UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LAURA DE ANDRADE DA ROCHA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS COMPONENTES DO SISTEMA DAS CININAS, ÓXIDO NÍTRICO E METALOPROTEINASES COMO MARCADORES NA REESTENOSE PRECOCE DE *STENTS* REVESTIDOS PÓS ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÂNEA PERIFÉRICA

RIBEIRÃO PRETO
2015

LAURA DE ANDRADE DA ROCHA

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de teses e Dissertações da USP (BDTD)

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS COMPONENTES DO SISTEMA DAS CININAS, ÓXIDO NÍTRICO E METALOPROTEINASES COMO MARCADORES NA REESTENOSE PRECOCE DE *STENTS* REVESTIDOS PÓS ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÂNEA PERIFÉRICA

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: **Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato**

Ribeirão Preto
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rocha, Laura de Andrade da.
Caracterização do perfil dos componentes do sistema das cininas, óxido nítrico e metaloproteinases como marcadores na reestenose precoce de *stent*s revestidos pós angioplastia transluminal percutânea periférica / Laura de Andrade da Rocha ; orientador Carlos Eli Piccinato -- Ribeirão Preto, 2015.
131 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia.

1.Reestenose. 2. Angioplastia Periférica. 3. Hiperplasia Intimal

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laura de Andrade da Rocha

Caracterização do perfil dos componentes do sistema das cininas, óxido nítrico e metaloproteinases como marcadores na reestenose precoce de *stent*s revestidos pós angioplastia transluminal percutânea periférica.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.
Área de Concentração: Clinica Cirúrgica.

Aprovada em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Ao meu amado marido, Érico, e a minha filha, Luiza, por todo o apoio, companheirismo e ajuda inestimável na realização de todas as etapas desta obra.

Dedico também aos meus pais, Altamirando Pereira da Rocha e Cíntia de Andrade da Rocha, pelo amor, apoio e por terem me dado todas as condições de estudo possíveis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua proteção e por estar sempre guiando meus passos.

A meus professores, Prof. Dr. Edwaldo Edner Joviliano, Prof. Dr. Maurício Serra Ribeiro, Prof. Dr. Jesualdo Cherri e Prof. Dr. Takachi Moriya, pela orientação, ensinamentos e apoio.

Em especial, ao Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato, pela atenção e apoio durante o processo de orientação e que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Soninha, minha querida amiga e mãezinha da nossa família vascular HC-RP, com quem sempre pude contar em todos os momentos.

À Prof. Dra. Renata Dellallibera-Joviliano, pela colaboração no trabalho com a realização de parte dos experimentos na UNIFAFIBE, além da orientação e ajuda na elaboração do projeto de pesquisa.

Ao Dr. Thiago Adriano Silva, pela cooperação em todas as etapas do trabalho, principalmente no recrutamento e seguimento dos pacientes.

Ao Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Junior e a sua equipe no laboratório de Bioquímica e Transplante Hepático: Maria Elisa, Maria Cecília, Clarice e Maria Aparecida, pela ajuda no armazenamento das amostras e realização dos experimentos com Óxido Nítrico.

À Fabíola Mestriner, pela grande ajuda na realização dos experimentos com zimografia.

À pos-doutoranda Christiane Becari, pela ajuda nos experimentos com as metaloproteinases e TIMPs, além do suporte na análise dos dados.

Aos residentes, em especial Dr. Fernando, Dr. Emanuel, Dr. Gabriel e Dr. Rafael , pelo auxilio na coleta dos dados.

Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia e suas secretárias, em especial à Juliana e à Sandra.

Aos pacientes que consentiram em participar deste trabalho, sem os quais ele não poderia

ter sido concretizado.

A minha amada filha Luiza, pelo presente que me dá a cada dia.

A meu amado marido Érico Honório Teixeira.

A meus pais e irmãos, pelo apoio.

A meus muitos amigos e colegas de profissão que estiveram ao meu lado.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela minha formação médica, residência médica e pós-graduação.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

.

“Aos outros dou o direto de ser como são, a mim dou o dever de ser cada dia melhor.”

Chico Xavier

RESUMO

Rocha LA. **Caracterização do perfil dos componentes do sistema das cininas, óxido nítrico e metaloproteinases como marcadores na reestenose precoce de *stent*s revestidos pós angioplastia transluminal percutânea periférica.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirao Preto, 2015.

