para doença vascular.

O estudo The fibrinogen studies collaboration (2007) revela que o aumento dos níveis de fibrinogênio plasmático de 1g/l, estão associados com o aumento de duas vezes o risco de doença cardiovascular, mas as causas permanecem incertas. Os investigadores avaliaram 154.211 indivíduos adultos provenientes de 31 estudos prospectivos realizados entre 1967 e 2003. Os níveis de fibrinogênio aumentaram com a idade, tiveram comportamento linear com grandes fatores de risco e ligeira associação com triglicerídeos, albumina, tabagismo e consumo de álcool. O sexo feminino, negros, baixo nível sócio-econômico estavam relacionados a pequenos níveis de elevação do fibrinogênio. Houve associação positiva com tabagismo, sendo maior no sexo masculino, com índice de massa corporal, maior duas vezes nas mulheres que nos homens e inversamente com lipoproteínas de alta densidade. Apresentou associação positiva em relação a marcadores inflamatórios, especialmente a PCRus. Esses achados avançam para uma melhor compreensão das suas correlações e possibilidade de determinar os níveis de fibrinogênio na doença cardiovascular.

Paraskevas et al. (2008) em artigo de revisão sobre o papel do fibrinogênio na DAOP, relatam que a doença arterial periférica (DAOP) é associada com altas taxas de eventos cerebrovascular e cardiovasculares, sendo um marcador da arteriosclerose sistêmica. A modificação de fatores de risco estabelecidos como parar de fumar, controlar a hipertensão, o diabetes, os lipídios são essenciais. Além disso, novos fatores de risco modernos emergiram, incluindo o fibrinogênio e outros fatores hemostáticos. O fibrinogênio é um fator da coagulação e um marcador da resposta de fase aguda da inflamação, um ativador de plaqueta, sendo determinante da viscosidade do sangue e um componente da placa de aterosclerose. O fibrinogênio não só parece prever a severidade da DAOP, mas também serve como um marcador para desenvolvimento futuro da mesma. Reduzindo os níveis de fibrinogênio e de outros fatores da coagulação diminuirá a incidência e progressão DAOP.

### **3.9.3 Outros marcadores de risco cardiovascular (coagulação)**

#### **3.9.3.1 A Homocisteína (He)**

É um metabólito da metionina que contém um grupamento SH-, sendo um aminoácido formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina proveniente da dieta ou de seu catabolismo. A metionina, localizada principalmente no fígado, é catabolizada pela via da transulfuração (NEVES; MACEDO; LOPES, 2004).

De Vigneaud (1962) descobriu a He, porém só em 1969 descreveu-se pela primeira vez a relação entre hiperhomocisteinemia (HHe), arteriosclerose e trombose arterial e venosa em portadores de homocistinúria (McCULLY, 1969). Em 1985 foi descrita a correlação entre doença vascular e HHe em heterozigotos para a homocistinúria (BOERS,1985). A hiperhomocisteinemia tem sido associada a maior risco de eventos aterotrombóticos, e a literatura sugere associação causal, independente de outros fatores de risco para doença arterial. As doenças cardiovasculares (DCV) representam a maior causa de morte em países ocidentais. No Brasil, são responsáveis pela morte de 300 mil pessoas/ano e correspondem a 16% dos gastos do Sistema Único de Saúde (SUS). Fatores de risco clássicos, como hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica, diabetes melito, tabagismo, obesidade, sedentarismo e antecedentes familiares, são responsáveis

por dois terços das causas de mortes por DCV. Chama a atenção o fato de 30%-35% dos indivíduos com DCV apresentarem normocolesterolemia, porém mais de 40% dos pacientes com doença primária da artéria coronária, cerebrovascular ou vascular periférica têm hiperhomocisteinemia (HHe) (NAIR, et al. 2000).

A patogenia da lesão vascular determinada pela HHe inclui lesão da célula endotelial, crescimento da musculatura lisa vascular, maior adesividade plaquetária, aumento da oxidação do LDL-colesterol com deposição na parede vascular e ativação direta da cascata da coagulação (DURAND, 2001). Entretanto, ainda não está claro qual o mecanismo fisiopatológico da He na aterotrombose. Evidências de que a He seja um regulador natural dos leucócitos, incluindo adesão endotelial e migração transendotelial, vieram de estudos *in vivo*, nos quais ela ativa independentemente cada tipo de leucócito e célula endotelial. Neutrófilos e monócitos expostos a He, co-culturados com células endoteliais, englobam mecanismos que envolvem peróxidos de hidrogênio extracelular. A He induz leucócitos e adesão endotelial, migração transendotelial de leucócitos e lesão endotelial mediada por leucócitos, que seletivamente muda o padrão da expressão da proteína de quimioatração de monócitos (MCP-1) e interleucinas; estas sinalizam neutrófilos e respostas celulares com liberação de citocinas e agonistas inflamatórios como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (DUDMAN, 1999).

Venâncio, Burini e Yoshida (2004) descrevem estudos realizados em humanos e em animais de laboratório sugerindo que a hiperhomocisteinemia moderada alteraria a produção do óxido nítrico no endotélio, um potente inibidor plaquetário e vasodilatador. A homocisteína teria o efeito de diminuir a biodisponibilidade do óxido nítrico de maneira dose-dependente, ao alterar sua síntese por inibição do óxido nítrico sintetase endotelial, o que provocaria eventos vasculares agudos, particularmente em indivíduos com outros fatores de risco. Especula-se, também, que a hiperhomocisteinemia moderada exerceria um papel importante na disfunção endotelial através de mecanismos oxidativos. Estudos *in vitro* com culturas de células endoteliais mostraram que a auto-oxidação da homocisteína no plasma produziria espécies derivadas de oxigênio, incluindo o superóxido e o peróxido de hidrogênio, os quais estariam associados a toxicidade vascular, proliferação de células musculares lisas e oxidação da fração LDL-colesterol e, portanto poderiam estar ligados à formação de células espumosas e estrias gordurosas, características de

lesões ateroscleróticas (PIOLOT; BLACHE; BOULET, 2003). Outros efeitos da homocisteína seriam alterações nas propriedades anti-trombóticas do endotélio vascular. Estudos *in vitro* em células expostas à homocisteína demonstraram um aumento da atividade dos fatores de coagulação XII e V, redução da ativação da proteína C, inibição do ativador de plasminogênio tecidual, redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e prostaciclina, inibição da agregação plaquetária, aumento da atividade do fator de von Willebrand, inibição da expressão da trombomodulina, indução da expressão do fator tecidual e supressão da expressão do heparan sulfato na parede vascular (WELCH; LOSCALZO,1998).

A determinação da He tem sido realizada pelos métodos de cromatografia de troca iônica por analisador de aminoácidos e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com detecção eletroquímica. A concentração normal de homocisteína no plasma é de aproximadamente 10  $\mu\text{mol/l}$ , com variação entre 5 a 15  $\mu\text{mol/l}$ ; valores acima, caracterizam a hiperhomocisteinemia (UELAND et al. 1993). Kang et al. (1992) classificaram a hiperhomocisteinemia nas formas grave ( concentrações maiores que 100  $\mu\text{mol/l}$ ), intermediária ( concentrações entre 31 e 100  $\mu\text{mol/l}$ ) e moderada ( concentrações entre 15 e 30  $\mu\text{mol/l}$ ). A hiperhomocisteinemia grave é também chamada de homocisteinúria. A prevalência de HHe ocorre em 5% a 7% da população geral, porém níveis moderados a intermediários ocorrem em 13%-47% daqueles com doença vascular aterosclerótica sintomática (McCULLY,1996; UELAND; REFSUM,1989). No Brasil a hiperhomocisteinemia foi encontrada em 60% dos pacientes com DAOP confirmada, com predominância da forma moderada, com níveis significativamente aumentados nos indivíduos com idade superior a 60 anos e com tendência a ser maior nos homens (VENÂNCIO, 2002). Outros estudos nacionais também revelaram prevalência alta de hiperhomocisteinemia (20%) em indivíduos nipobrasileiros portadores de arteriopatia periférica arteriosclerótica, com valores médios de homocisteína progressivamente mais elevados no sexo masculino. (GARÓFOLO et al. 2007).

Neves, Macedo e Lopes (2004) observaram em estudo de metanálise envolvendo 27 trabalhos e mais de quatro mil pacientes quando os valores de He foram maiores que 10mmol/l, cada 5mmol/l acrescidos nos valores de He circulante estão associados a 80% de risco para doença cardiovascular em mulheres e 60% em homens; e 50% para doença cerebrovascular, além de aumentar em 6,8 vezes o risco para doença vascular periférica. Esse aumento também

corresponde a 20mg/dl de colesterol total com maior probabilidade de infarto agudo do miocárdio (BOUSHEY, 1994).

A análise clínica da homocisteína sangüínea, como um marcador preditor de DAOP, é considerada de grande importância, principalmente em indivíduos com arteriosclerose prematura ou história familiar grave de aterotrombose com ausência de outros fatores de risco (RIDKER; STAMPFER; RIFAI, 2001).

Entretanto, muitas questões necessitam ainda serem esclarecidas quanto a participação da hiperhomocisteinemia na doença vascular, existindo ainda muito a ser estudado sobre a influência da He na função das células sangüíneas e endotélio vascular.

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODO**

### **4.1 TIPO DE ESTUDO**

Estudo observacional, transversal, onde os níveis séricos dos biomarcadores inflamatórios e da coagulação ( fibrinogênio, Proteína C Reativa ultrasensível e homocisteína), dos marcadores de estresse oxidativo (Glutationa, Catalase e Superóxido Dismutase) e do nitrito como marcador de disfunção endotelial, foram dosados através da coleta do sangue venoso periférico de pacientes portadores de DAOP, atendidos no Serviço de Cirurgia Vascular da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará.

### **4.2 AMOSTRA**

Composta por 30 pacientes divididos em 2 grupos, além do Grupo Controle :

Grupo Controle – 15 indivíduos do sexo masculino ou feminino com idade entre 45 e 75 anos sem doença arterial obstrutiva periférica e ausência de de fatores de risco vascular conhecidos.

Grupo A - 15 pacientes do sexo masculino ou feminino com idade entre 45 e 75 anos portadores de doença arterial obstrutiva periférica no estágio de claudicação intermitente limitante (estágio IIa da Classificação de Fontaine, com ITB = 0,89 a 0,5 ).

Grupo B - 15 pacientes do sexo masculino ou feminino com idade entre 45 e 75 anos portadores de doença arterial obstrutiva periférica no estágio de claudicação intermitente incapacitante ou dor em repouso (estágio IIb e III da Classificação de Fontaine, com ITB = 0,49 a 0,35 ).

#### 4.3 PROCESSO DE SELEÇÃO

Participaram do estudo homens e mulheres portadores de doença arterial obstrutiva periférica identificados pelo índice tornozelo-braquial (ITB), respeitando os critérios de inclusão e exclusão.

#### 4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes do sexo masculino ou feminino, com idade entre 45 e 75 anos, portadores de doença arterial obstrutiva dos membros inferiores diagnosticados pelo índice tornozelo-braquial, sem doença vascular conhecida de outro território.

#### 4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Uso regular de medicamentos anti-agregantes plaquetários, anti-inflamatórios, vasodilatadores, drogas hemorreológicas, hipolipemiantes e antioxidantes. Portadores de neoplasias malignas, doenças infecciosas, inflamatórias, insuficiência hepática, insuficiência renal, obesidade mórbida, reposição estrogênica e alcoolismo.

#### 4.6 PROCEDIMENTOS

1 Etapa : Identificação dos pacientes de acordo com o índice tornozelo-braquial conforme os grupos estudados, atendidos nos ambulatórios e enfermaria de Angiologia e Cirurgia Vascular da Fundação Santa Casa .

2 Etapa : Coleta das amostras de sangue de acordo com os grupos do estudo.

3 Etapa : Dosagem dos níveis séricos do fibrinogênio, proteína C reativa ultrasensível, homocisteína, catalase, glutatona, superóxido dismutase e do nitrito (metabólico do óxido nítrico) nos grupos estudados.

#### **4.6.1 Técnica de mensuração do índice tornozelo-braquial**

As medidas são realizadas após o paciente descansar 5 minutos em decúbito dorsal. O ITB é calculado como a relação entre a maior das duas pressões sistólicas (artéria tibial posterior e pediosa) abaixo do tornozelo com a maior pressão da porção braquial. As pressões de ambas as pernas são medidas e o ITB é calculado separadamente para cada perna. No caso da ausência do valor do ITB em uma das pernas (amputação) ou da pressão sistólica braquial em um dos braços, o valor dos membros contra laterais serão utilizados. DAOP é definida como um ITB < 0,90. O menor valor de ITB entre as duas pernas deve ser utilizado como referência para análise dos dados (HIRSCH; HASKAL; HERTZER; et al., 2006).

Para a realização do procedimento, deve-se:

- medir a circunferência braquial e selecionar a bolsa inflável adequada;
- posicionar o paciente em decúbito dorsal e colocar o manguito no braço 2 a 3 cm acima da fossa ante-cubital;
- com o auxílio do Doppler, localizar o som arterial mais audível posicionando o transdutor sobre o pulso braquial. Insuflar o manguito 20 a 30 mmHg acima do ponto de desaparecimento do ruído arterial. Desinsuflar lentamente, cerca de 2 mmHg por segundo. O primeiro som audível durante a desinsuflação será registrado como a pressão sistólica. São realizadas duas medidas para aumentar a reprodutibilidade do método;
- medir a pressão sistólica no braço esquerdo, seguindo as mesmas recomendações;

- medir a pressão sistólica dos tornozelos direito e esquerdo, colocando o manguito 2 a 3 cm acima do maléolo com a bolsa inflável centralizada na direção do pulso pedioso. Posteriormente, mede-se a pressão arterial sistólica da artéria tibial posterior;
- Nos pacientes diabéticos que apresentaram sinais de calcificação da parede arterial, foi usada a medida de pressão nos dedos.

#### **4.6.2 Coleta do Material**

Foi coletado 20 ml de sangue de veia periférica após 12 horas de jejum, e transportado em recipiente com gelo, em uma temperatura em torno de 4°C para processamento no laboratório e armazenado a uma temperatura de 80°C negativos.

#### **4.6.3 Dosagem da proteína C reativa ultrasensível**

Teste por turbidimetria com partículas de látex, automatizado para determinação quantitativa da proteína C reativa no soro/plasma (THOMPSON; MILFORD; WHICHER, 1992). Valor de referência : baixo risco ( < 0,1 mg/dl ), médio risco ( 0,1 a 0,3 mg/dl ) e alto risco > 0,3 mg/dl.

#### **4.6.4 Dosagem do fibrinogênio**

Através do método de Clauss, por leitura de turbidimetria (CLAUSS, 1957). Valor de referência : 150-370 mg/dl.

#### **4.6.5 Dosagem de homocisteína**

Procedimento automatizado, utilizando o teste por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (UBBINK et al.1991). Valor de referência de 5,0 a 14,0 µmol/L.

#### **4.6.6 Dosagem da atividade da enzima catalase**

Para determinação da atividade da enzima catalase foi realizado o método de titulação permanganométrica do peróxido de hidrogênio descrito por Aebi (1980), sendo os resultados expressos em g/ml/min.

#### **4.6.7 Dosagem da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)**

Para de terminação da atividade da SOD foi utilizado o metodo de Lowry et al. (1951); Fridovich (1995), sendo os resultados expressos em U/mg ptn/min.

#### **4.6.8 Dosagem de glutathiona**

Para determinação da glutathiona reduzida (GSH) nas amostras foi realizado o método descrito por Anderson (1969), sendo o resultado expresso e mg/ml.

#### **4.6.9 Dosagem de nitrito**

A atividade nitrérgica foi avaliada através da mensuração dos níveis de nitrito presente no plasma pelo método espectrofotométrico modificado de Green et al. (1982). O plasma foi previamente desproteinizado com sulfato de zinco 3% numa proporção 1:1 e então centrifugado a 5000 r.p.m. por 5 min. Os resultados expressos em  $\mu\text{M}$ .

### **4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS**

Os resultados serão expressos através de gráficos e tabelas utilizando o Microsoft® Windows Word e Excel 2007. Os cálculos estatísticos foram realizados no programa BioEstat 5, sendo utilizado o Teste  $t$  para avaliação do tamanho das amostras, o teste de Mann-Whitney para diferença entre as amostras, estatística descritiva para obtenção de médias e desvio padrão, teste do coeficiente de variação para comparar diferentes populações com as mesmas característica, teste do Qui-Quadrado, análise de regressão para determinar a dependência de uma variável em relação à chamada variável independente ou preditora, com cálculos de regressão logística, regressão linear de seleção progressiva (*stepwise*), ponto de Corte e teste do Crivo. Para nível de significância estatística foi considerado o valor  $p < 0,05$ .