Introdução: A reestenose pós tratamento endovascular de lesões ateroscleróticas em artérias periféricas é a principal desvantagem desta técnica minimamente invasiva. A inflamação vascular após angioplastia com balão e/ou implante de *stent* desempenha um papel importante na proliferação de células do músculo liso vascular e posterior crescimento de uma neoíntima, e vários marcadores inflamatórios têm sido referidos como potenciais preditores dessa complicação, porém os fatores que contribuem para a estenose intra-*stent* no segmento vascular periférico não foram completamente elucidados. Recentemente, tem-se sugerido que a superfície revestida de *stents* recobertos possa impedir a reestenose de forma mais eficaz do que os *stents* convencionais. **Objetivo:** Avaliar o papel do sistema calicreína-cinina (SCC), do óxido nítrico (NO) e das metaloproteinases (MMP), mediadores inflamatórios importantes e que contribuem ativamente para a reparação de tecidos, no processo de reestenose arterial devido a hiperplasia intimal, pós angioplastia com *stent* recoberto no segmento fêmoro-poplíteo, com a intenção de contribuir com novas medidas terapêuticas. **Método**: Foi realizado um estudo prospectivo envolvendo 27 pacientes submetidos à angioplastia com *stent* revestido no segmento fêmoro-poplíteo, selecionados no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do HCFMRP/USP. Foram estudados os seguintes marcadores: sistema calicreína-cininas – com quantificação dos substratos (cininogênio de alto e baixo peso molecular – CAPM / CBPM) e da atividade das enzimas (calicreína plasmática e tecidual e cininase II); a determinação dos níveis de nitrito e nitratos para a avaliação de óxido nítrico; dosagem das MMPs 2 e 9 e dos níveis circulantes de seus inibidores (inibidores teciduais das metaloproteinases - TIMPs [1 e 2]). Amostras de sangue foram coletadas antes do implante do *stent*, 24 horas e seis meses após o procedimento. Foi realizado ultrasson Doppler após seis meses, e, na presença de alterações, realizada angiografia para comprovação da presença de reestenose. **Resultados:** Quatro (14,8%) dos vinte sete pacientes estudados desenvolveram reestenose (≥ 50%) em seis meses. Esses pacientes tiveram níveis significativamente mais baixos de CAPM (24h, $P < 0,05$) e de CBPM (antes – $P < 0,05$; 24 horas $P < 0,01$; 6 meses $P < 0,05$); níveis mais baixos de TIMP 2 (seis meses $P < 0,05$) comparados ao grupo sem reestenose. As atividades da calicreína plasmática e tecidual, da cininase II, NO e MMPs tiveram comportamento semelhante entre os pacientes com e sem reestenose. **Conclusão:** As taxas de reestenose foram baixas com o uso de *stents* revestidos no segmento fêmoro-poplíteo comparativamente aos índices publicados de *stents* não revestidos. Os pacientes que desenvolveram reestenose mostraram níveis reduzidos de cininogênios e de TIMP-2 (seis meses após a angioplastia). Por outro lado, não foi possível demonstrar a participação do óxido nítrico e das metaloproteinases no processo de reestenose.

Palavras-chave: Reestenose. Angioplastia periférica. Hiperplasia intimal.

ABSTRACT

Rocha LA. **Characterization of the profile of kinins system, nitric oxide and metalloproteinases as markers in coated *stent* early restenosis post peripheral percutaneous transluminal angioplasty.** Thesis (PhD) **-** Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Background: Restenosis after endovascular treatment of atherosclerotic lesions in the peripheral circulation is the major drawback of this minimally invasive technique. Vascular inflammation after balloon angioplasty or *stent* implantation plays an important role in smooth muscle cells proliferation and subsequent neointima growth, and various inflammatory markers have been reported as potential predictors of this complication, but the factors that contribute to the in-*stent* stenosis in peripheral vascular segment have not been fully elucidated. Recently, it has been suggested that the coated surface of *stents* grafts can prevent restenosis more effectively than conventional *stents*. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the role of the kallikrein-kinin system (KKS), nitric oxide (NO) and metalloproteinases (MMPs), wich are important inflammatory mediators and actively contribute to tissue repair, in the process of arterial restenosis due to intimal hyperplasia, with the aim of developing new interventions. **Method:** Single-center prospective study with 27 patients with peripheral artery disease (PAD) requiring percutaneous transluminal angioplasty (PTA) and stenting, in the femoropopliteal segment, using coated *stents* grafts, was performed. The following markers were studied: kallikrein-kinin system using the quantification of proteins (high and low weight Molecular kininogen HMWK / LMWK), verification of enzyme activity (tissue kallikrein, plasma kallikrein and kininase II), determination of nitrite and nitrates levels for evaluation of nitric oxide, MMPs 2 and 9 circulating levels and their inhibitors (tissue inhibitors of metalloproteinases [TIMPs 1 and 2]). Serum samples were collected before *stent* implantation, 24 h and six months after the procedure. Doppler ultrasound was performed after six months, and in the presence of any changes, an angiography was performed to prove the presence of restenosis. **Results**: Four (14,8%) of the treated patients developed restenosis (>50%) within 6 months. These patients had significantly lower levels of HMWK (24 hours, $P < .05$), LMWK (before - $P < .05$; 24 hours - $P < .01$; 6 months – $P < .05$) and lower levels of TIMP 2 (6 months < .05) compered to no restenosis group. The activities of plasma and tissue kallikrein, kininase II, NO and MMP had similar behavior among patients with and without restenosis. **Conclusion:** Restenosis rates were low with the use of coated *stents* in the femoropopliteal segment compared to published bare metal *stents* results. Patients with restenosis showed reduced levels of kininogens and TIMP-2 (six months after angioplasty) in patients who developed restenosis. Moreover, it was not possible to demonstrate the involvement of nitric oxide and metalloproteinases in the restenosis process.