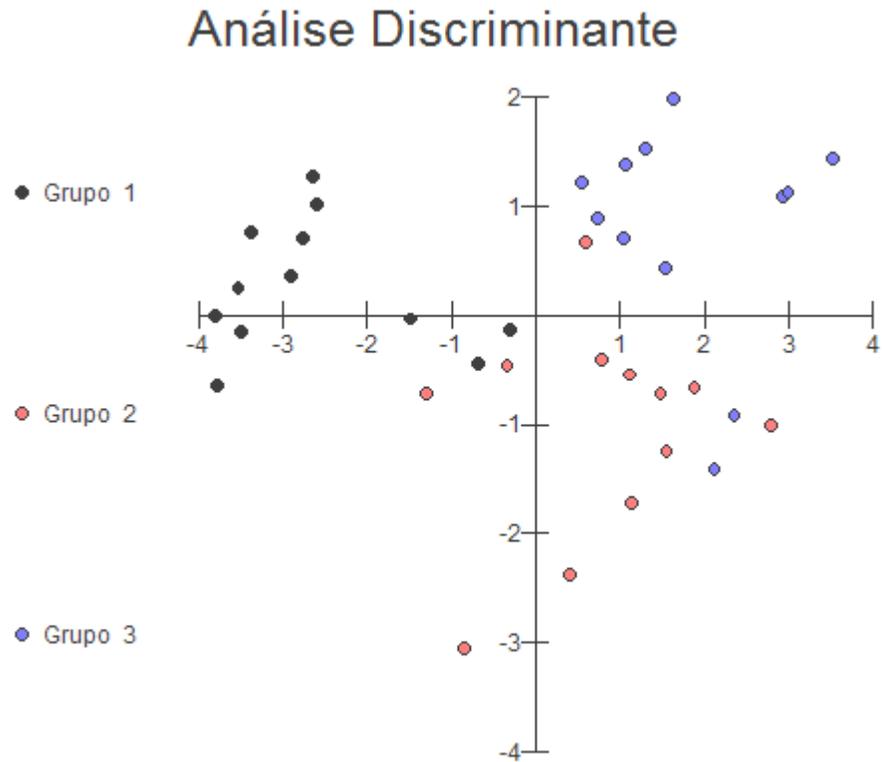
#### 4.8 ASPECTOS ÉTICOS

A proposta foi elaborada obedecendo as diretrizes e normas da Resol. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que estabelece normas para pesquisa envolvendo seres humanos. A pesquisa oferece baixo risco físico, considerando que todo o processo de obtenção de dados e coleta das amostras de material biológico foi realizado por pessoal qualificado e material adequado, tendo o projeto sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará de acordo com o protocolo nº 081/ 2004 – CEP/NMT .

Esta pesquisa não apresenta conflito de interesse, tendo sido realizada no Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará e no Laboratório de Patologia Clínica Amaral Costa, com recursos próprios dessas instituições, CNPQ , Capes e IBNET.

## 5 RESULTADOS

Com a finalidade de demonstrar a separação dos Grupos, de acordo com suas variáveis, foi usada o teste de análise discriminante. Figura 1.



**Figura 1-** Mostra a separação entre o Grupo 1 ( controle ), Grupo 2 (A) e Grupo 3 (B).

Fonte: protocolo de pesquisa.

#### GRUPO CONTROLE ( C )

O Grupo Controle foi formado por 15 pessoas sem história clínica de doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) e ausência de fatores de risco vascular conhecidos, oito (53,33%) foram do sexo masculino e sete (46,66%) do feminino, com idade média de 53,53 (DP 5,05) anos. Tabela 1.

**Tabela 1** - Distribuição por faixa etária no Grupo Controle.

<b>Idade</b>	<b>Xi</b>	<b>Fi</b>	<b>Percentual</b>
47 – 50 anos	48,5	3	20 %
50 – 53 anos	51,5	4	26,67 %
53 – 56 anos	54,5	2	13,33 %
56 – 59 anos	57,5	3	20 %
59 – 62 anos	60,5	3	20 %

Fonte : protocolo de pesquisa

A avaliação dos marcadores inflamatórios e da coagulação apresentaram como resultado níveis médios plasmáticos da proteína C reativa ultrasensível de 0,01 mg/dl (DP 0,02), do fibrinogênio de 256,10 mg/ dl (DP 44,38) e da homocisteína de 10,2 micromol/l (DP 3,34).

Nas dosagens dos marcadores de estresse oxidativo, a catalase teve nível médio de atividade 12 g/ml/min (DP 2,92), a glutatona de 13,73 mg/ml ( DP 3,26) e a superóxido dismutase 9,6 U/mg ptn/min (DP 1,8 ). O nitrito como marcador de disfunção endotelial teve o nível médio plasmático de 3,91  $\mu$ M (DP 1,62). Tabela 2.

**Tabela 2** - Níveis séricos dos marcadores do Grupo Controle.

Marcadores	Grupo controle		Fonte : protocolo de pesquisa.
	Média	DP	
<b>Marcadores inflamatórios e da coagulação</b>			
PCRus	0,01 mg/dl	0,02	
Fibrinogênio	256,1 mg/dl	44,38	
Homocisteína	10,2 µmol/L	3,34	
<b>Marcadores de estresse oxidativo</b>			
Catalase	12g/ml/min	2,92	
Glutathiona	13,73 mg/ml	3,26	
Superóxido dismutase	9,33 U/mg ptn/min	1,87	
<b>Marcadores de disfunção endotelial</b>			
Nitrito	3,91 µM	1,62	

## GRUPO A

Constituído por 15 pacientes portadores de DAOP, em fase IIa ( claudicação intermitente limitante) da Classificação de Fontaine, com ITB entre 0,89 e 0,5, onde doze (80%) eram do sexo masculino e três ( 20%) do feminino com idade média de 59,33 ( DP 8,43 ) anos. Neste grupo, nove (60 % ) pacientes apresentavam diabetes melito, nove (60%) hipertensão arterial, oito (53,33%) hipercolesterolemia e treze (86,66%) eram tabagistas . Tabela 3.

**Tabela 3** - Distribuição por faixa etária no Grupo A.

Idade	Xi	Fi	Percentual
45 – 51 anos	48	3	20 %
51 – 57 anos	54	3	20 %
57 – 63 anos	60	3	20 %
63 – 69 anos	66	3	20 %
69 – 75 anos	72	3	20 %

Fonte : protocolo de pesquisa

As dosagens dos níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios e da coagulação mostraram a proteína C reativa ultrasensível com valor médio de 0,37 mg/dl (DP. 0,47), o fibrinogênio com 435,26 mg/dl (DP 124,33) e a homocisteína com 10,86 micromol/l ( DP 5,13).

As dosagens dos marcadores de estresse oxidativo apresentaram como nível médio da catalase 8,53 g/ml/min (DP 2,32), da glutatona 8,60 mg/ml ( DP 2,66) e da superóxido dismutase 7,4 U/mg ptn/min (DP 2,1). As dosagens do nitrito como marcador de disfunção endotelial apresentou nível médio plasmático de 3,25  $\mu$ M (DP 1,7). Tabela 4.

**Tabela 4** - Níveis séricos dos marcadores do Grupo A.

Marcadores	Grupo A	
	Média	DP
<b>Marcadores inflamatórios e da coagulação</b>		
PCRus	0,37 mg/dl	0,47
Fibrinogênio	435,26 mg/dl	124,33
Homocisteína	10,86 $\mu$ mol/l	5,13
<b>Marcadores de estresse oxidativo</b>		
Catalase	8,53g/ml/min	2,32
Glutaciona	8,60 mg/ml	2,66
Superóxido dismutase	7,16 U/mg ptn/min	2,4
<b>Marcadores de disfunção endotelial</b>		
Nitrito	3,25 $\mu$ M	1,7

Fonte: Protocolo de pesquisa

## GRUPO B

Este grupo foi composto por 15 pacientes portadores de doença arterial obstrutiva periférica (DAOP), em fase IIb ( claudicação intermitente incapacitante ) e III (dor de repouso ) da Classificação de Fontaine, com ITB entre 0,49 e 0,35 onde nove (60%) eram do sexo masculino e seis (40%) do feminino com idade média de 65,4 ( DP 6,4 ) anos. Neste grupo, oito (53,33% ) pacientes apresentavam diabetes melito, sete(46,66%) hipertensão arterial, seis (40%) hipercolesterolemia e catorze (93,33%) eram tabagistas. Tabela 5 e 6.

**Tabela 5** - Distribuição por faixa etária no Grupo B.

Idade	Xi	Fi	Percentual
54 – 58 anos	56	1	6,67 %
58 – 62 anos	60	4	26,67 %
62 – 66 anos	64	2	13,33 %
66 – 70 anos	68	1	6,67 %
70 – 72 anos	72	7	46,67 %

Fonte : Protocolo de pesquisa

Foi realizado o teste do coeficiente de variação, com a finalidade de avaliar a existência de significado estatístico da variação de idade entre os grupos estudados, tendo o valor do  $p > 0,05$ , demonstrando ser uma variação amostral.

Para avaliação da diferença do gênero entre os três grupos, foi realizado o teste do Qui-Quadrado ( $X^2$ ), tendo o valor do  $p > 0,05$ .

**Tabela 6** - Fatores de risco conhecidos da doença arteriosclerótica nos Grupos A e B.

Fatores de risco	Grupo A (n=15)		Grupo B (n=15)	
	N(%)	Qui-quadrado ( $X^2$ )	N(%)	Qui-quadrado ( $X^2$ )
Diabetes Melito	9 (60)	P = 0,60	8 (53,3)	p = 1,0
Hipercolesterolemia	8 (53,3)	P = 1,0	6 (40)	p = 0,60
Hipertensão	9 (60)	P = 0,60	7 (46,7)	p = 1,0
Tabagismo	13(86,7)	p = 0,0098	14 (93,3)	p = 0,0019

Fonte: Protocolo de pesquisa

Na avaliação dos marcadores inflamatórios e da coagulação, a proteína C reativa ultras-sensível apresentou como nível médio plasmático o valor de 0,73 mg/dl ( DP 0,79), o fibrinogênio de 367,80 mg/dl (DP 120,21) e a homocisteína de 11 micromol/l (DP 5,14).

Quanto aos marcadores de estresse oxidativo, a catalase apresentou nível médio de atividade 7,53 g/ml/min (DP 2,94), a glutatona de 8,93 mg/ml ( DP 2,05) e a superóxido

dismutase de 5,08 U/mg ptn/min (DP 2,19). O marcador de disfunção endotelial nitrito apresentou como nível médio plasmático o valor de 1,83  $\mu$ M (DP 1,8). Tabela 7.

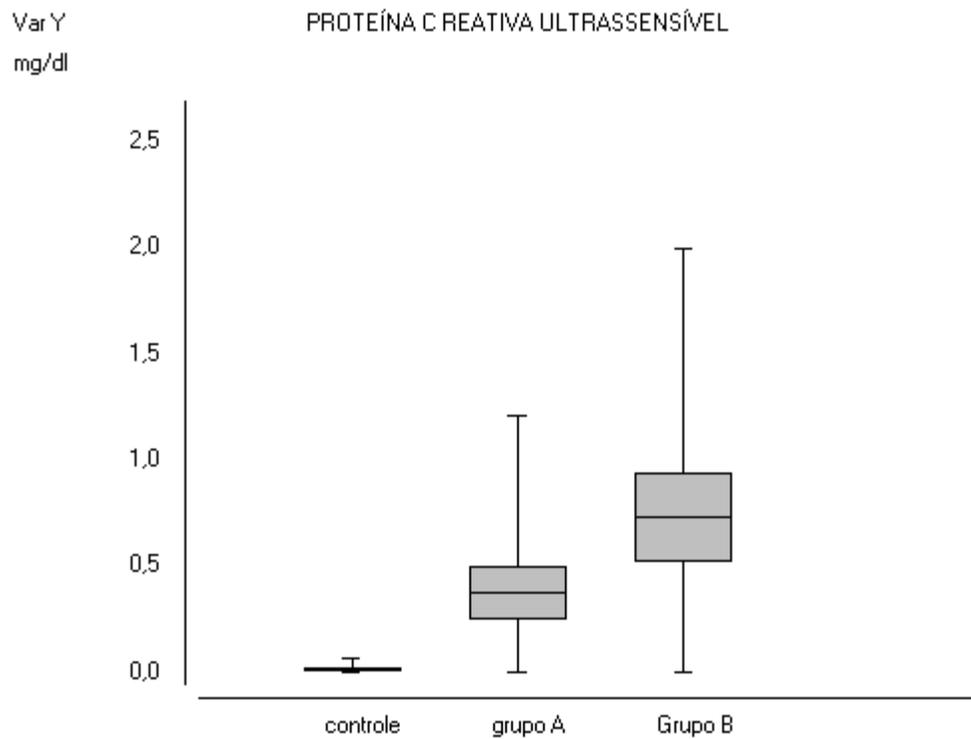
**Tabela 7** - Níveis séricos dos marcadores do Grupo B

Marcadores	Grupo B	
	Média	DP
<b>Marcadores inflamatórios e da coagulação</b>		
PCRus	0,73 mg/dl	0,79
Fibrinogênio	367,80 mg/dl	120,21
Homocisteína	11 $\mu$ mol/l	5,14
<b>Marcadores de estresse oxidativo</b>		
Catalase	7,53g/ml/min	2,94
Glutationa	8,93 mg/ml	2,05
Superóxido dismutase	5,08 U/mg ptn/min	2,19
<b>Marcadores de disfunção endotelial</b>		
Nitrito	1,83 $\mu$ M	1,8

Fonte: Protocolo de pesquisa

Foi realizado o teste de Mann-Whitney para avaliar a diferença entre as amostras.

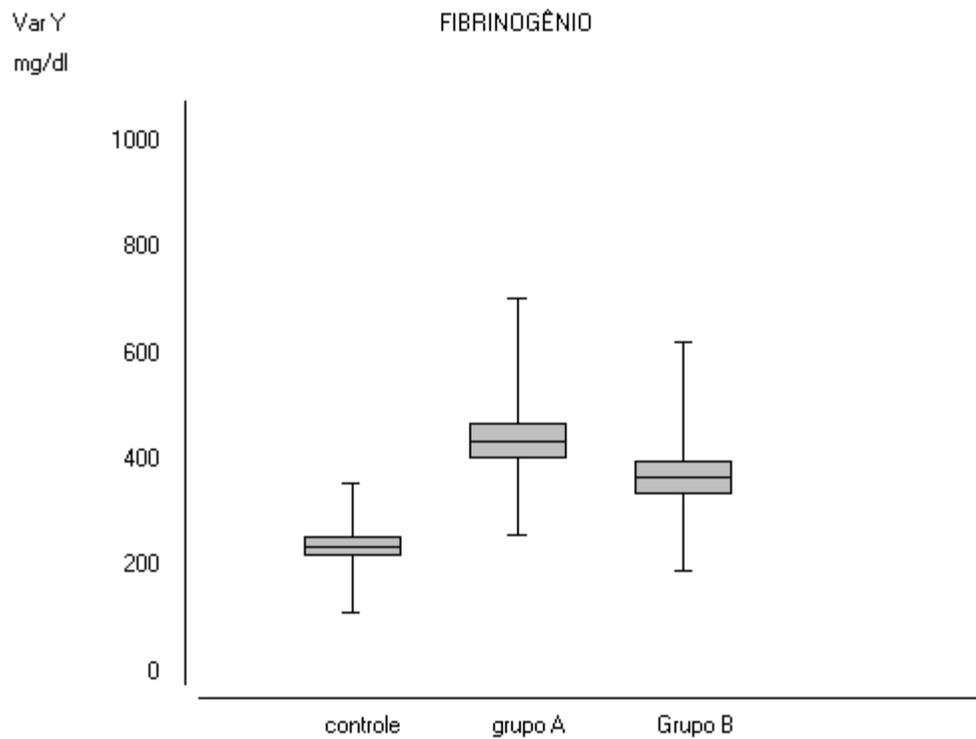
A avaliação da proteína C reativa ultrasensível (PCRus) nos Grupos Controle, Grupo A e B, mostrou  $p < 0,05$  entre os Grupos C e A e C e B e entre os Grupos A e B não houve diferença estatística significativa. Figura 2.



**Figura 2** - Diferença entre as amostras de PCRus pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte : protocolo de pesquisa

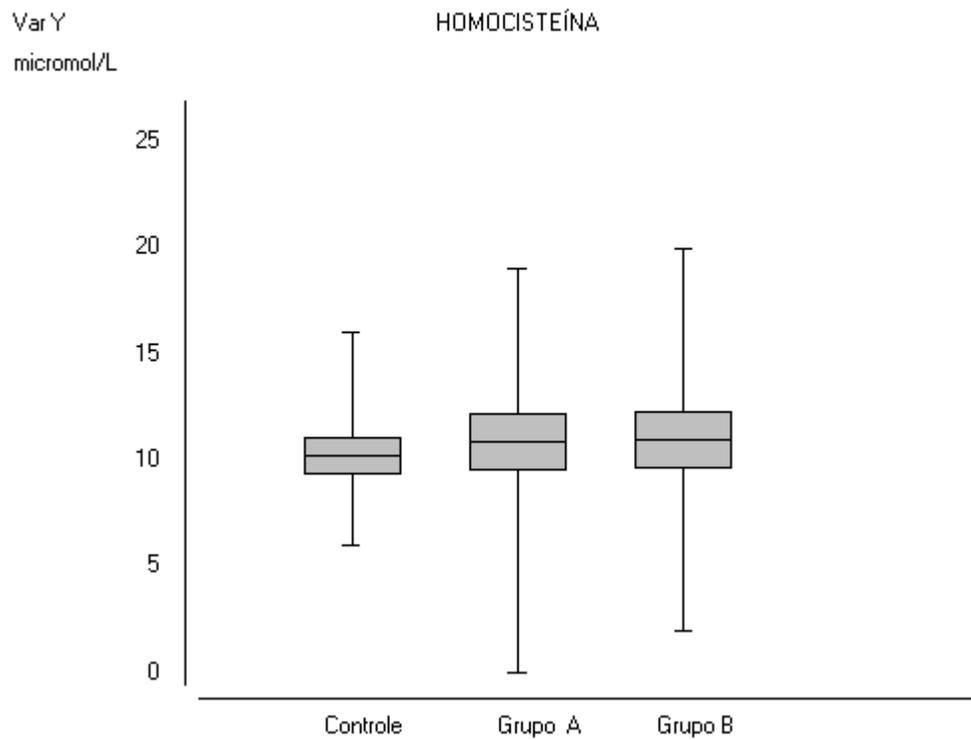
A avaliação do fibrinogênio (Fb) nos Grupos Controle (C), Grupo A e B mostrou  $p < 0,05$  entre os Grupos C e A, C e B e entre os Grupos A e B não houve diferença estatística significativa. Figura 3.



**Figura 3** - Diferença entre as amostras de Fb pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte : protocolo de pesquisa

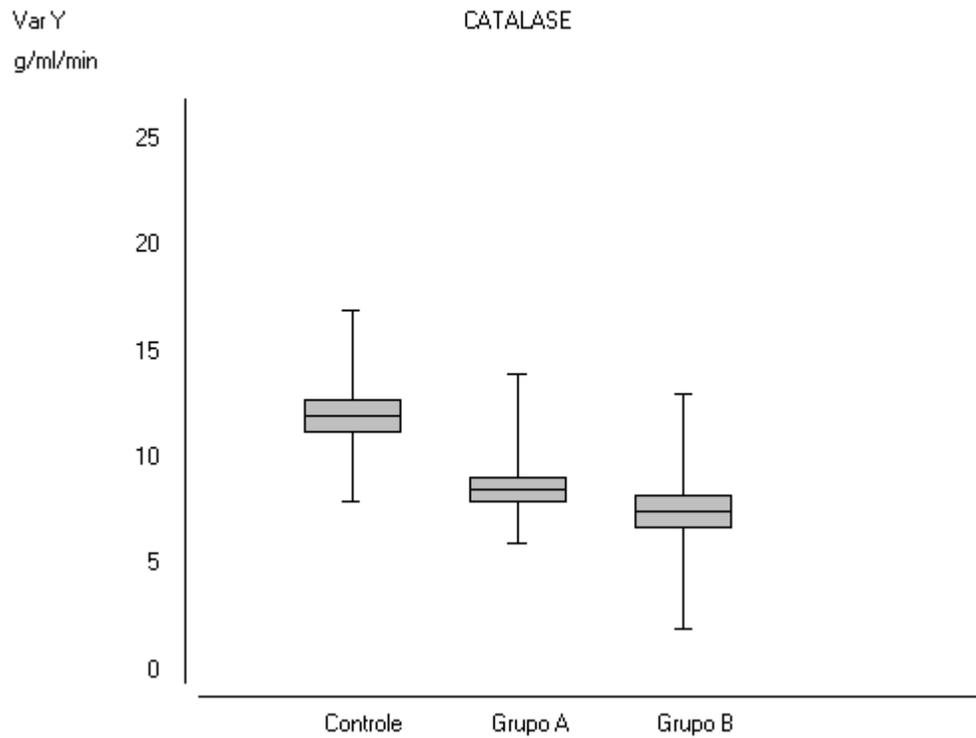
A avaliação da homocisteína (He) não mostrou diferença estatística entre os Grupos C e A, C e B, tendo o valor do  $p > 0,05$ . Figura 4.



**Figura 4** - Diferença entre as amostras de He pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte : protocolo de pesquisa

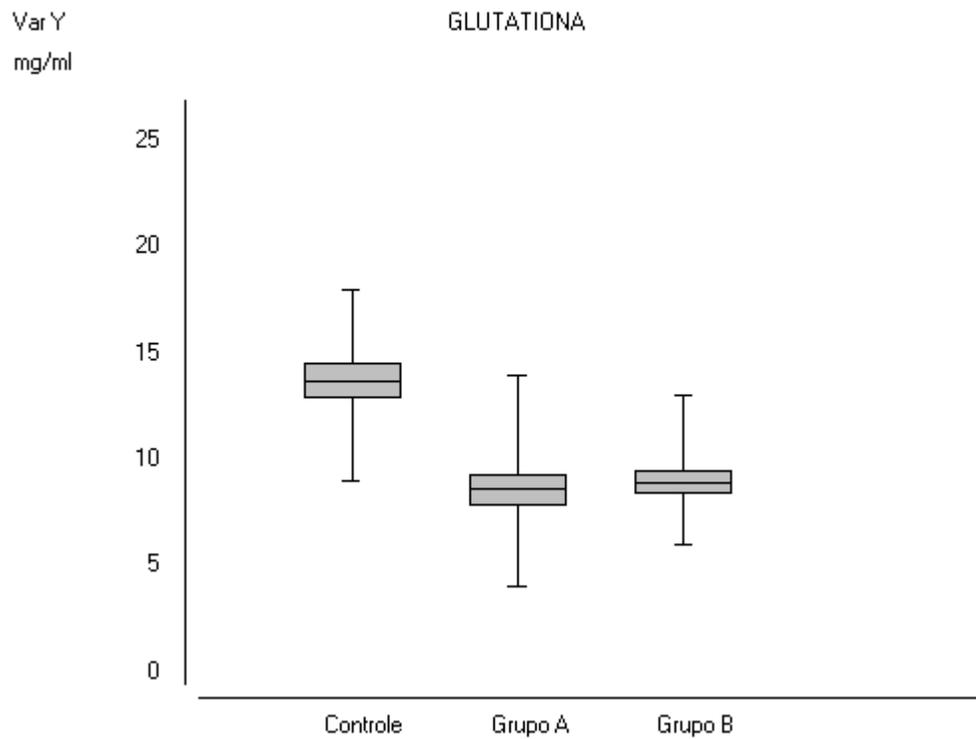
A avaliação da catalase (Cat) mostrou  $p < 0,05$  entre os Grupos C e A, C e B e entre A e B não houve diferença estatística. Figura 5.



**Figura 5** - Diferença entre as amostras de CAT pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte : protocolo de pesquisa

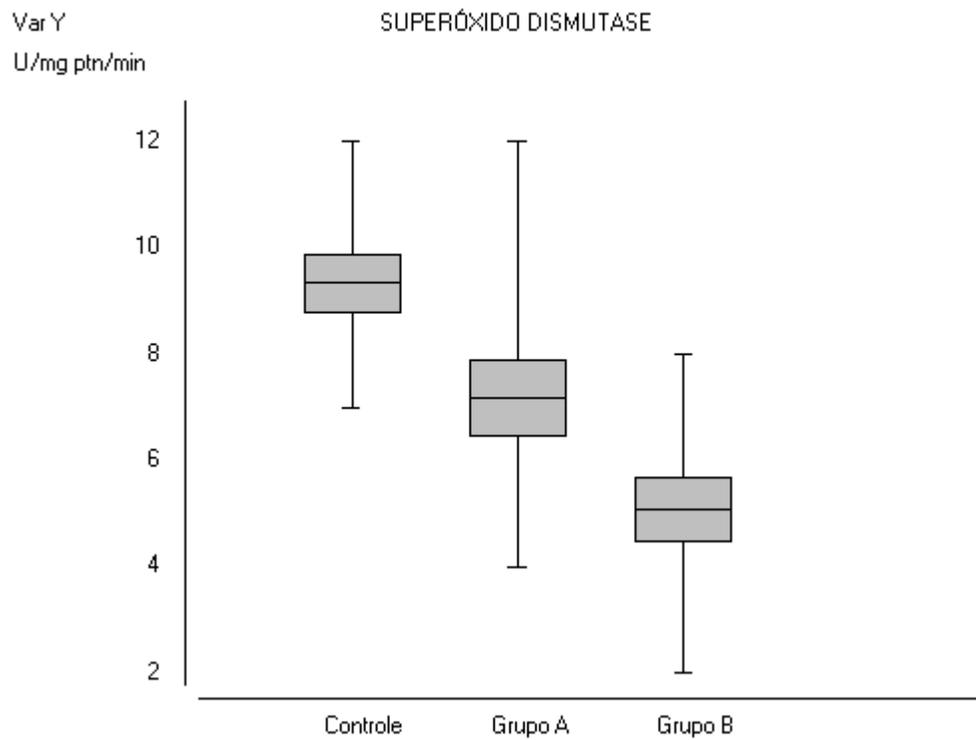
A avaliação da glutathiona (GSH) mostrou  $p < 0,05$  entre os Grupos C e A, C e B e entre A e B não houve diferença estatística. Figura 6.



**Figura 6** - Diferença entre as amostras de GSH pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte : protocolo de pesquisa

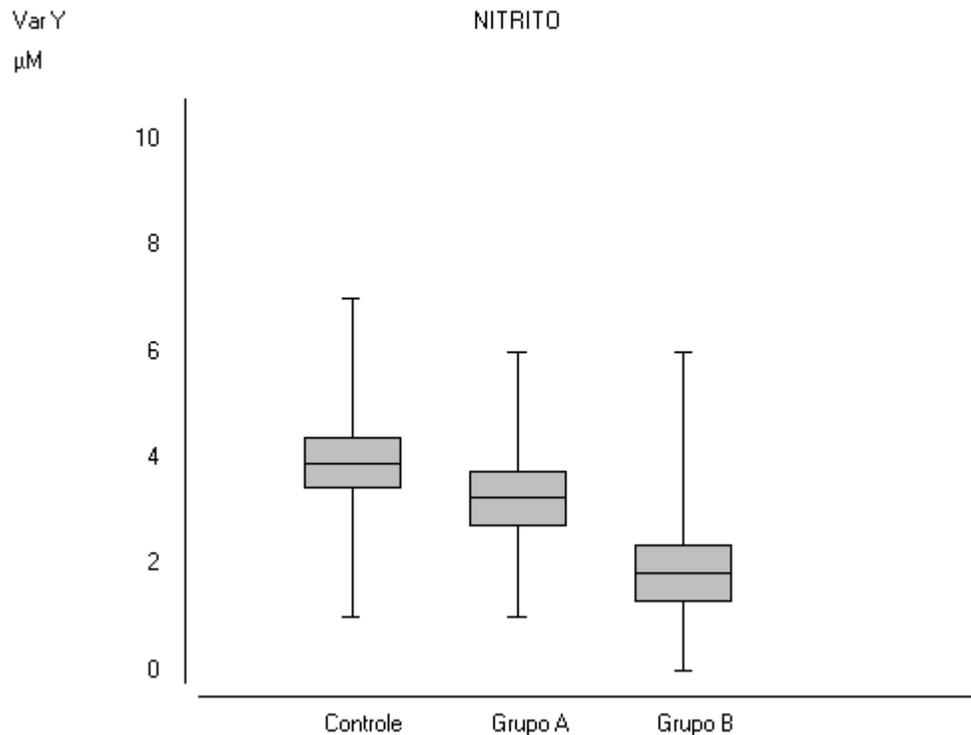
A avaliação da superóxido dismutase (SOD) mostrou  $p < 0,05$  entre os Grupos C e A, C e B e entre A e B não houve diferença estatística. Figura 7.



**Figura 7-** Diferença entre as amostras de SOD pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte : Protocolo de pesquisa.

A avaliação do nitrito mostrou  $p < 0,05$  entre os Grupos C e B e entre C e A não houve diferença estatística . Figura 8.



**Figura 8** - Diferença entre as amostras de Nitrito pelo teste de Mann-Whitney.

Fonte : Protocolo de pesquisa.

Foi utilizado o teste de regressão logística múltipla, com a finalidade de determinar a dependência de uma variável em relação a outra variável chamada de independente ou preditora.

Quando realizado o teste de regressão logística múltipla tendo como variáveis os fatores de risco conhecidos ou clássicos da DAOP (tabagismo, diabetes melito, hipercolestolemia e hipertensão arterial), relacionando entre si e com o índice tornozelo-braquial, o valor do Qui-

Quadrado ( $X^2$ ) não foi significativo ( $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade no teste de regressão logística múltipla, demonstrado não haver relação de dependência entre os mesmos.

As dosagens da PCRus usadas como variável dependente em relação a outras variáveis independentes, os fatores de risco conhecidos ou clássicos (tabagismo, diabetes melito, colesterol total, LDL, triglicerídeos e hipertensão arterial), o valor do Qui-Quadrado ( $X^2$ ) não foi significativo ( $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade no teste de regressão logística múltipla, demonstrado não haver uma relação de dependência entre a PCRus e os fatores de risco clássicos da DAOP nos Grupos A e B.

Para as dosagens do fibrinogênio, tanto nos Grupos A e B, como variável dependente em relação a outras variáveis independentes (tabagismo, diabetes melito, colesterol total, LDL, triglicerídeos e hipertensão arterial) o valor Qui-Quadrado ( $X^2$ ) não foi significativo  $p > 0,05$ , aceitando-se a hipótese de nulidade no teste de regressão logística múltipla, demonstrado não haver uma relação de dependência. Para a realização deste teste foi feito um ponto de corte entre o fibrinogênio do Grupo A e o Controle obtendo o valor de 288 mg/dl, com sensibilidade de 0,867 e especificidade de 0,867 e do Grupo B com o controle tendo o valor de 305 mg/dl, com sensibilidade de 0,733 e especificidade de 0,867.

As dosagens da atividade da catalase como variável dependente, tanto nos grupos A e B, em relação a outras variáveis independentes ( tabagismo, diabetes melito, colesterol total, LDL, triglicerídeos e hipertensão arterial) apresentaram o valor do Qui-Quadrado ( $X^2$ ) não significativo ( $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade no teste de regressão logística múltipla, demonstrado não haver uma relação de dependência. Para a realização deste teste foi feito um ponto de corte entre a catalase do Grupo A e o Controle tendo valor de 10,73 g/ml/min , com sensibilidade de 0,867 e especificidade de 0,667 e do Grupo B com o controle obtendo o valor de 10,19 g/ml/min, com sensibilidade de 0,867 e especificidade de 0,667.

Quando utilizado as dosagens da glutathione, tanto nos Grupos A e B, como variável dependente em relação a outras variáveis independentes ( tabagismo, diabetes melito, colesterol total, LDL, triglicerídeos e hipertensão arterial) o valor do Qui-Quadrado ( $X^2$ ) não foi

significativo ( $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade no teste de regressão logística múltipla, demonstrado não haver uma relação de dependência. Para a realização deste teste foi feito um ponto de corte entre a glutatona do Grupo A e o Controle obtendo o valor de 9,13 mg/ml, com sensibilidade de 0,733 e especificidade de 0,867 e do Grupo B com o Controle tendo o valor de 13,40 mg/ml, com sensibilidade de 1,0 e especificidade de 0,667.

A atividade da superóxido dismutase, tanto nos Grupos A e B, como variável dependente em relação a outras variáveis independentes (tabagismo, diabetes melito, colesterol total, LDL, triglicerídeos e hipertensão arterial) apresentou o valor do Qui-Quadrado ( $X^2$ ) não significativo ( $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade no teste de regressão logística múltipla, demonstrado não haver uma relação de dependência entre esses marcadores da DAOP. Para a realização deste teste foi feito um ponto de corte entre a superóxido dismutase do Grupo A e o Controle no valor de 6,67 U/mg ptn/min, com sensibilidade de 0,583 e especificidade de 1,0 e do Grupo B com o Controle tendo o valor de 6,48 U/mg ptn/min com sensibilidade de 0,750 e especificidade de 1,0.

As dosagens do nitrito como variável dependente nos Grupos A e B, em relação a outras variáveis independentes (tabagismo, diabetes melito, colesterol total, LDL, triglicerídeos e hipertensão arterial) mostrou o valor do Qui-Quadrado ( $X^2$ ) não significativo ( $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade no teste de regressão logística múltipla, demonstrado não haver uma relação de dependência entre eles. Para a realização deste teste foi feito um ponto de corte entre o nitrito do Grupo A com o Controle obtendo o valor de 2,04  $\mu$ M, com sensibilidade de 0,500 e especificidade de 0,750 e do Grupo B com o Controle obtendo o valor de 3,75  $\mu$ M com sensibilidade de 0,833 e especificidade de 0,750.

Quando relacionadas as dosagens dos pacientes do Grupo A, tendo como variável dependente a PCRus em relação a outras variáveis independentes (fibrinogênio, catalase, glutatona, superóxido dismutase e nitrito) observa-se que a catalase apresenta um coeficiente de determinação  $R^2 = 41,68\%$  e  $p < 0,0091$ ; o fibrinogênio um coeficiente de determinação  $R^2 = 16,81\%$  e  $p < 0,0054$ ; a superóxido dismutase um coeficiente de determinação  $R^2 = 3,07\%$ ,  $p <$

0,0009; o nitrito um coeficiente de determinação  $R^2 = 0,21\%$  e  $p < 0,0026$ , a glutaciona um coeficiente de determinação  $R^2 = 2,57\%$  e  $p < 0,02$  demonstrando que as variáveis independentes têm relação com a variável dependente PCRus, no teste de seleção progressiva (*stepwise*). Tabela 8.

**Tabela 8** - Proteína C reativa ultrasensível como variável dependente do Grupo A.

Var. Dependente (Y): PCRus	Grupo A			
	$R^2$	Varição $R^2$	p-valor	Coluna Incluída
Col: 5	41,68%	41,68%	0,0091	Catalase (5)
Cols: 5, 3	58,49%	16,81%	0,0054	Fibrinogênio (3)
Cols: 5, 3, 9	61,56%	3,07%	0,0009	Superóxido Dismutase (9)
Cols: 5, 3, 9, 11	61,77%	0,20%	0,0026	Nitrito (11)
Cols: 5, 3, 9, 11, 7	64,34%	2,57%	0,0278	Glutaciona (7)

Fonte: Protocolo de pesquisa

Nos pacientes do Grupo B, tendo como variável dependente a PCRus em relação a outras variáveis independentes (fibrinogênio, catalase, glutaciona, superóxido dismutase e nitrito) observa-se que a catalase apresenta um coeficiente de determinação  $R^2 = 11,60\%$  e  $p < 0,03$  e nas outras variáveis o valor do R (regressão) não foi significativo ( $p > 0,05$ ), demonstrando que o fibrinogênio, glutaciona, superóxido dismutase e nitrito são variáveis independentes, não tendo relação com a variável dependente PCRus no teste de seleção progressiva (*stepwise*). Tabela 9.

**Tabela 9** - Proteína C reativa ultrasensível como variável dependente do grupo B.

Var. Dependente (Y): PCRus	Grupo B			
	$R^2$	Varição $R^2$	p-valor	Coluna Incluída
Cols: 6,	11,60%	11,60%	0,038	Catalase (6)

Fonte: Protocolo de pesquisa

Nas dosagens dos pacientes do Grupo A, tendo como variável dependente o fibrinogênio em relação a outras variáveis independentes (PCRus, catalase, glutaciona, superóxido dismutase e nitrito), observa-se que o valor do coeficiente de determinação  $R^2 = 30,98\%$  e  $p < 0,02$  foi significativo apenas para PCRus, demonstrando que as outras variáveis independentes não têm

relação com a variável dependente fibrinogênio no teste de seleção progressiva (*stepwise*).  
Tabela 10.