Key words: restenosis, peripheral angioplasty, intimal hyperplasia

LISTA DE FIGURAS

Quadro I – Classificação de Rutherford 23

Quadro II – Classificação TASC II para território fêmoro-poplíteo 24

Figura 1 – Diagrama esquemático do sistema calicreína-cininas (SCC) ……... 30

Figura 2 – Representação esquemática demonstrando o papel da ECA na fisiopatologia da hiperplasia intimal, ressaltando os efeitos no endotélio vascular e no músculo liso vascular 34

Figura 3 – Síntese de óxido nítrico na célula endotelial ……. 36

Figura 4 – Organograma ilustrando a distribuição dos pacientes por grupo experimental 58

Figura 5 – Organograma ilustrando a distribuição dos pacientes por grupo experimental 59

Figura 6 – Imagens arteriográficas de segmento fêmoro-poplíteo do membro inferior direito (paciente n^0 19) 59

Figura 7 – Imagens arteriográficas de do segmento fêmoro-poplíteo em membro inferior direito (paciente n^0 4) 60

Figura 8 – Classificação dos pacientes de acordo com o tipo de isquemia, com base na classificação de Rutherford …….…….. 64

Figura 9 – Classificação dos pacientes do grupo estudo de acordo com a classificação do TASC II ……...…….. 65

Figura 10 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade do CAPM medida em em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose 67

Figura 11 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade do CBPM medida em em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose 69

Figura 12 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade da calicreína plasmática medida em U/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose..... 70

Figura 13 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade da calicreína tecidual medida em μM pNa/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose..... 71

Figura 14 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade da cininase II medida em em nmoles His- Leu/ml/min, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose 73

Figura 15 – Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de nitritos/nitratos medida em micromolar, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose..... 74

Figura 16 – Gel de zimografia mostrando, na posição horizontal, as identificações das faixas das bandas da MMP-2 (72kDa) e MMP-9 (92kDa) 75

Figura 17– Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de metaloproteinase-2 medida em Unidades Arbitrárias, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose..... 76

Figura 18 – Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de metaloproteinase-9 medida em Unidades Arbitrárias, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose..... 77

Figura 19 – Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de TIMP-1 medida em ng/ml, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose..... 78

Figura 20 – Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de TIMP-2 medida em ng/ml, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Os efeitos terapêuticos de óxido nítrico sobre a hiperplasia intimal 37

Tabela 2 – Classificação e nomenclatura da família das MMPs 41

Tabela 3 – Características demográficas e clínicas dos subgrupos de pacientes sem reestenose e com reestenose 62

Tabela 4 – Pacientes do estudo (n = 27) com descrição de suas variáveis demográficas de sexo e idade, classificação da isquemia de membros inferiores, classificação do TASC e desfecho (reestenose significativa ≥50%) 63

Tabela 5 – Classificação de acordo com o tipo de isquemia com base na classificação de Rutherford e no TASC II, nos subgrupos de pacientes sem reestenose e com reestenose 64

Tabela 6 – Relação entre o tipo lesão inicial, número de artérias pérvias em perna e o comprimento do *stent* utilizado nos subgrupos de pacientes sem e com reestenose 66

Tabela 7 – Média ± desvio padrão da atividade do CAPM em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 67

Tabela 8 – Média ± desvio padrão da atividade do CBPM em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 68

Tabela 9 – Média ± desvio padrão da atividade da Calicreína Plasmática em U/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 70

Tabela 10 – Média ± desvio padrão da atividade da calicreína tecidual em µM pNa/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 71

Tabela 11 – Média ± desvio padrão da atividade da cininase II em nmoles His-Leu/ml/min, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 72