**Tabela 10** - Fibrinogênio como variável dependente do Grupo A.

Var. Dependente (Y): Fibrinogênio	Grupo A			
	R <sup>2</sup>	Varição R <sup>2</sup>	p-valor	Coluna Incluída
Col: 1	30,98%	30,98%	0,0297	PCRus(1)

Fonte: Protocolo de pesquisa

Nos pacientes do Grupo B, tendo como variável dependente o fibrinogênio em relação a outras variáveis independentes ( PCRus, catalase, glutaciona, superóxido dismutase e nitrito) verifica-se que a catalase apresenta o valor do coeficiente de determinação  $R^2 = 19,38\%$  e  $p < 0,02$ ; a glutaciona o coeficiente de determinação  $R^2 = 16,56\%$  e  $p < 0,01$ ; a superóxido dismutase apresenta um coeficiente de determinação  $R^2 = 1,4\%$  e  $p < 0,03$ ; o nitrito um coeficiente de determinação  $R^2 = 11,26\%$  e  $p < 0,01$ , tendo a PCRus um R (regressão) não significativo ( $p > 0,05$ ), demonstrando que as outras variáveis independentes têm relação com a variável dependente fibrinogênio no teste de seleção progressiva (*stepwise*). Tabela 11.

**Tabela 11**- Fibrinogênio como variável dependente do Grupo B.

Var. Dependente (Y): Fibrinogênio	Grupo B			
	R <sup>2</sup>	Varição R <sup>2</sup>	p-valor	Coluna Incluída
Cols: 6	19,38%	19,38%	0,0267	Catalase (6)
Cols: 6, 8	35,94%	16,56%	0,0159	Glutaciona (8)
Cols: 6, 8, 10,	37,34%	1,40%	0,0334	Superóxido Dismutase (10)
Cols: 6, 8, 10,12,	48,60%	11,26%	0,0157	Nitrito (12)

Fonte: Protocolo de pesquisa

A atividade da catalase nos pacientes do grupo A, como variável dependente em relação a outras variáveis independentes (PCRus, fibrinogênio, glutaciona, superóxido dismutase e nitrito)

mostra que a PCRus apresenta o valor do coeficiente de determinação  $R^2=41,68\%$  e  $p < 0,009$ ; a superóxido dismutase o coeficiente de determinação  $R^2= 1,17\%$  e  $p < 0,03$ , demonstrando que estas duas variáveis independentes têm relação com a variável dependente catalase e que as outras variáveis independentes não tem relação com a variável dependente catalase no teste de seleção progressiva (*stepwise*). Tabela 12.

**Tabela 12** - Catalase como variável dependente do Grupo A.

Var. Dependente (Y): Catalase	$R^2$	Variação $R^2$	Grupo A	
			p-valor	Coluna Incluída
Col: 1	41,68%	41,68%	0,0091	PCRus(1)
Cols: 1, 9,	42,85%	1,17%	0,0344	Superóxido Dismutase (9)

Fonte: Protocolo de pesquisa

Nos pacientes do Grupo B, tendo como variável dependente a catalase em relação a outras variáveis independentes (PCRus, fibrinogênio, glutaciona, superóxido dismutase e nitrito) o valor do R (regressão) não foi significativo ( $p > 0,05$ ), demonstrando que as outras variáveis independentes não têm relação com a variável dependente catalase no teste de seleção progressiva (*stepwise*).

Nos pacientes do Grupo A, tendo como variável dependente a glutaciona em relação a outras variáveis independentes ( PCRus, fibrinogênio, catalase, superóxido dismutase e nitrito) observa-se que o nitrito apresenta coeficiente de determinação  $R^2=11,77\%$  e  $p < 0,03$ ; a catalase um coeficiente de determinação  $R^2= 6,02\%$  e  $p < 0,04$  e a PCRus teve o valor do coeficiente de determinação  $R^2= 3,28\%$  e  $p < 0,009$ , demonstrando que as outras variáveis independentes não têm relação com a variável dependente glutaciona no teste de seleção progressiva (*stepwise*). Tabela 13.

**Tabela 13** - Glutaciona como variável dependente do Grupo A.

Var. Dependente (Y): Glutaciona	$R^2$	Variação $R^2$	Grupo A	
			p-valor	Coluna Incluída
Cols:11,	11,77%	11,77%	0,0374	Nitrito (11)
Cols: 11, 5,	17,79%	6,02%	0,0454	Catalase (5)

Cols: 11, 5, 1,	21,07%	3,28%	0,0393	PCRus (1)
-----------------	--------	-------	--------	-----------

Fonte: Protocolo de pesquisa

Os níveis séricos da glutathione nos pacientes do Grupo B, como variável dependente em relação a outras variáveis independentes ( PCRus, fibrinogênio, catalase, superóxido dismutase e nitrito) apresenta coeficiente de Regressão ( F) não significativo (  $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade, demonstrando que a glutathione é uma variável independente no teste de seleção progressiva (*stepwise*).

Nos Grupos A e B, a atividade da superóxido dismutase como variável dependente em relação a outras variáveis independentes ( PCRus, fibrinogênio, glutathione, catalase e nitrito) apresenta um coeficiente de Regressão (F) não significativo (  $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade, demonstrando que a superóxido dismutase é uma variável independente no teste de seleção progressiva (*stepwise*).

Nos pacientes do Grupo A, o nitrito como variável dependente em relação a outras variáveis independentes ( PCRus, fibrinogênio, glutathione, catalase e superóxido dismutase) observa-se que a glutathione apresenta um coeficiente de determinação  $R^2=34,40\%$  e  $p < 0,008$ ; a superóxido dismutase coeficiente de determinação  $R^2 = 2,88\%$ ,  $p < 0,0018$  e a PCRus um coeficiente de determinação de  $R^2 = 0,38\%$  e  $p < 0,03$ , demonstrando que estas variáveis independente tem relação com a variável dependente nitrito no teste de seleção progressiva (*stepwise*), o mesmo não ocorrendo com o fibrinogênio e a catalase. Tabela 14.

**Tabela 14-** Nitrito como variável dependente do Grupo A.

Var. Dependente (Y): Nitrito	Grupo A			
	R <sup>2</sup>	Varição R <sup>2</sup>	p-valor	Coluna Incluída
Cols: 7,	34,40%	34,40%	0,0008	Glutathione (7)
Cols: 7, 9,	37,28%	2,88%	0,0018	Superóxido Dismutase (9)
Cols: 7, 9, 1,	37,66%	0,38%	0,0364	PCRus (1)

Fonte: Protocolo de pesquisa

As dosagens do nitrito nos pacientes do Grupo B, como variável dependente em relação a outras variáveis independentes ( PCRus, fibrinogênio, glutatona, catalase e superóxido dismutase, mostra que a glutatona apresenta um coeficiente de determinação  $R^2 = 18,84\%$  e  $p < 0,03$ , demonstrando que as outras variáveis independentes não têm relação com a variável dependente nitrito no teste de seleção progressiva (*stepwise*). Tabela 15.

**Tabela 15** - Nitrito como variável dependente do Grupo B.

Var. Dependente (Y): Nitrito	Grupo B			
	$R^2$	Varição $R^2$	p-valor	Coluna Incluída
Cols: 8	18,84%	18,84%	0,0338	Glutaciona (8)

Fonte: Protocolo de pesquisa

Quando utilizado as dosagens dos pacientes do Grupo A, tendo como variável dependente a PCRus em relação a variável independente (índice tornozelo-braquial e idade) verifica-se que o ITB teve um coeficiente de determinação  $R^2 = 8,88\%$  e  $p < 0,02$  e a idade um coeficiente de determinação  $R^2 = 1,32\%$  e o valor do  $p < 0,03$ , demonstrando maior relação de dependência com o índice tornozelo-braquial do que com a idade no teste de seleção progressiva (*stepwise*). Tabela 16.

**Tabela 16** – PCRus com variável dependente do Grupo A.

Var. Dependente (Y): PCRus	Grupo A			
	$R^2$	Varição $R^2$	p-valor	Coluna Incluída
Cols: 13,	8,88%	8,88%	0,02	ITB (13)
Cols: 13,15	10,20%	1,32%	0,03	IDADE (15)

Fonte: Protocolo de pesquisa

Nos pacientes do Grupo A, tendo como variável dependente o fibrinogênio em relação a variável independente idade, observa-se que esta teve um coeficiente de determinação  $R^2 = 13,28\%$  e  $p < 0,02$ , demonstrando que o fibrinogênio apresenta relação de dependência com a idade no teste de seleção progressiva (*stepwise*). Tabela 17.

**Tabela 17-** Fibrinogênio como variável dependente do Grupo A.

Var. Dependente (Y): Fibrinogênio	R <sup>2</sup>	Variação R <sup>2</sup>	Grupo A	
			p-valor	Coluna Incluída
Cols: 15	13,28%	13,28%	0,02	IDADE (15)

Fonte: Protocolo de pesquisa

Quando utilizado as dosagens dos pacientes do Grupo A, tendo como variável dependente a catalase em relação a variável independente índice tornozelo-braquial, observa-se que este teve um coeficiente de determinação  $R^2 = 15,67\%$  e  $p < 0,01$ , demonstrando que a catalase apresenta relação de dependência com o ITB no teste de seleção progressiva (*stepwise*). Tabela 18.

**Tabela 18 -** Catalase como variável dependente do Grupo A.

Var. Dependente (Y): Catalase	R <sup>2</sup>	Variação R <sup>2</sup>	Grupo A	
			p-valor	Coluna Incluída
Cols: 13	15,67%	15,67 %	0,01	ITB (13)

Fonte: Protocolo de pesquisa

As dosagens do fibrinogênio, glutatona, superóxido dismutase e nitrito dos pacientes do Grupo A, como variável dependente em relação a variável independente índice tornozelo-braquial, mostra que coeficiente de Regressão ( F ) não é significativo (  $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade, demonstrando que não apresentam relação de dependência com o ITB no teste de seleção progressiva (*stepwise*).

As dosagens da catalase, glutatona, superóxido dismutase e nitrito dos pacientes do Grupo A, como variável dependente em relação a variável independente idade, apresenta o

coeficiente de Regressão ( F) não significativo (  $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade, demonstrando que não apresentam relação de dependência com a idade no teste de seleção progressiva (*stepwise*).

Nos pacientes do Grupo B, as dosagens da PCRus, fibrinogênio, catalase, glutational, superóxido dismutase e nitrito, como variável dependente em relação as variáveis independentes (índice tornozelo-braquial e idade) verifica-se que o coeficiente de Regressão (F) não é significativo (  $p > 0,05$ ), aceitando-se a hipótese de nulidade, demonstrando que não apresentam relação de dependência com o ITB e a idade no teste de seleção progressiva (*stepwise*).

Neste estudo, o índice tornozelo-braquial não apresentou relação de dependência com a idade no teste de regressão linear, tendo o valor do  $p > 0,05$ .

Foi realizado o teste de comparação das regressões lineares entre os pacientes do Grupo A e B, com a finalidade de determinar se os valores do coeficiente de regressão e do intercepto das regressões provieram da mesma população, tendo como resultado  $p < 0,0001$ , demonstrando que são populações distintas .

Foi realizado o Teste do Crivo (Screening Test) com a finalidade de interpretar os exames (PCRus, fibrinogênio, glutational, catalase, superóxido dismutase e nitrito) com base em probabilidade condicional (regra de Bayes) para calcular a evidência da DAOP.

O exame da PCRus teve uma sensibilidade (proporção de indivíduos doentes cujo teste é positivo) de 93%, uma especificidade (proporção de indivíduos sem a doença cujo teste é negativo) de 73%, o valor preditivo do teste positivo ( probabilidade do indivíduo ter a doença quando o teste for positivo ) foi de 88 % e o valor preditivo do teste negativo (probabilidade do indivíduo não ter a doença quando o teste for negativo) foi de 85%. A acurácia ( medida de exatidão do teste ) foi de 88% e o + LR (Likelihood Radio) positiva (chance de doença quando o teste for positivo) é de quatro vezes, e o – LR (Likelihood Radio) negativa (chance de doença quando o teste for negativo) é de 0,09, menor que uma vez. O ponto de corte foi de 0,1 mg/dl.

A dosagem do fibrinogênio apresentou uma sensibilidade de 83%, uma especificidade de 87%, o valor preditivo do teste positivo foi de 93 % e o valor preditivo do teste negativo foi de 85%. A acurácia do teste foi de 88% e o + LR (Likelihood Ratio) positiva é de seis vezes, e o - LR (Likelihood Ratio) negativa é de 0,19, menor que uma vez. O ponto de corte foi de 288 mg/dl.

A avaliação da glutatona mostrou uma sensibilidade de 97%, uma especificidade de 67%, o valor preditivo do teste positivo foi de 85 % e o valor preditivo do teste negativo foi de 90%. A acurácia do teste foi de 87% e o + LR (Likelihood Ratio) positiva é de três vezes, e o - LR (Likelihood Ratio) negativa é de 0,05, menor que uma vez. O ponto de corte foi de 13,40 mg/ml.

No teste com a catalase a sensibilidade foi de 80%, a especificidade de 67%, o valor preditivo do teste positivo foi de 83 % e o valor preditivo do teste negativo de 63%. A acurácia do teste foi de 76% e o + LR (Likelihood Ratio) positiva é de duas vezes, e o - LR (Likelihood Ratio) negativa é de 0,30, menor que uma vez. O ponto de corte foi de 10,19 g/ml/min.

A dosagem da superóxido dismutase apresentou uma sensibilidade de 57%, uma especificidade de 100%, o valor preditivo do teste positivo foi de 100 % e o valor preditivo do teste negativo foi de 53%. A acurácia do teste foi de 71% e o + LR (Likelihood Ratio) positiva é de oito vezes, e o - LR (Likelihood Ratio) negativa é de 0,43, menor que uma vez. O ponto de corte foi de 6,38 U/mg ptn/min.

O exame do nitrito apresentou uma sensibilidade de 73%, especificidade de 80%, o valor preditivo do teste positivo foi de 88 % e o valor preditivo do teste negativo de 60%. A acurácia do teste foi de 76% e o + LR (Likelihood Ratio) positiva é quatro vezes, e o - LR (Likelihood Ratio) negativa é de 0,33, menor que uma vez. O ponto de corte foi de 3,75  $\mu$ M.

## **6 DISCUSSÃO**

Vários estudos na Literatura Médica, com desenhos diversos têm demonstrado alterações dos marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (SELVIN; ERLINGER, 2004 ; DOHI et al. 2007; LOFFREDO et al. 2007; MACDERMOTT et al. 2008). Entretanto, os mecanismos pelos quais eles desenvolvem a doença não estão bem elucidados, especulando-se que a inflamação e o estresse oxidativo levariam a produção do ânio superóxido, que causaria a inativação da bioatividade do óxido nítrico, contribuindo para o desenvolvimento da arteriosclerose (LOFFREDO et al. 2007).

Este Trabalho procura investigar a existência de relação entre os fatores de risco conhecidos ou clássicos para a doença arteriosclerótica como idade, diabetes melito, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, tabagismo com os marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial na DAOP. Além disso, investiga a existência de relação entre os

biomarcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial e se há relação entre eles conforme o grau e evolução da DAOP, na busca de evidências para a hipótese de que a inflamação e o estresse oxidativo ocorram antes da deficiência orgânica do endotélio na sucessão de eventos do processo patogênico da arteriosclerose, servindo como marcadores da doença, de sua evolução e de suas complicações, consolidando sua utilização na prática clínica, especialmente nos indivíduos que não apresentam fatores de risco vasculares tradicionais, selecionando pacientes que podem ser diagnosticados e tratados precocemente.

Foram estudados 30 pacientes com DAOP dos membros inferiores divididos em dois grupos, o primeiro com doença em fase inicial ou intermediária (Fontaine IIa) e o segundo com doença em fase avançada (Fontaine IIb e III), além do grupo controle. A idade média foi de 53,53 (DP 5,05) anos no grupo controle, 59,33 (DP 8,4) anos no grupo A e 65,4 (DP 6,4) no grupo B. O tamanho da amostra e a faixa etária se assemelham a outros trabalhos que investigam a relação entre marcadores inflamatórios, estresse oxidativo e disfunção endotelial, como o de Loffredo et al. (2007) que estudaram 25 pacientes com idade entre 40 e 80 anos, portadores de DAOP, investigando a relação entre estresse oxidativo, utilizando como marcador o 8-Hydroxy-2deoxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) e a disfunção endotelial, tendo como marcadores o nitrito e a dilatação média da artéria braquial após teste de hiperemia reativa avaliada por ultrassom. De Haro et al. (2008) avaliaram a relação entre níveis plasmáticos de PCRus e do fibrinogênio com disfunção endotelial, tendo como marcador a dilatação média da artéria braquial após teste de hiperemia reativa avaliada por ultrassom em pacientes portadores de DAOP, com idade média de 65 (DP12) anos. Daskalopoulou et al. (2008) investigaram a associação entre índice tornozelo-braquial e fatores de risco vascular em pacientes com DAOP e obteve como idade média dos doentes 68,7 (DP 10,6) anos. Arslan et al. (2009) estudaram 21 doentes com DAOP com média de idade de 53,05 (10,8) anos, medindo o estresse oxidativo através da dosagem da catalase, glutathione e superóxido dismutase, e Martinez Aguilar et al. (2009) estudaram a redução do óxido nítrico e da proteína C reativa em 30 pacientes com DAOP que fizeram uso de estatinas. Portanto, observa-se que o tamanho da amostra e a faixa etária dos grupos estudados, encontram-se compatíveis com os diversos estudos relacionados a este Trabalho.

A relação de dependência entre os fatores de risco tradicionais como tabagismo, diabetes melito, hipercolesterolemia e hipertensão arterial com os marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial apresentam resultados divergentes na Literatura Médica.