Tabela 12 – Média ± desvio padrão da atividade do óxido nítrico representado pela concentração de nitritos/nitratos em micromolar (µM), nos grupos sem e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 74

Tabela 13 – Média ± desvio padrão da concentração de metaloproteinase-2 por unidades arbitrárias, nos grupos sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 76

Tabela 14 – Média ± desvio padrão da concentração de metaloproteinase-9 por unidades arbitrárias, nos grupos sem e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses da angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 77

Tabela 15 – Média ± desvio padrão da concentração de TIMP-1 em ng/ml, nos grupos sem e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 78

Tabela 16 – Média ± desvio padrão da concentração de TIMP-2 em ng/ml, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
Ang	Angiotensina
anti-IgG	*anti-Imunoglobulina G*
Arg	Arginina
ATP	Angioplastia Transluminal Percutânea
ATR-1	Receptor de angiotensina-1
ATR-2	Receptor de angiotensina-2
bFGF	Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos
BK	Bracinina
Ca^{2+}	Cálcio
CaCl	Cloreto de Calcio
CAPM	Cininogênio de alto peso molecular
CBPM	Cininogênio de baixo peso molecular
Cat	Categoria
CML	Célula muscular lisa
CPM	Carboxipeptidase M
CPN	Carboxipeptidase N
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DP	Desvio padrão
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDAS	*Eletrophoresis Documentation and Analysis System*
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid*
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
eNOS	isoforma endotelial da Óxido Nítrico Sintase
Eq	Equivalentes
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FP	Fêmoro – Poplíteo
GC	Guanilato ciclase

GMPc	Guanosina Monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
HCL	Ácido Clorídrico
HCRP	Hospital das clínicas de Ribeirão Preto
HI	Hiperplasia Intimal
Hip-His-Leu	Hipuryl-L-histidyl-L-leucin
His-Leu	L-histidyl-L-leucine
HPLC	High performance liquid chromatography
IFN-α	Interferon- alfa
IL	Interleucina
iNOS	isoforma induzível da Óxido Nitrico Sintase
LPS	Lipopolissacárides
mA	mAmperes
MEC	Matriz Extracelular
mcg	micrograma
MMP	Metaloproteinase da matriz extracelular
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen
NANC	Neurotransmissor não-adrenérgico não-colinérgico
NaOH	Hidróxido de sódio
nNOS	isoforma neuronal da Óxido Nítrico Sintase
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OPA	*o*-phthalaldehyde
P	Padrão
PAF	Fator de ativação plaquetário
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG	Polietilenoglicol
R	Reestenose
rpm	rotações por minuto
SCC	Sistemas das Calicreínas-Cininas
SR	Sem reestenose
TASC II	*Trans-Atlantic Inter-Society Consensus for Management of Peripheral Arterial Disease*

TGF-β	Fator de crescimento tumoral beta
TIMP	Inibidor endógeno das metaloproteinases
TNF	Fator de necrose tumoral
UA	Unidades Arbitrárias
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 18
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 21
2.1 Aterosclerose..... 22
2.2 Sistema calicreína-cinina..... 27
2.3 Óxido nítrico 34
2.4 Metaloproteinases.....40
3 OBJETIVOS 45
3.1. Objetivo geral 46
3.2 Objetivos específicos..... 46
4 POPULAÇÃO E MÉTODO..... 47
4.1 População 48
4.2 Método 49
4.2.1 Descrição do dispositivo..... 49
4.2.2 Realização do procedimento e liberação do dispositivo..... 49
4.2.3 Acompanhamento pós-operatório..... 50
4.2.4 Colheita do material..... 50
4.2.5 Análise laboratorial..... 51
4.2.5.1 Óxido Nítrico..... 51
4.2.5.2 Metaloproteinases..... 51
4.2.5.3 Inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs 1 e 2)..... 52
4.2.5.4 Cininogênios..... 53
4.2.5.5 Calicreína plasmática..... 54
4.2.5.6 Calicreína tecidual..... 54
4.2.5.7 Cininase II ou ECA (enzima conversora de angiotensina) 55
4.3 Análise estatística..... 56
5 RESULTADOS..... 57
5.1 Caracterização da população..... 58
5.1.1 Dados clínicos..... 58
5.1.2 Evolução Clínica..... 62
5.2 Dosagens dos marcadores inflamatórios..... 66
5.2.1 Sistema calicreínas-cininas……..……..... 66
5.2.1.1 Cininogênio de alto peso molecular (CAPM)..... 66
5.2.1.2 Cininogênio de baixo peso molecular (CBPM)..... 68
5.2.1.3 Calicreína plasmática..... 69
5.2.1.4 Calicreína tecidual.....71
5.2.1.5 Cininase II.....72
5.2.2 Nitritos e nitratos – NO..... 73
5.2.3 Metaloproteinases..... 75
5.2.4 Inibidores plasmáticos das metaloproteinases – TIMPS..... 78
6 DISCUSSÃO..... 81
7 CONCLUSÃO..... 89
REFERÊNCIAS..... 91
ANEXOS..... 115