Brevetti et al. (2003) estudaram pacientes com DAOP relacionando disfunção endotelial, medida pela dilatação média da artéria braquial após teste de hiperemia reativa avaliada por ultrassom, com os marcadores inflamatórios (PCRus e fibrinogênio) e fatores clássicos cardiovasculares, além da gravidade da DAOP medida pelo ITB, não sendo observado relação com fatores de risco clássicos. O mesmo foi encontrado por De Haro et al. (2008) que não obtiveram correlação entre os marcadores inflamatórios PCRus e fibrinogênio e os de disfunção endotelial com os fatores de risco tradicionais como a idade ( $p = 0,89$ ), hipertensão arterial ( $p = 0,93$ ), hiperlipidemia ( $p = 0,87$ ), diabetes ( $p = 0,79$ ), tabagismo ( $p = 0,76$ ) e ITB ( $p = 0,78$ ). A diferença entre este Trabalho e os acima citados foi o critério usado para o marcador de disfunção endotelial, que neste estudo foi a dosagem sérica do nitrito, um metabólito do óxido nítrico e nos demais foi a dilatação média da artéria braquial após teste de hiperemia reativa avaliada por ultrassom. Daskalopoulou et al. (2008) relatam que a PCRus é um preditor de risco independente do diabetes melito e do índice tornozelo-braquial.

Entretanto, outros estudos mostram relação de dependência entre os fatores de risco vascular como diabetes, dislipidemia e hiperhomocisteinemia com estresse oxidativo (JEREMY; ANGELINE, 2004). O mesmo foi observado por Dohi et al. (2007) em estudo cujo objetivo foi avaliar as interrelações entre inflamação, através da mensuração plasmática da PCRus, com estresse oxidativo, pela dosagem urinária do 8 isoprostano e fatores de risco cardiovasculares tradicionais em 551 pacientes com idade de  $53 \pm 11$  anos, sendo 400 (72,59%) do sexo masculino e 151(27,40%) do sexo feminino, concluindo, assim, que os níveis de PCRus estão associados não somente com os fatores de risco cardiovasculares, mas também com o estresse oxidativo, havendo interrelação significativa entre inflamação, estresse oxidativo e fatores de risco cardiovasculares tradicionais. A diferença entre esses estudos e o presente Trabalho, ocorre no método de avaliação, pois neste a inflamação foi medida pelos níveis plasmáticos da PCRus e do fibrinogênio, enquanto que o estresse oxidativo foi medido pelos mecanismos de defesa antioxidantes, através da atividade enzimática da catalase, da superóxido dismutase e dosagem sérica da glutatona.

Neste Trabalho não foi observada relação de dependência entre os fatores de risco tradicionais como tabagismo, diabetes melito, hipercolesterolemia e hipertensão arterial com os marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial.

O índice tornozelo-braquial (ITB) foi utilizado para identificar os pacientes portadores da doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) e selecionar os grupos do estudo, demonstrando ser um método efetivo na identificação da doença ( HEISS et al. 2007 ; NORGREN et al. 2007; ELDRUP et al. 2006 ). Alguns trabalhos mostram que a prevalência da DAOP aumenta com a idade, verificando-se no estudo de Framingham e no NHANES uma associação com a idade a partir dos 70 anos, sendo que neste último a prevalência foi de 4,3% em pacientes com 40 anos e de 14,5% com 70 anos ou mais (MURITBTO et al. 1997; SELVIN; ERLINGER, 2004). Neste Trabalho o índice tornozelo-braquial não apresentou relação de dependência com a idade, tendo o valor do  $p > 0,05$ . Este resultado foi semelhante aos encontrados por Dohi et al. (2007); Daskalopoulou et al. (2008) e De Haro et al. (2008).

Quando relacionado o ITB com a variável dependente PCRus e catalase no Grupo A, o ITB apresentou coeficiente de determinação  $R^2 = 8,88\%$  e  $p < 0,05$  para a PCRus e um maior coeficiente de determinação  $R^2 = 15,67\%$  e  $p < 0,05$  para a catalase, sendo que o mesmo não ocorreu com as variáveis fibrinogênio, glutatona, superóxido dismutase e nitrito. Estes dados inferem associação entre os mecanismos da inflamação e do estresse oxidativo na patogenia da doença da DAOP, pois o ITB é um marcador da doença.

A relação entre PCRus e ITB foram relatados em outras publicações na Literatura Médica como o de MacDermott et al. (2003) que investigaram a relação do ITB e marcadores inflamatórios, identificando associação inversa entre ITB e PCRus. Unlu et al. (2006) observaram relação direta da PCRus com o índice tornozelo-braquial e Khawaja et al. (2007) relataram que níveis elevados de proteína C reativa ultrasensível e do fibrinogênio estão associados com ITB baixo. Entretanto, outros estudos não confirmam estes achados (MUSICANT et al. 2006; PARASKEVAS et al. 2009).

Este Trabalho mostra que os níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios estavam elevados nos dois grupos com DAOP, tanto o da PCRus quanto o do fibrinogênio com  $p < 0,05$ , demonstrando que os mesmos estão elevados desde a fase inicial da DAOP, não sendo observado diferença entre os grupos A e B.

Atualmente, um dos assuntos hoje mais debatidos sobre doença cardiovascular é se a proteína C-reativa (PCR), um componente da resposta inflamatória de fase aguda, é ou não um fator causal na patogênese da arteriosclerose. O grande apoio para o papel da PCRus na patogênese da arteriosclerose vem em grande parte de estudos epidemiológicos que observaram uma associação entre níveis elevados no plasma de PCRus e eventos cardiovasculares (SCIRICA; MORROW, 2006; DANESH; WHEELER; HIRSCHFIELD, 2004; RIDKER, 2007; PRADAHAN et al. 2008). A força do teste estatístico de tais associações é pelo menos tão robusto quanto a dos fatores de risco estabelecidos como hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia (RIDKER, 2007). Porém, a estatística não determina causalidade, os questionamentos sobre a PCR decorrem do fato de que a mesma poderá estar elevada em outros grupos de fatores de risco cardiovasculares múltiplos, como fumo, hipertensão, obesidade, falta de atividade física e baixo estado sócio-econômico (EVERETT et al. 2006 ). Ben-Yehuda (2007) faz críticas ao uso da PCRus como marcador de risco da doença cardiovascular citando vários estudos nos quais a dosagem da PCRus apresenta resultados modestos quando comparados com os fatores de risco tradicionais (WANG et al. 2006; KHERA et al. 2006; SATTAR et al. 2007).

O estudo JUPITER (Justification for the use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin ) demonstrou que o tratamento de pacientes com níveis plasmáticos elevados de PCRus e do colesterol podem reduzir a incidência da doença cardiovascular em pacientes assintomáticos, classificados como alto risco, em cerca de 44% e a mortalidade em 20% quando utilizada a terapia com estatinas para prevenção primária. O mesmo pode ser entendido para homens com idade igual ou maior que 50 anos e mulheres com idade maior ou igual a 60 anos que tenham níveis séricos elevados de PCRus e LDL normal ( MORA; MUSUNURU; BLUMENTHAL, 2009).

Os níveis plasmáticos da PCRus em pacientes com arteriosclerose subclínica e em estágios avançados não mostrou diferença significativa, o que indica que o exame é sensível para identificar pacientes de risco, mas não para monitorar a progressão da doença (SCHULZE et al. 2009). Estes resultados estão em consonância com os encontrados neste Trabalho, pois não houve diferença estatística entre os pacientes com patologia em fase inicial ou intermediária com os pacientes em fase avançada da DAOP.

A inflamação está presente em todas as fases da arteriosclerose, e diversas publicações referem o envolvimento da PCRus como um marcador de risco independente de eventos cardiovasculares, sendo que o estudo JUPITER dá evidências em seres humanos da participação ativa da PCRus no processo da arteriosclerose (DEVARAJ; SINGH; JIALAL, 2009). Essas informações estão de acordo com as observadas neste estudo, onde os níveis plasmáticos da PCRus estavam elevadas nos dois grupos de pacientes, tanto na fase inicial ou intermediária da doença como no estágio mais avançado, comportando-se como um marcador de risco independente para a DAOP.

Foi observado neste estudo uma relação de dependência do marcador de inflamação fibrinogênio com a idade, sendo que esses dados conferem com outras publicações na Literatura Médica (KAMATH; LIP, 2003; THE FIBRINOGEN STUDIES COLLABORATION, 2007; PARASKEVAS et al. 2008). Uma das hipóteses para sua explicação seria o aumento da atividade aterotrombótica induzida pelo fibrinogênio (RUMLEY et al. 2006).

O fibrinogênio não só parece predizer a severidade da DAOP, mas também serve como um marcador para desenvolvimento futuro da mesma. O aumento dos níveis de fibrinogênio plasmático de 1g/l estão associados com o aumento de duas vezes o risco de doença cardiovascular, mas as causas permanecem incertas, reduzindo os seus níveis diminuirá a incidência e progressão da DAOP (LANE et al. 2006; THE FIBRINOGEN STUDIES COLLABORATION, 2007; PARASKEVAS et al. 2008).

Neste Trabalho foi identificada relação de dependência entre os marcadores inflamatórios com os marcadores de estresse oxidativo e de disfunção endotelial. Na doença em fase inicial ou intermediária essa relação foi maior entre a PCRus e os três marcadores de estresse oxidativo, sendo a catalase com maior relação, tendo um coeficiente de determinação  $R^2 = 41,68\%$ , seguida da superóxido dismutase com coeficiente de determinação  $R^2 = 3,07\%$  e da glutatona com coeficiente de determinação  $R^2 = 2,57\%$ , apresentando um coeficiente de determinação final  $R^2 = 47,32\%$ . Nessa fase da doença a relação com a disfunção endotelial foi significativa com o valor do  $p = 0,0026$ , mais com pequeno coeficiente de determinação  $R^2 = 0,20\%$ .

Na doença em estágio mais avançado, IIB e III de acordo com a classificação de Fontaine (1964), o fibrinogênio foi o marcador inflamatório que apresentou maior relação de dependência com os marcadores de estresse oxidativo, sendo que destes a catalase, novamente, foi a que mais influenciou com coeficiente de determinação  $R^2 = 19,38\%$ , seguida da glutatona com coeficiente de determinação  $R^2 = 16,56\%$  e da superóxido dismutase com coeficiente de determinação  $R^2 = 1,40\%$ , apresentando coeficiente de determinação progressivo  $R^2 = 37,34\%$ . Nesse mesmo grupo quando utilizado a PCRus como variável dependente, a catalase foi quem influenciou no seu resultado, apresentando um coeficiente de determinação  $R^2 = 11,60\%$  e  $p < 0,03$ . Os marcadores inflamatórios apresentaram dependência dos marcadores de estresse oxidativo, tendo um coeficiente de determinação final  $R^2 = 48,94\%$ . A relação do fibrinogênio com marcador de disfunção endotelial nitrito foi maior nesse estágio da DAOP, com  $p = 0,0157$  e  $R^2 = 11,26\%$ , o que pode ser justificado pela doença em estágio mais avançado, levando a maior deficiência orgânica do endotélio. Estes achados sugerem a participação do estresse oxidativo no processo inflamatório na sequência de eventos da doença aterosclerótica, com coeficiente de determinação semelhante nos grupos A e B, com  $R^2 = 47,32\%$  e  $R^2 = 48,94\%$  respectivamente.

Neste Trabalho os marcadores de estresse oxidativo (catalase, glutatona e superóxido dismutase) estavam diminuídos nos dois grupos, sugerindo a sua participação na patogenia da DAOP. Foi observado a relação de dependência dos marcadores de estresse oxidativo com os marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial no grupo de DAOP inicial ou intermediária, verificando-se maior associação entre catalase e PCRus e glutatona e PCRus, com coeficiente de determinação  $R^2 = 41,62\%$  e  $p = 0,0091$  e coeficiente de determinação  $R^2 = 3,28\%$  e  $p = 0,039$

respectivamente, com coeficiente de determinação final  $R^2 = 44,90\%$ . A glutathione apresentou relação de dependência com o nitrito, tendo um coeficiente de determinação  $R^2 = 11,77\%$  e  $p = 0,03$ ; a superóxido dismutase não mostrou relação de dependência com os marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial, sendo considerada um preditor de risco independente. Também foi verificada dependência da catalase em relação a superóxido dismutase com coeficiente de determinação  $R^2 = 1,17\%$  e  $p = 0,03$  e dependência da glutathione em relação a catalase com  $R^2 = 6,02\%$  e  $p = 0,04$ . Esses resultados estão inseridos dentro do contexto do sistema de defesa antioxidante sanguíneo, que é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e  $O_2$ , podendo interferir na catalase (CAT) que atua na decomposição de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$ , e esta pode estar relacionada com a glutathione peroxidase (GSH-Px), que atua sobre peróxidos em geral ( $H_2O_2$ ), com utilização da glutathione como co-fator. A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo  $H_2O_2$  em eritrócitos humanos normais (SCOTT, 1991). A análise dessas informações mostram que os mecanismos de defesa antioxidantes estão diminuídos na DAOP, causados por uma maior produção ou menor inativação das espécies reativas de oxigênio.

Uma informação importante deste estudo, está relacionada com a relação de dependência entre marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo e de estresse oxidativo com marcadores inflamatórios entre os pacientes do Grupo A, que apresentam um coeficiente de determinação final  $R^2 = 47,32\%$  e de  $R^2 = 44,90\%$  respectivamente, demonstrando haver relação de dependência nas mesmas proporções entre inflamação e estresse oxidativo na fase inicial ou intermediária da DAOP. Quando se observa os pacientes do Grupo B, o fibrinogênio apresentou relação de dependência com os três marcadores de estresse oxidativo, com coeficiente de determinação progressivo  $R^2 = 37,34\%$ , a PCRus com coeficiente de determinação  $R^2 = 11,60\%$  em relação a catalase, apresentando coeficiente de determinação somados  $R^2 = 48,94\%$ , não se verificando relação de dependência entre estresse oxidativo e marcadores inflamatórios nesse grupo. A avaliação final de dependência dos marcadores inflamatórios em relação aos de estresse oxidativo dos grupos A e B mostra um coeficiente de determinação  $R^2 = 96,32\%$ , enquanto que

os marcadores de estresse oxidativo relacionados com os marcadores inflamatórios apresentam um coeficiente de determinação  $R^2 = 44,90\%$ .

Estes resultados inferem que os marcadores inflamatórios têm uma dependência de 96,32% em relação aos marcadores de estresse oxidativo, sugerindo que o estresse oxidativo predomina sobre a inflamação, corroborando para a hipótese de que o estresse oxidativo é o principal fator que desencadeia o processo inflamatório na patogênese da DAOP. O aumento dos marcadores inflamatórios na arteriosclerose é compatível com o conceito de que esta é uma doença inflamatória da parede vascular, iniciada e ampliada pelo estresse oxidativo (DOHI et al., 2007).

Neste estudo os níveis plasmáticos do marcador de disfunção endotelial nitrito estava diminuído no grupo B, de pacientes com DAOP avançada, estágio IIB e III da classificação de Fontaine (1964). Foi observada relação de dependência do nitrito com os marcadores de estresse oxidativo glutatona e superóxido dismutase, que apresentaram um coeficiente de determinação  $R^2 = 34,40\%$  e  $p = 0,0008$  e  $R^2 = 2,88\%$  e  $p = 0,0018$  respectivamente, e com o marcador inflamatório PCRus que teve um coeficiente de determinação  $R^2 = 0,38\%$  e  $p = 0,03$  no grupo A. O nitrito no grupo B teve relação de dependência com a glutatona que apresentou um coeficiente de determinação  $R^2 = 18,84\%$  e  $p = 0,03$ . Estes dados complementam as observações contidas no parágrafo anterior, e corroboram com a hipótese de que o aumento do estresse oxidativo leva a diminuição da atividade do óxido nítrico, causando uma disfunção endotelial.

A PCR contribui para um estado pró-aterogênico e pró-trombótico diminuindo a liberação do NO e do vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), por aumentar o ânion superóxido e induzir diretamente NO sintase (VENUGOPAL; DEVARAJ; JIALAL, 2003). Os estudos de Ikeda; Takahashi; Shimada (2003) e de Lafuente et al. (2005) demonstram que a PCRus, provavelmente, está envolvida na regulação dos níveis celulares de NO. Entretanto, ainda é incerto se há um papel causal para a PCR na regulação da expressão do NO na reatividade vascular (CLAPP et al. 2005).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são produtos normais do metabolismo celular oxidativo. Bioquimicamente os radicais livres ativos derivam de moléculas de oxigênio servindo como um sinalizador normal para as moléculas na parede vascular. Entretanto, o seu excesso ocorre na presença de fatores de risco cardiovascular ou na arteriosclerose estabelecida. O estresse oxidativo que as espécies reativas de oxigênio causam, promovem disfunção endotelial, lesão celular vascular, oxidação de lipoproteínas, acelerando a aterotrombose. Os mecanismos de defesa antioxidantes são importantes em limitar o estresse oxidativo vascular e incluem a atividade da superóxido dismutase, da catalase, da glutathione e da glicose-6-fosfato desidrogenase (LOSCALZO, 2003).

Neste Trabalho foi observado uma diminuição significativa da atividade da catalase, da superóxido dismutase e dos níveis de glutathione em relação ao grupo controle com  $p < 0,05$ . Ao estudar a Literatura Médica observa-se que não há um consenso sobre o tema, assim Belch et al. (1989) estudaram 22 pacientes com DAOP e 11 com DAC, quando verificaram que os níveis de atividade da superóxido dismutase estavam significativamente elevados em contraste com a GSH que se encontrava significativamente baixa em relação ao controle. Resultados diferentes foram observados por Rajasekhar et al. (2004) em estudo de caso-controle com 139 pacientes portadores de doença arteriosclerótica coronariana submetidos a angiografia, onde não foi observado diferença significativa nos níveis de atividade da glutathione e superóxido dismutase entre pacientes e grupo controle, e por Pipinos et al. (2006) que estudaram o músculo gastrocnêmio obtidos de pacientes com doença arterial periférica ( $n = 25$ ) e controles ( $n = 16$ ), onde verificaram que os mecanismos de defesa antioxidantes estavam alterados, com diminuição significativa da atividade da superóxido dismutase e aumento significativo da catalase e glutathione. Rokyta et al. (2008) estudaram os níveis séricos de biomarcadores em pacientes com dor de origem vascular, claudicantes ou com dor de repouso (estágio II e III da Classificação de Fontaine, 1964) e verificaram que os pacientes com isquemia crítica apresentaram redução dos níveis da glutathione.

Neste estudo foi observado relação de dependência entre a PCRus e os marcadores de estresse oxidativo catalase, glutathione e superóxido dismutase, sendo que a atividade da catalase

foi a que apresentou maior relação, e a glutathiona apresentou a menor, nos pacientes no estágio IIa da Classificação de Fontaine (1964). Abramson et al. (2005) mencionaram que o aumento do marcador inflamatório (PCRus) estava associado com risco elevado para a doença coronariana e que as causas desta elevação não estão ainda esclarecidos e que alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo pode ter um efeito pró-inflamação. Entretanto, até a presente data a relação entre estresse oxidativo e PCR em pessoas doentes é escassa. Fizeram um estudo com 126 pacientes com doença coronariana e como um dos marcadores de estresse oxidativo utilizaram a glutathiona, que mostrou pequena associação com PCRus.

Ashfaq et al. (2006) baseados na hipótese de que o estresse oxidativo é um importante fator no início da doença vascular, investigaram a relação entre marcadores de estresse oxidativo e arteriosclerose em fase inicial. Foram selecionados 140 pessoas não fumantes, sem doença arteriosclerótica manifestada clinicamente, onde foi medido a espessura da camada íntima e média da carótida através de ultrassom *doppler*. O estresse oxidativo foi estimado pela mensuração dos níveis séricos de glutathiona (GSH /GSSG) e cisteína (Cys /CySS). Concluíram que glutathiona reduzida é um preditor de risco independente na presença da arteriosclerose inicial, e que esses achados dão suporte para o papel do estresse oxidativo na patogênese da arteriosclerose e que esta mensuração pode ajudar na identificação precoce de pacientes assintomáticos. Neste Trabalho foi utilizado além da dosagem sérica da glutathiona, as dosagens da atividade da catalase e da superóxido dismutase como marcadores de estresse oxidativo na DAOP em fase inicial e avançada, demonstrando que são marcadores de risco para a doença nos dois estágios.

A atividade enzimática da superóxido dismutase foi mensurada neste estudo em paciente portadores de DAOP, como um dos marcadores de estresse oxidativo, tendo apresentado diminuição significativa em relação ao controle nos dois estágios da doença. Kotur-Stevuljevic et al. (2007) em estudo relacionado, realizado em pacientes com doença da artéria coronária (DAC), observaram que a atividade da superóxido dismutase estava diminuída significativamente no grupo com DAC em relação ao controle, independentemente da extensão da DAC, concluindo

que não verificaram conexão entre a elevação dos marcadores de estresse oxidativo e a extensão da doença coronariana.

Arslan et al. (2009) realizaram um estudo em 21 pacientes portadores de DAOP e 22 com Tromboangeíte Obliterante, além do grupo controle, com a finalidade de avaliar o estresse oxidativo através dos mecanismos de defesa antioxidantes, medindo os níveis de óxido nítrico plasmático, atividade da glutatona, da catalase e da superóxido dismutase, tendo como resultado uma redução da glutatona, aumento da catalase, diminuição do óxido nítrico, não sendo observado alteração significativa da superóxido dismutase. Esse estudo difere deste Trabalho, pois o seu objetivo foi avaliar o estresse oxidativo em pacientes com DAOP e em portadores de Tromboangeíte Obliterante que é um vasculite. Já este estudo se propõe avaliar o comportamento dos marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial em pacientes com DAOP, além de investigar a relação entre esses biomarcadores e avaliar o grau de participação de cada um nas fases evolutivas da doença.

Foi observado neste Trabalho uma diminuição do nitrito, um metabólito do óxido nítrico, na fase de doença avançada, havendo uma relação de dependência significativa ( $p < 0,05$ ) com os marcadores de inflamação e de estresse oxidativo. Em vasos, o rápido consumo do óxido nítrico (NO) pelo radical superóxido ( $O_2^-$ ), leva a disfunção do relaxamento dependente do endotélio que é um marcador sensível de estresse oxidativo vascular. O estresse oxidativo vascular leva à inativação do óxido nítrico de origem endotelial que é um importante fator de disfunção endotelial na arteriosclerose. Há evidências que sugerem que a atividade enzimática da NADPH oxidase vascular é um dos principais mecanismos produtores de ânion superóxido (LAURINDO, 2003).

O óxido nítrico é um potente estimulador da produção da superóxido dismutase e, em condições que resultam na sua depleção como na doença da artéria coronária, pode haver redução da superóxido dismutase, normalmente uma importante enzima de proteção contra os ânion superóxido (HARRISON et al. 2003). Neste estudo foi observado uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da atividade da superóxido dismutase, sendo que neste foi realizado em pacientes portadores de DAOP.

Loffredo et al. (2007) relatam que a mensuração dos níveis séricos do NO tem sido estudados na DAOP, apresentando resultados divergentes, pois pode ser influenciado por fatores exógenos e endógenos (como dieta rica em nitrato, inalação de gases atmosféricos, formação da saliva e função renal) mas ressaltam que não se pode excluir a possibilidade de estar diminuído na DAOP ( HEISS et al. 2006). Observaram aumento do estresse oxidativo demonstrado pela elevação dos níveis séricos de 8-OHdG ( $p < 0.001$ ) e redução sérica do óxido nítrico reduzido ( $p < 0.001$ ). Neste Trabalho foi utilizado critérios diferentes, no qual o estresse oxidativo foi avaliado pela atividade enzimática da catalase, superóxido dismutase e níveis séricos da glutaciona, apresentado  $p < 0,05$  e diminuição do nitrito plasmático com  $p < 0,05$ .

O estresse oxidativo é causado, principalmente, por um desequilíbrio entre a atividade endógena de enzimas pró-oxidantes ( NADPH oxidase, xantino oxidase e cadeia mitocondrial respiratória) e os mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase, glutaciona peroxidase , heme oxigenase , catalase e não enzimáticos representado, principalmente, pela glutaciona reduzida. Além disso, antioxidantes de pequeno-peso molecular poderiam ter um papel na defesa contra o estresse oxidativo. Concentrações aumentadas de espécies reativas de oxigênio reduzem a bioatividade do NO por inativação química, formando peroxinitrito tóxico que em troca pode desacoplar a NO sintase endotelial formando radicais superóxido que vão contribuir para o estresse oxidativo (FÖRSTERMANN, 2008). Neste estudo foi observado uma diminuição significativa dos mecanismos de defesa antioxidantes, representado pela atividade da catalase, superóxido dismutase e glutaciona, e uma diminuição do nitrito, inferindo um aumento do estresse oxidativo com consequente disfunção endotelial, especialmente nos pacientes em fase avançada da DAOP.

Não foi observado neste estudo níveis plasmáticos elevados de homocisteína, tendo o valor do  $p < 0,05$ . A elevação da homocisteína é relacionado como um fator de risco para a DAOP, bem como para a sua progressão e falência de intervenções vasculares. A sua prevalência é elevada em pacientes com DAOP, representando cerca de 30% em pacientes jovens, sendo sugerido que possa ser um fator de risco independente para arteriosclerose, maior para a DAOP do que para a coronariana (NORGREN et al. 2007). No Brasil, a hiperhomocisteinemia foi

encontrada em 60% dos pacientes com DAOP confirmada, com predominância da forma moderada, com níveis significativamente aumentados nos indivíduos com idade superior a 60 anos e com tendência a ser maior nos homens (VENÂNCIO, 2002). Outros estudos nacionais também revelaram prevalência alta de hiperhomocisteinemia (20%) em indivíduos nipo-brasileiros portadores de arteriopatia periférica aterosclerótica, com valores médios de homocisteína progressivamente mais elevados no sexo masculino (GARÓFOLO et al. 2007). Entretanto, outros estudos não mostraram aumento do risco da DAOP com hiperhomocisteinemia (RIDKER; STAMPFER; RIFAI, 2001; DE HARO et al. 2008; ARSLAN et al. 2009). No presente caso, os níveis séricos da homocisteína dentro dos limites da normalidade, podem estar relacionados com a dieta alimentar.

Foi observado neste Trabalho um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos marcadores inflamatórios, PCRus e do fibrinogênio nos pacientes portadores da DAOP. O marcador da coagulação, representado pela homocisteína, não mostrou elevação em relação ao grupo controle tendo o valor do  $p > 0,05$ . Tzoulaki et al. (2006), no chamado estudo de Edinburg (que teve como objetivo analisar as relações entre inflamação, coagulação e arteriosclerose) concluíram que a hipótese da inflamação esteve mais relacionada com a arteriosclerose que a hipercoagulação, o que reforça os dados encontrados neste estudo.

O Teste do Crivo realizado com as dosagens dos níveis plasmáticos da PCRus e do fibrinogênio, mostra uma acurácia de 88% em ambos os exames, tendo a PCRus uma sensibilidade de 93%, maior que a do fibrinogênio que foi de 83%. Entretanto, o fibrinogênio apresentou maior especificidade (87%) que a PCRus (73%), sendo que o valor preditivo do teste positivo foi de 93% no fibrinogênio e de 88% na PCRus, não havendo diferença quanto ao valor preditivo do teste negativo, que foi de 85% nos dois marcadores. A chance de doença quando o teste for positivo (+LR) é de seis vezes para o fibrinogênio e de quatro vezes para a PCRus, sendo que nos dois a -LR é menor que um.

Esses dados mostram o grau de evidência dos marcadores inflamatórios na DAOP, demonstrando que a associação dos exames aumenta a sensibilidade e especificidade, levando a uma maior acurácia na detecção da DAOP.

A execução do Teste do Crivo nos marcadores de estresse oxidativo apresenta a glutathione com maior sensibilidade (97%), seguida da catalase (80%) e da superóxido dismutase (57%). A superóxido dismutase teve maior especificidade (100%), tendo a glutathione e a catalase mostrado resultados iguais (67%). O valor preditivo do teste positivo foi de 100% para a superóxido dismutase, 85% para a glutathione e de 83% para a catalase. O valor preditivo do teste negativo foi maior para a glutathione com resultado de 90%, sendo de 63% e 53%, respectivamente para a catalase e superóxido dismutase. O teste com maior acurácia foi da glutathione com 87%, seguido da catalase (76%) e da superóxido dismutase (71%). A chance de doença quando o teste for positivo (+LR) é de oito vezes para a superóxido dismutase, três vezes para a glutathione e de duas vezes para a catalase, e quando a – LR é menor que um para os três marcadores.

O Teste do Crivo para os marcadores de estresse oxidativo demonstra, como ocorre com os marcadores inflamatórios, que a associação dos métodos aumentam a sua sensibilidade e especificidade, com conseqüente melhora da sua acurácia. A dosagem da glutathione e da superóxido dismutase apresentaram as melhores combinações de resultados.

O nitrito apresentou no Teste do Crivo uma sensibilidade de 73%, uma especificidade de 80%, tendo uma acurácia de 76%. O valor preditivo do teste positivo foi de 88% e o valor preditivo do teste negativo foi de 60%. A chance de doença quando o teste for positivo (+LR) é de quatro vezes e quando a – LR é menor que um.

Essas informações sugerem que a combinação dos métodos empregados para a avaliação laboratorial da DAOP neste Trabalho, apresentam resultado com nível de evidência significativo.

Este Trabalho fornece níveis de evidência significativos, que sugerem uma relação entre o processo inflamatório, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial na sequência de eventos patogênicos da arteriosclerose nos pacientes com doença arterial obstrutiva periférica, sendo que essa relação de dependência entre inflamação e estresse oxidativo é semelhante nos pacientes com doença em fase inicial ou intermediária, havendo maior participação do estresse oxidativo na doença avançada, com maior relação de dependência do marcador de disfunção endotelial, levando a deficiência orgânica do endotélio causando uma disfunção endotelial. A importância dos biomarcadores também se evidencia nos estágios iniciais ou intermediário da DAOP, onde esta interrelação é mais intensa.

## 7 CONCLUSÃO

- Neste estudo não foi encontrada relação de dependência entre os fatores de risco tradicionais como tabagismo, diabetes melito, hipercolesterolemia e hipertensão arterial com os marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial, sugerindo que esses marcadores são preditores independentes de risco vascular. O índice tornozelo-braquial não apresentou relação de dependência com a idade, sendo que o ITB apresentou relação de dependência com a PCRus e a catalase no Grupo A.

- Foi observada relação de dependência significativa entre os marcadores inflamatórios com os marcadores de estresse oxidativo e de disfunção endotelial, não se verificando relação de dependência com o marcador da coagulação.

- As informações obtidas por este Trabalho, fornecem evidências que sugerem uma relação entre o processo inflamatório, o estresse oxidativo e a disfunção endotelial na seqüência de eventos patogênicos da arteriosclerose nos pacientes com doença arterial obstrutiva periférica. Essa relação de dependência entre inflamação e estresse oxidativo é semelhante nos pacientes com doença em fase inicial ou intermediária, havendo maior participação do estresse oxidativo na doença avançada, com maior relação de dependência do marcador de disfunção endotelial, inferindo que o estresse oxidativo participa ativamente na seqüência de eventos que levam a deficiência orgânica do endotélio.

## REFERÊNCIAS

ABRAMSON, J.L.; HOOPER, W.C.; JONES, D.P.; ASHFAQ, S.; RHODES, S.D.; WEINTRAUB, W.S.; et al. Association between novel oxidative stress markers and C- reactive protein among adults without clinical coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v.178, p.115-121, 2005.

ACHARYA, J.; PUNCHARD, N.A.; TAYLOR, J.A; THOMPSON, R.P.H.; PEARSON, T.C. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. **Eur J Haematol.**, v.47, p. 287-91, 1991.

ANDERSON, M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological sample. **Methods in Enzimology**, v.113, p. 548 – 555, 1969.

AEBI, H. Enzymes 1: oxiredutases, transferases. In : BERGMAYER, H.U.(ed.) **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press, 1980, p.273-282.

ALVES, A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. **Anal Biochem.**, v.323, p. 33, 2003.

ALEXANDER R.W.; DZAU, V.J. Vascular biology: the past 50 years. **Circulation**, v.102, suppl. 4, p. IV-112–IV-116, 2000.

AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S. M. A.; PADOVANI, R. M. DRI: síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidants. **Rev Nutr Campinas**, v.14, p. 71, 2001.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Peripheral arterial disease in people with diabetes. **Diabetes Care**, v.26, p. 3333–3341, 2003.

ARONOW, W.S; AHN, C. Association between plasma homocysteine and peripheral arterial disease in older persons. **Coron Artery Dis.**, v.9, p.49–50, 1998.

ARSLAN, C.; ALTAN, H.; BESIRLI, K.; AYDEMIR, B.; KIZILER, A.R.; DENLI, S.; TURKEY, I. The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Buerger Disease and Atherosclerotic Peripheral Arterial Occlusive Disease. **Ann Surg.** Jan 5, 2009. [Epub ahead of print ].

ASHFAQ, S.; ABRAMSON, J.L.; JONES, D.P.; RHODES, S.D.; WEINTRAUB, W.S.; HOOPER, W.C.; VACCARINO, V.; HARRISON, D.G.; QUYYUMI, A.A. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. **J Am Coll Cardiol.**, v.47, n.5, p.1005-11, 2006.

AUGUSTO, O.; BONINI, M.G.; AMANSO, A.M. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion : two emerging radicals biology. **Free Radic Biol Méd.**, v.32, p. 841-859, 2002.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **Bio Estat 5 – Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e da Saúde.** 5. ed. Belém : IDSM/MCT/CNPq, 2007, p. 364.

BALLOU S.P.; LOZANSKI G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. **Cytokine**, v.4, p.361–368, 1992.

BARTOLOMEW, J.R.; OLIN, J.W. Pathophysiology of peripheral arterial disease and risk factors for its development. **Journal of Medicine**, v. 73, n.4, p. 345-355, 2006.

BELCH, J.J.; CHOPRA, M.; HUTCHISON, S.; LORIMER, R.; STURROCK, R.D.; FORBES, C.D.; SMITH, W.E. Free radical pathology in chronic arterial disease. **Free Radic Biol Med.**, v.6, n. 4, p. 375-8, 1989.

BEN-YEHUDA, O. High-Sensitivity C-Reactive Protein in Every Chart? **J Am Coll Cardiol.**, v. 49, p. 2139-2141, 2007.

BHARADWA, J. D.; STEIN, M.P.; VOLZER, M.; MOLD, C.; DU CLOS, T.W. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. **J Exp Med.**, v. 190, p.585–590, 1999.

BLASCHKE, F.; BRUEMMER, D.; YIN F.; TAKATA, Y.; WANG, W.; FISHBEIN M.C.; et al. C-reactive protein induces apoptosis in human coronary vascular smooth muscle cells. **Circulation**, v. 110, p.579–587, 2004.

BOERS, G. H. et al. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. **N Engl J Med.** , v.313, p. 709-15, 1985.

BOUSHEY, D. G. et al. Effect of various regimens of vitamin B<sub>6</sub> and folic acid on mild hyperhomocysteinemia in vascular patients. **Inherited Met Dis.**, v.17, p.159-62, 1994.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem.**, v.72, p. 248–254, 1976

BRANDÃO, A.C; TRINDADE,D.M.; HOTTA,J.; PINHEL,M.A.; ANACLETO, A.M.; GODOY, J.M.P.; et al. Polimorfismo genético do fibrinogênio na doença arterial periférica. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v.26, n.3, p.202-205, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde . **Indicadores Básicos para a Saúde no Brasil: conceitos e aplicações.** Disponível em : < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2007/matriz.htm#mort> >. Acesso em : 16 ago. 2008.

BREVETTI, G.; SILVESTRO, A.; DI GIACOMO, S.; BUCUR, R.; DI DONATO, A.; SCHIANO, V.; SCOPACASA, F. Endothelial dysfunction in peripheral arterial disease is related to increase in plasma markers of inflammation and severity of peripheral circulatory impairment but not to classic risk factors and atherosclerotic burden. **J Vasc Surg.**, v. 38, n. 2, p. 374-9, 2003.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Arch Biochem Biophys.**, v.300, p. 535-43, 1993.

CARVALHO, M.H.; FORTES, Z.B.; PASSAGLIA, R.C.A.T.; NIGRO, D. Funções Normais do Endotélio: uma visão geral. In: LUZ, P.L.; LAURINHO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. **Endotélio.** São Paulo : Atheneu, 2003. p. 17-32.

CHAGAS, A.C.P; CASELLA FILHO, A.; ARAÚJO, R.G.; GALVÃO; T.G. Inflamação e Aterosclerose: integração de novas teorias e valorização dos novos marcadores. **Bras Cardiol Invas.**, v.11, n.3, p.14-19, 2003.

CHANG, M.K.; BINDER, C.J.; TORZEWSKI, M.; WITZTUM, J.L. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 99, p.13043–13048, 2002.

CHENG, S.W.; TING, A.C.; LAU, H; WONG, J. Epidemiology of atherosclerotic peripheral arterial occlusive disease in HongKong. **World J Surg.**, v.23, p.202, 1999.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R. et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. **JAMA**, v.289, p.2560–2572, 2003.

CLAUSS, A. Rapid Physiological Coagulation Method for the Determination of Fibrinogen [German]. **Acta Haematol.**, v.17, p.237-46, 1957.

CLAPP, B.R.; HIRSCHFIELD, G.M.; STORRY, C.; GALLIMORE, J.R.; STIDWILL R.P.; SINGER M.; et al. Inflammation and endothelial function: direct vascular effects of human C-reactive protein on nitric oxide bioavailability. **Circulation**, v. 111, p. 1530–1536, 2005.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med.**, v.111, p. 918-31, 1989.

CRIQUI, M.H; VARGAS, V.; DENENBER, G.J.O, et al. Ethnicity and peripheral arterial disease: the San Diego Population Study. **Circulation**, v.112,p.2703–2707, 2005.

CUSHMAN, M.; LEMAITRE, R.N.; KULLER L.H.; PSATY B.M.; MACY E.M.; SHARRETT A.R.; et al. Fibrinolytic activation markers predict myocardial infarction in the elderly. The Cardiovascular Health Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 19, p.493–498, 1999.

CZUCZEIKO, J.; ZACHARA, B. A.; STAUBACH-TOPCZEWSKA, E.; HALOTA, W.; KEDZIORA, J. **Acta Biochim. Pol.**, v.50, p. 1147, 2003.

DANESH, J.; WHEELER, J.G.; HIRSCHFIELD, G.M. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. **N Engl J Med.**, v.350, p.1387-97, 2004.

DASKALOPOULOU, S.S.; PATHMARAJAH,M.; KAKKOS, S.K.; DASKALOPOULOS, E.U.; HOLLOWA,Y. .P; MIKHAILIDIS, D.P.; MAYO, N.E.; GEROULAKOS, G. Association between ankle-brachial index and risk factor profile in patients newly diagnosed with intermittent claudication . **Circ J.** ,v.72, n.3, p. 441-8, 2008.

DE HARO, J.; ACIN, F.; LOPEZ-QUINTANA, A.; MEDINA, F.J.; MARTINEZ-AGUILAR, E.; FLOREZ, A. et al. Direct association between C-reactive protein serum levels and endothelial dysfunction in patients with claudication. **Eur J Vasc Surg.**, v.35, n.4, p.480-6, 2008.

DEVARAJ, S.; XU, D.Y.; JIALAL, I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. **Circulation**, v. 107, p.398–404, 2003.

DEVARAJ, S.; KUMARESAN P.R.; JIALAL I. Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 36, p.405–410, 2004.

DEVARAJ, S.; DU CLOS, T.W.; JIALAL I. Binding and internalization of C-reactive protein by Fcγ receptors on human aortic endothelial cells mediates biological effects. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** ,v. 25, p.1359–1363, 2005a.

DEVARAJ, S.; O'KEEFE G.; JIALAL I. Defining the pro-inflammatory phenotype using high sensitive C-reactive protein levels as the biomarker. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 90, p. 4549–4554, 2005b.

DEVARAJ S, SINGH U, JIALAL I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. **Clin Chem.** , v.55, n.2, p.229-38, 2009.

DE VIGNEAUD, V. E. Trail of research in sulfur chemistry and metabolism, and related fields. Ithaca, N.Y: Cornell University Press, 1952. In: CARSON, N. A. J.; NEIL, D. W. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. **Arch Dis Child.**, v.37, p. 505-13, 1962.

DIEDRICH, D.A.; YANG, Z.; BUHLER, F.R. Impaired endothelium-dependent relaxations in hypertensive small arteries involve the cyclooxygenase pathway. **Am J Physiol.**, v.258, p.445-451, 1990.

DOHI, Y.; TAKASE, H.; SATO, K.; UEDA, R. Association among C- reactive protein, oxidative stress and traditional risk factors in Healthy Japanese subjects. **Int J Cardiol.**, v.115, n.1, p. 63-6, 2007.

DOWEIK, L.; MACA,T.; SCHILLINGER, M.; BUDINSKY, A.; SABETI, S.; MINAR, E. Fibrinogen predicts mortality in high risk patients with peripheral artery disease. **Eur J Vasc Endovasc Surg.**, v.26, n.4, p.381-386, 2003.

DU CLOS, T.W. Function of C-reactive protein. **Ann Med.**, v.32, p.274–278, 2000.

DUDMAN, N. P. B. An alternative view of homocysteine. **Lancet**, v. 354, p. 2072-4, 1999.

DURAND, P. et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. **Lab Invest.**, v. 81, n. 5, p. 645-72, 2001.

ELDRUP,N.; SILLESEN,H.; PRESCOTT, E.; NORDESTGAARD,B.G. Ankle braquial index, C-reactive protein, and central augmentation index to identify individuals with severe atherosclerosis. **European Heart Journal**, v. 27, n.3, p.316-322, 2006.

ESCRIBANO-BURGOS, M.; LOPEZ-FARRE, A.; DEL MAR G.M.; MACAYA C.; GARCIA-MENDEZ A.; MATEOS-CACERES P.J. Effect of C-reactive protein on Fcgamma receptor II in cultured bovine endothelial cells. **Clin Sci.**, v.108, p.85–91, 2005.

EVERETT, B.M.; KURTH, T.; BURING, J.E.; RIDKER, P.M. The relative strength of C-reactive protein and lipid levels as determinants of ischemic stroke compared with coronary heart disease in women. **J Am Coll Cardiol.**, v.48, p.2235-42, 2006.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo . **Rev Assoc Med Bras.**, São Paulo, v.43, n.1, jan./mar. 1997.

FLEMING, R.M. Angina and coronary ischemia are the result of coronary regional blood flow differences. **J Amer Coll Angiol.**, v. 1, p. 127-42, 2003.

FONTAINE, R.; KIENRY,R.; GANGLOFF, J.M. Long-term results of restorative arterial surgery in obstructive diseases of the arteries. **J Cardiovasc Surg.** , v. 5, p. 463, 1964.

FÖRSTERMANN, U. ; MÜNZEL,T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease From Marvel to Menace. **Circulation**, v.113, p.1708-1714, 2006.

FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease : causas, defense mechanisms and potential therapies. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.**, v.5, n.6, p.338-49, 2008.

FRIDOVICH, I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

FURCHGOTT, R.; ZAWADZKI, J.V.B. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, p. 373-6, 1980.

GAROFOLO, L.; BARROS, N.JR.; MIRANDA, F. JR.; D'ALMEIDA, V.; CARDIEN, L.C.; FERREIRA, S.R. Association of increased levels of homocysteine and peripheral arterial disease in a Japanese – Brazilian population. **Eur J Vasc Endovasc Surg.** , v.34, n.1, p.23-8, 2007.

GODOY, J.M.P.; GODOY,M.F.; SANTOS, J.E. Polimorfismo genético do fibrinogênio na doença arterial periférica. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v. 26, n.3, p.202-205, 2004.

GILBERT, H.F; MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.**, v.63, p. 69-172, 1990.

GOULART, M.O.F; VASCONCELOS, S.M.L; MOURA, J.B.F.; MANFREDINE, V.; BENFAT, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v.30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, v.126, n.1, p. 131-138, 1982.

GROW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. J. Nitric oxide chemistry and cellular signaling **J Cell Physiol.**, v.187, p. 277, 2001.

HACKAM, D.G ; ANAND, S.S. Emerging Risk Factors for Atherosclerotic Vascular Disease.A Critical Review of the Evidence. **JAMA**, v. 290, p. 932-940, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v.186, p. 1-85,1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radical in Biology and Medicine.** 3rd ed., Oxford University Press: Oxford, 2002; 2007.

HAMILTON, C.A.; MILLER, W.H.; AL-BENNA, S.; BROSNAN, M.J.; DRUMMOND, R.D.; MCBRIDE, M.W.; DOMINICZAK, A.F. Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. **Clinical Science**, v. 106, p. 219–234, 2004.

HARRISON, D.; GRIENGLING, K.; LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **Am J Cardiol.**, v.91, p.7A–11A, 2003.

HATHERILL, J.R.; TILL, G.O.; WARD, P.A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agents-Actions**, v.32, p. 351-8, 1991.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J Lab Clin Med.**, v.107, p. 401-4, 1986.

HEISS, G.; REICH, L.M.; BOLAND, L.L.; HIRSCH, A.T. Ankle-Braquial index and hemostatic markers in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study cohort. **Vasc Med.**, v. 12, n. 4, p. 267-273, 2007.

HEISTAD, D.D. Oxidative stress and Vascular Disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 26, p. 689-695, 2006.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol.**, v.26, p.277-85, 1989.

HIRSCH, A.T.; CRIQUI, M.H.; TREAT-JACOBSON, D. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. **JAMA**, v.286, p.1317–1324, 2001.

HIRSCH, A.T.; HASKAL, Z.J.; HERTZER, N.R.; et al. ACC/AHA 2005 Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic): Executive Summary A Collaborative Report From the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery,\* Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease). **J Am Coll Cardiol.**, v. 47, p.1239-1312, 2006.

IKEDA, U.; TAKAHASHI, M.; SHIMADA, K. C-reactive protein directly inhibits nitric oxide production by cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 42, p.607–611, 2003.

JANDRIĆ-BALEN, M.; BOZIKOV, V.; BISTROVIĆ, D.; JANDRIĆ, I.; BOZIKOV, J.; ROMIĆ, Z.; BALEN, I. Antioxidant enzymes activity in patients with peripheral vascular disease, with and without presence of diabetes mellitus. **Coll Antropol.**, v.27, n.2, p.735-43, 2003.

- JEREMY, J.Y.; ANGELINE, G.D. Oxidative stress, nitric oxide, and vascular disease. **Curr Vasc Pharmacol.** ,v.2, p.229-39, 2004.
- KAMATH, S.; LIP, G.Y.H. Fibrinogen : biochemistry, epidemiology and determinants. **Q J Med.**, v.96, p. 711-729, 2003.
- KANG, S. S.; WONG, P. W. K.; MALINOW, M. R. Hiperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. **Annu Rev Nutr.**, v.12, p. 279-88, 1992.
- KANNEL, W.B; MCGEE, D.L. Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. **J Am Geriatr Soc.** , v.33, p.13–18, 1985.
- KEDZIORA, J. et al. Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. **Acta Biochim. Pol.**, v.50, p.1147, 2003.
- KHAWAJA, F.J.; BAILEY, K.R.; TURNER, S.T.; KARDIA, S.L.; MOSLEY, T.H. J.R.; KULLO, I.J. Association of novel risk factors with the ankle brachial index in African American and non-Hispanic white populations. **Mayo Clin Proc.** , v.82, n.6, p.709-16, 2007.
- KHERA, A.; DELEMOS, J.A.; PESHOCK, R.M. Relationship between C-reactive protein and subclinical atherosclerosis The Dallas Heart Study. **Circulation**, v.113, p.38-43, 2006.
- KLOUCHE, M.; GOTTSCHLING, S.; GERL, V.; HELL, W.; HUSMANN, M.; DORWEILER, B., et al. Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 18, p.1376–1385, 1998.
- KOLLEF, M.H; SHUSTER, D.P. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med.**, v.332, n.1, p. 27-37, 1995.
- KOTUR-STEVLJEVIC, J.; MEMON, L.; STEFANOVIC, A.; SPASIC, S.; SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA, V.; BOGAVAC-STANOJEVIC, N. et al. Correlation of oxidative stress parameters in inflammatory markers coronary artery disease patients. **Clin Biochem.**, v.40, v.3/4, p. 181-7, 2007.
- KUNUSCH, C.; MEDFORD, R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circ Res.** , v.85, p. 753-66, 1999.
- LAFUENTE, N.; AZCUTIA,V.; MATESANZ, N.; CERCAS, E.; RODRIGUEZ-MANAS, L.; SANCHEZ-FERRER,C.F.; et al. Evidence for sodium azide as an artifact mediating the modulation of inducible nitric oxide synthase by C-reactive protein. **J Cardiovasc Pharmacol.** , v. 45, p. 193–196, 2005.

LANE, J.S.; VITTINGHOFF,E.; LANE, K. T. ; HIRAMOTO, J.S.; MESSINA, L.M. Risk factors for premature peripheral vascular disease : results for the national health and nutritional survey. **J Vasc Surg.**, v.44, n. 2, p. 324-325, 2006.

LASSILA, R.; PELTONEN, S.; LEPANTALO, M.; SAARINEN, O.; KAUKHANEN, P.; MANNINEN, V. Severity of peripheral atherosclerosis is associated with fibrinogen and degradation of cross-linked fibrin. **Arterioscler Thromb.**, v.13, p. 1738-42, 1993.

LAURINDO, F.R.M. Desequilíbrio Redox, resposta vascular à lesão e Aterosclerose. In: LUZ, P.L.; LAURINHO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. **Endotélio**. 1 ed. São Paulo : Atheneu, 2003. p. 115-132.

LEE, A.J.; FOWKES, F.G.; LOWE, G.D. et al. Fibrinogen, factor VII and PAI-I genotypes and the risk of coronary and peripheral atherosclerosis: Edinburgh Artery Study. **Thromb Haemost.**, v. 81, p.553-60, 1999.

LEE, A.J; FOWKES, F.G; LOWE, G.D, RUMLEY, A. Fibrin D-dimer, haemostatic factors and peripheral arterial disease.**Thromb Haemost.**, v.74, p.828-32, 1995.

LIBBY, P.; SIMON, D.I. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. **Circulation** , v.103, p. 1718-1720, 2001.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M. Inflammation and Atherothrombosis : From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. **J Am Coll Cardiol.**, v. 48, p.33-46, 2006.

LIMA, L.M.; CARVALHO, M.G.; LOURES-VALE, A.A.; FONSECA NETO, C.P.; GARCIA, J.C.F.; SAAD,J.A.; SOUSA, M.O. Proteína C-reativa ultra-sensível em pacientes com diagnóstico de doença arterial coronariana estabelecido por angiografia. **J Bras Patol Med Lab.**, v.43, n.2, 2007.

LIP, G.Y.; BLANN, A.D.; FAROOQI I.S.; ZARIFIS J.; SAGAR G.; BEEVERS D.G. Sequential alterations in haemorheology, endothelial dysfunction, platelet activation and thrombogenesis in relation to prognosis following acute stroke: the West Birmingham Stroke Project. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 13, p. 339-347, 2002.

LOFFREDO, L.; PIGNATELLI, P.; CANGEMI, R.; ANDREOZZI, P.; PANICO M.A.; MELONI, V.; VIOLI, F. Imbalance between nitric oxide generation and oxidative stress in patients with peripheral arterial disease: effect effect of an antioxidant treatment. **J Vasc Surg.**, v.44, n.3, p.525-30,2006.

LOFFREDO, L.; MARCOCCIA, A.; PIGNATELLI, P.; ANDREOZZI, P.; ORGIA, M.C.; CANGEMI, R.; et al. Oxidative-stress-mediated arterial dysfunction in patients with peripheral arterial disease. **European Heart Journal** , v. 28, n.5, p. 608-612, 2007.

LOSCALZO, J. Oxidant stress: a key determinant of Atherothrombosis. **Biochemical Society Transactions**, v.31, p. 5, 2003.

LOPEZ-ONGIL, S.; SENCHAK, V.; SAURA, M. Superoxide regulation of endothelin-converting enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v.34, p. 423-427, 2000.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, L.; RANDAL, R.J. Protein mensurament with the foliphenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p. 265 – 275, 1951.

MACGREGOR, A.S; PRICE, J.F; HAU, C.M; LEE, A.J; CARSON, M.N; FOWKES F.G. Role of systolic blood pressure and plasma triglycerides in diabetic peripheral arterial disease. The Edinburgh Artery Study. **Diabetes Care**, v. 22, p.453–458, 1999.

MALLIKA, V.; GOSWAMI, B.; RAJAPPA, M. Atherosclerosis Pathophysiology and the Role of Novel Risk Factors: A Clinicobiochemical Perspective. **Angiology**, v. 58, n.5, p. 5313-522, 2007.

MARNELL, L.; MOLD, C.; DU CLOS, T.W. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. **Clin Immunol.**, v. 117, p.104–111, 2005.

MARTÍNEZ AGUILAR, E.; DE HARO, M.J.; FLÓREZ GONZÁLEZ, A.; VARELA CASARIEGO, C.; BLEDA MORENO, S.; ACÍN GARCÍA, F. In Vivo Confirmation of the Role of Statins in Reducing Nitric Oxide and C-Reactive Protein Levels in Peripheral Arterial Disease. **Eur J Vasc Endovasc Surg.**, v. 37, n. 4, p. 443-447, 2009.

McCULLY, K. S. Homocysteine and vascular disease. **Nat Med.**, v. 2, p. 386-9, 1996.

McCULLY, K. S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am J Pathol.**, v.56, p. 111-28, 1969.

MCDERMOTT, M.M.; GREEN, D.; GREENLAND, P. et al. Relation of levels of hemostatic factors and inflammatory markers to the ankle brachial index. **Am J Cardiol.**, v.92, p.194–199, 2003.

MCDERMOTT M.M; LIU K, CRIQUI, M.H. Ankle-brachial index and subclinical cardiac and carotid disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. **Am J Epidemiol.**, v.162, p.33–41, 2005a.

MCDERMOTT, M.M.; GURALNIK, J.M.; CORSI, A. et al. Patterns of inflammation associated with peripheral arterial disease: the In CHIANTI study. **Am Heart J.**, v.150, p.276–281, 2005b.

MCDERMOTT, M.M; FERRUCCI, L.; LIU, K. et al. D-dimer and inflammatory markers as predictors of functional decline in men and women with and without peripheral arterial disease. **J Am Geriatr Soc.**, v.53, p.1688–1696, 2005c.

MCDERMOTT, M. M.; LIU, K.; FERRUCCI, L.; TIAN, L.; GURALNIK, J. M.; GREEN, D.; TAN, J.; LIAO, Y.; PEARCE, W. H.; SCHNEIDER, J. R.; MCCUE, K.; RIDKER, P.; RIFAI, N.; CRIQUI, M. H. Circulating blood markers and functional impairment in peripheral arterial disease. **J Am Geriatr Soc.**, v.56, n.8, p.1504-10, 2008.

MOLGAARD, J.; MALINOW, M. R.; LASSVIK, C.; HOLM, A. C.; UPSON, B.; OLSSON, A. G. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for intermittent claudication. **J Intern Med.**, v.231, p. 273–9, 1992.

MORA, S.; MUSUNURU, K.; BLUMENTHAL, R. S. The clinical utility of high-sensitivity C-protein in cardiovascular disease and the potential implication of JUPITER on current practice guidelines. **Clin Chem.**, v.55, n. 2, p. 219-28, 2009.

MURITBTO, J. M.; D'AGOSTINO, R. B.; SILBERSHATZ, H.; WILSON, W. F. Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study. **Circulation**, v.96, p.44–49, 1997.

MUSICANT, S. E.; TAYLOR, L. M. J. R.; PETERS, D.; SCHUFF, R. A.; URANKAR, R.; LANDRY, G. J.; MONETA, G. L. Prospective evaluation of the relationship between C-reactive protein, D-dimer and progression of peripheral arterial disease. **J Vasc Surg.**, v.43, n.4, p.772-80, 2006.

NAIR, K. G. et al. The genetic basis of hiperhomocysteinemia. **IHJ**, v. 52, p.16-7, suppl., 2000.

NAN, B.; YANG, H.; YAN, S.; LIN, P. H.; LUMSDEN, A. B.; YAO, Q. C-reactive protein decreases expression of thrombomodulin and endothelial protein C receptor in human endothelial cells. **Surgery**, v. 138, p. 212–222, 2005.

NASCIMENTO, C. A.; PATRIARCA, G.; HEIMANN, J. C. Estrutura Orgânica do Endotélio Vascular. In: LUZ, P. L.; LAURINHO, F. R. M.; CHAGAS, A. C. P. **Endotélio**. São Paulo: Atheneu, 2003. p.1-16.

NEVES, L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A. C. Homocisteína. **J Bras Patol Med Lab.**, v.40, n.5, 2004.

NEWMAN, A. B.; SISCOVICK, D. S.; MANOLIO, T. A. Ankle-arm index as a marker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Heart Study (CHS) Collaborative Research Group. **Circulation**, v.88, p.837–845, 1993.

NEWMAN, A. B.; TYRRELL, K. S.; KULLER, L. H. Mortality over four years in SHEP participants with a low ankle-arm index. **J Am Geriatr Soc.**, v.45, p.1472–1478, 1997.

NORGREN, L.; HIATT, W. R.; DORMANDY, J. A.; NEHLER, M. R.; HARRIS, K. A.; FOWKU, F. G. R. on behalf of the Tasc II working group. Inter Society Consensus for the management of peripheral arterial disease. **J Vasc Surg.**, v.45, n.1, supp.S5A–S67A, 2007.

- NORMAN, P.E.; EIKELBOOM, J.W.; HANKEY, G.G. Peripheral arterial disease : prognostic significance and prevention of atherothrombotic complications. **MJA** , v. 181, n.3, p. 150-154, 2004.
- O'HARE, A.M. Management of peripheral arterial disease in chronic kidney disease. **Cardiol Clin.**, v.23, p.225–236, 2005.
- OLSSON, A.G. Hyperhomocyst(e)inaemia: an independent risk factor for intermittent claudication. **J Intern Med.**, v.231, p.273–9, 1992.
- PAFFEN, E.; VOS, H.L.; BERTINA, R.M. C-reactive protein does not directly induce tissue factor in human monocytes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 24, p.975–981, 2004.
- PAFFEN, E.; MONIEK, P.M.; DE MAAT. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? **Cardiovascular Research**, v. 71, n.1, p.30-39, 2006.
- PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, p.524-526, 1987.
- PARASKEVAS, K.I.; BAKER, D.M.; VRENTZOS, G.E.; MIKHAILIDIS, D.P. The role of fibrinogen and fibrinolysis in peripheral arterial disease. **Thromb Res.**, v.122, n.1, p.1-12, 2008.
- PARASKEVAS, K.I.; BESSIAS, N.; PAPAS, T.T.; ANDRIKOPOULOS, V.; MIKHAILIDIS, D.P. Is high-sensitivity C-reactive protein Is high-sensitivity C-reactive protein atherosclerosis? **Angiology**, v.60, n.1, p.8-11, 2009.
- PEARSON, T.A.; MENSAH, G.A.; ALEXANDER, R.W.; ANDERSON, J.L.; CANNON, R.O.; CRIQUI, M.; et al. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. Application to Clinical and Public Health Practice: A statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. **Circulation**, v. 107, p. 499-511, 2003.
- PEPYS, M.B. CRP or not CRP? That is the question. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 25, p.1091-4, 2005.
- PEPYS, M.B.; HIRSCHFIELD, G.M.; TENNENT, G.A. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. **Nature**, v.440, p.1217-21, 2006.
- PILOT, A.; BLACHE, D.; BOULET, L, et al. Effect of fish oil on LDL oxidation and plasma homocysteine concentrations in health. **J Lab Clin Med.**, v.141, p.41-9, 2003.

PIPINOS, I. I. ; JUDGE, A.R. ; ZHU, Z.; SELSBY, J.T. ; SWANSON, S. A.; JOHANNING, J.M.; DODD, S.L. Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. **Free Radic Biol Med.**, v.41, n.2, p. 262-9, 2006.

PRADHAN, D.C.; SHRIVASTAVA, S.; COZINHEIRO, N.R.; RIFAI, N.; CREAGER, M.A.; RIDKER, P.M. Symptomatic peripheral arterial disease in women : nontraditional biomarkers of elevated risk. **Circulation** , v.117, n.6, p.823-31, 2008.

RAJASEKHAR, D.; SRINIVASA, R.A.O. P.V.; LATHEEF, S.A.; SAIBABA, K.S.; SUBRAMANYAM, G. Association of serum oxidants and risk of coronary heart disease in South Indian Population. **Indian J Med Sci.**, v.58, n.11, p.465-71, 2004.

REINHARDT, R.R.; BONDY, C.A.; Differential Cellular pattern of gene expression for two distinct cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterase in developing and mature ratbrain. **Neuroscience**, v.72, n.2, p. 567-578, 1996.

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** , v. 285, p.2481–5, 2001.

RIDKER,P.M. C- Protein and the Prediction of Cardiovascular Events Among Those at Intermediate Risk. **J. Am Coll Cardiol.**, v. 49, p. 2129-2138, 2007.

ROKYTA, R.; YAMAMOTOVÁ, A.; SULC, R.; TREFIL, L.; RACEK, J.; TRESKA, V. Assessment of biochemical markers in patients with pain of vascular origin. **Clin Exp Med.**, v.8, n.4, p.199-206, 2008.

RUMLEY,A.; EMBERSON, J.R.; WANNAMETHEE, S.G.; LOWE, G.D.O. C-reactive protein and other hemostatic and inflammatory variables in men aged 60-79 years. **J Thromb Haemost.**, v.4, p.982-7, 2006

SADER, M.A.; CELERMAJER, D.S. Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. **Cardiov Res.**, v.53, p.597-604, 2001.

SATTAR, N.; MURRAY, H.M.; MCCONNACHIE, A. C-reactive protein and prediction of coronary heart disease and global vascular events in the prospective study of pravastatin in the elderly at risk (PROSPER). **Circulation**, v.115, p.981-989, 2007.

SAVINO NETO, S.; NASCIMENTO, J.L.M. Doença arterial obstrutiva periférica: novas Perspectivas de Fatores de Risco. **Revista Paraense de Medicina**, v.21, n.2, p.35-39,2007.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide glutathione couple. **Free Radical Biol Med.**, v.30, n.11,p. 1191-1212, 2001.

- SCHIEFFER, B.; DREXLER, H.; LING, B.N. G-protein coupled receptors control vascular smooth muscle cell proliferation via pp-60 c-src and p 21 ras. **Am J Physiol.**, v.272, p. 2019-30, 1997.
- SCHOEN, F.J. Vasos sanguíneos. In: **Robbins Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.415-29, 1996.
- SCHULZE, H.C.; ILG, R.; SANDER, K.; BICKEL, H.; BRIESENICK, C.; HEMMER, B.; POPPERT, H.; SANDER, D. High-sensitivity C-reactive protein at different stages of atherosclerosis: results of the INVADE study. **J Neurol.** Feb 25. 2009. [Epub ahead of print].
- SCHUNKERT, H.; SAMANI, N. J. ; F.Med. Sci. Elevated C-Reactive Protein in Atherosclerosis — Chicken or Egg? **N Eng J Med.**, v. 359, n.18, p. 1953–1955, 2008.
- SCIRICA, B.M.; MORROW, D.A. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The verdict is still out. **Circulation**, v.113, p.2128-51, 2006.
- SCOTT, M.D.; LUBIN, B.H.; ZUO, L.; KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J Lab Clin Med.**, v.118, p. 7-16, 1991.
- SELVIN, E.; ERLINGER, T. P. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. **Circulation**, v.110, p.738–743, 2004.
- SERRANO JUNIOR, C.V.; FERNANDES, J. L.; LUZ, P.L. Moléculas de Adesão. Inflamação e Endotélio. In: LUZ, P.L.; LAURINHO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. **Endotélio**. 1 ed. São Paulo : Atheneu , 2003. p. 97-113.
- SINGH U.; JIALAL, I.Oxidative stress and atherosclerosis. **Pathophysiology**, v.13, n.3, p. 129-42, 2006.
- SIRAGY, H.; CAREY, R.M. The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. **J Clin Invest.**,v. 100, p. 264-9, 1997.
- SMITH, SC JR.; MILANI, R.V.; ARNETT, D. K. Atherosclerosis Vascular Disease Conference: Writing Group II: risk factors. **Circulation**, v.109, p.2613–2616, 2004.
- SOFI, F.; LARI, B.; ROGOLINO, A. et al. Thrombophilic risk factors for symptomatic peripheral arterial disease. **J Vasc Surg.**, v.41, p.255–260, 2005.
- STRALIN, P.; KARLSSON, K.; JOHANSSON, B.O. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.15, p.2032-2036, 1995.

SZALAI, A.J.; AGRAWAL, A.; GREENHOUGH, T.J.; VOLANAKIS, J.E. C-reactive protein: structural biology and host defense function. **Clin Chem Lab Med.**, v. 37, p.265–270, 1999.

THE FIBRINOGEN STUDIES COLLABORATION. Associations of Plasma Fibrinogen Levels with Established Cardiovascular Disease Risk Factors, Inflammatory Markers, and Other Characteristics : Individual Participant Meta-Analysis of 154.211 Adults in 31 Prospective Studies. **Am J Epidemiol.**, v.166, n.8, p.867-879, 2007.

THOMPSON, D.; MILFORD, W. A.; WHICHER, J.T. The value of acute phase Protein measurements in clinical practice. **Ann Clin Biochem.**, v.29, p.123-31, 1992.

TSIMIKAS, S.; WILLERSON, J.T.; RIDKER, P.M. C-reactive Protein and other Emerging Blood Biomarkers to Optimize Risk Stratification of Vulnerable Patients. **Am Coll Cardiol.**, v. 47, p.19-31, 2006.

TORZEWSKI, J.; TORZEWSKI, M.; BOWYER, D.E.; FROHLICH, M.; KOENIG W.; WALTENBERGER, J.; et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 18, p.1386–1392, 1998.

TZOULAKI, I.; MURRAY, G.D.; PRICE, J. F.; SMITH, F.B.; LEE, A.J.; RUNLEY, A.; et al. Hemostatic Factors, Inflammatory Markers, and Progressive Peripheral Atherosclerosis. **American Journal of Epidemiology**, v.163, n.4, p. 334-341, 2006.

UBBIN, J.B.; VERMAAK, W.J.H.; BISSBORT, S. rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human. **J Chromatogr.**, v.565, p.441-446, 1991.

UELAND, P. M.; REFSUM, H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. **J Lab Clin Med.** , v.114, n.5,p. 473-501, 1989.

UELAND, P.M.; REFSUM, H.; STABLER, S.P.; MALINOW, M.R.; ANDERSSON, A.; ALLEN, R.H. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. **Clin Chem.**, v.39, p.1764-79, 1993.

VAN BELLEN, B.; ZORN, W.G.W. Laboratório Vascular. In: BRITO, C. J.; DUQUE, A.; MERLO, I.;MURILO, R.; LAURIA FILHO, V. **Cirurgia Vascular**. 1 ed. Rio de Janeiro : Revinter, 2002. p. 188-206.

VALENTINE, R.J.; VERSTRAETE, R.; CLAGETT, G.P; COHEN, J.C. Premature cardiovascular disease is common in relatives of patients with premature peripheral atherosclerosis. **Arch Intern Med.** , v.160, p.1343–1348, 2000.

VENÂNCIO, L.S. **Indicadores nutricionais e níveis de homocisteína em pacientes com doença arterial periférica**, 2002. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, 2002.

VENÂNCIO, L.S.; BURINI, R.C; BONETTI; OSHIDA,W.B. Hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica . **J Vasc Br.**, v.3, n.1, p.31-7, 2004.

VENUGOPAL, S.K.; DEVARAJ, S.; YUHANNA, I.; SHAUL, P.; JIALAL I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. **Circulation**, v. 106, p.1439–1441, 2002.

VENUGOPAL, S.K.; DEVARAJ, S.; JIALAL I. C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. **Circulation**, v. 108, p.1676–1678, 2003.

WADHAM, C.; ALBANESE, N.; ROBERTS, J.; WANG, L.; BAGLEY, C.J.; GAMBLE J.R.. et al. High-density lipoproteins neutralize C-reactive protein proinflammatory activity. **Circulation**, v.109, p.2116–2122, 2004.

WANG, T.J. ; GONA, P.; LARSON, M.G. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. **N Engl J Med.**, v.355, p.2631-2639, 2006.

WATTANAKIT, K., FOLSOM, A.R.; SELVIN, E. Risk factors for peripheral arterial disease incidence in persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Atherosclerosis**, v.180, p.389–397, 2005.

WELCH, G.N.; LOSCALZO, J. Homocysteine and atherothrombosis. **N Engl J Med.**, v.338, p.1042-9, 1998.

WOODBURN, K.R.; RUMLEY, A.; LOVE, J.G.; MURRAY, G.D.; LOWE, G.D. Influence of graft material on blood rheology and plasma biochemistry following insertion of an infrainguinal bypass graft. **Br J Surg.**, v.85, p.351–4, 1998.

ZAKHARY, R.; GAINE, S.P.; DINERMAN, J.J.L. Heme oxygenase 2 : endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation . **Proc Natl Acad Sci.**, v.93, p. 795-798,1996.

ZWAKA, T.P.; HOMBACH, V.; TORZEWSKI, J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. **Circulation**, v. 103, p. 1194–1197, 2001.

APÊNDICE A.

DOENÇA ARTERIAL OBSTRUTIVA PERIFÉRICA : relação entre marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e de disfunção endotelial.

### PROTOCOLO DE PESQUISA

A- IDENTIFICAÇÃO : GRUPO A ( ) GRUPO B ( )

- 1- Nome :
- 2- Registro do Prontuário :
- 3- Idade :
- 4- Sexo :
- 5- Endereço ou telefone :

### B- FATORES DE RISCO

- 1- Tabagismo ( ) sim ( ) não Quantidade de cigarros: Tempo:
- 2- Colesterol Total ( ) HDL ( ) LDL ( ) VLDL ( )
- 3- Triglicérides ( )
- 4- Hipertensão Arterial ( ) sim ( ) não Medida :
- 5- Diabetes Melito ( ) sim ( ) não Medida : Tempo:

### C- CLASSIFICAÇÃO DE FONTAINE

- Tipo IIa ( ) Tipo IIb ( ) Tipo III ( )

### D- ÍNDICE TORNOZELO-BRAQUIAL

MID ( ) MIE ( )

### E- RESULTADO DAS DOSAGENS :

- Proteína C reativa ultrasensível :
- Fibrinogênio :
- Homocisteína :

- Catalase :
- Glutathione :
- Superóxido dismutase :
- Nitrito :

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)