1 - INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Doença Arterial Obstrutiva Periférica (DAOP) é altamente prevalente na população em geral, podendo levar à claudicação limitante ou isquemia crítica com risco de perda do membro afetado. O tratamento endovascular – angioplastia transluminal percutânea (ATP), com ou sem *stent*, é um procedimento minimamente invasivo no tratamento da DAOP dos membros inferiores, e sua realização tem aumentado exponencialmente nas últimas décadas.

O segmento fêmoro-poplíteo (FP) representa cerca 40% de vasos periféricos tratados, porém seu tratamento é um desafio para o especialista endovascular em virtude de elevadas taxas de reestenose (variam de 30 a 50% nos primeiros seis/doze meses) (SCHILLINGER et al., 2006; SCHILLINGER et al., 2007; LAIRD et al., 2010), levando à falência do procedimento.

As taxas de perviedade, após ATP e implante de *stent*, dependem amplamente da localização da lesão tratada. A ATP de artérias elásticas de maior calibre, como carótidas internas e ilíacas, está associada com menores taxas de reestenose se comparada com artérias musculares, como no segmento FP (JEANS et al., 1990; MATSI et al., 1994; TETTEROO et al., 1998; DORMANDY; RUTHERFORD, 2000; AHMADI et al., 2001), e especula-se que essas diferenças sejam decorrentes da extensão do processo inflamatório em resposta ao tratamento endovascular.

De fato, já foi demonstrado que o implante de *stent* no segmento FP foi associado a uma resposta inflamatória mais intensa quando comparado com o mesmo procedimento em artérias ilíacas e carótidas (SCHILLINGER et al., 2002). Alguns estudos indicaram, de forma consistente, que mecanismos inflamatórios desempenham papel fundamental no processo de proliferação da neoíntima e reestenose pós-*stent* (FORRESTER et al., 1991; KORNOWSKI et al., 1998; YUTANI et al., 1999).

Novos designs de *stents* estão sendo constantemente desenvolvidos, não só para melhorar flexibilidade, resistência mecânica e perfil dos dispositivos, mas também para superar o problema de reestenose devido ao remodelamento negativo e fomação de neointima. Em contraste com as variações dos dois tipos básicos de *stents* vasculares disponíveis (o clássico expansível por balão e as novas gerações de *stents* autoexpansíveis com liga de cobalto ou níquel titânio – nitinol), surgem os *stents* revestidos, antes utilizados apenas para tratamento de aneurismas e fístulas, que incorporam a vantagem teórica de limitar a hiperplasia intimal (HI) com base no pressuposto de que o polímero

que recobre o *stent* tem o potencial de reduzir o crescimento do tecido no local de tratamento e assim melhorar a patência primária do mesmo.

Dados recentes evidenciam resultados superiores com uso de *stents* revestidos em doenças obstrutivas longas no segmento FP quando comparados aos resultados com uso do *stent* de metal, com taxas de perviedade primária variando de 65 a 85% pós um ano de ATP com *stent* revestido neste segmento (SAXON et al., 2003; SAXON et al., 2007; KEDORA et al., 2007; SAXON et al., 2008; LAMMER et al., 2013) .

O processo de reestenose tem sido extensivamente estudado após angioplastia coronariana (LANDAU; LANGE; HILLIS, 1994), porém os fatores que contribuem para a estenose intra-*stent* no segmento vascular periférico não foram completamente elucidados, principalmente com a utilização de *stents* revestidos.

Com base no exposto acima, esta pesquisa clínica visa estudar o processo inflamatório subjacente à ATP com colocação de *stent* revestido no território vascular periférico, mais especificamente no território FP, através da dosagem de componentes do Sistema Calicreína-cininas (SCC), do óxido nítrico (NO) e das metaloproteinases (MMPs). Entender os fatores que contribuem para a fisiopatologia da reestenose pós angioplastia é a base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas para melhorar os resultados a longo prazo.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aterosclerose

A aterosclerose constitui-se em uma das principais causas de morte no mundo ocidental e, apesar de amplamente estudada em seus diferentes aspectos, não tem ainda, perfeitamente estabelecida, sua etiopatogenia, admitida como multifatorial. Em virtude disso, não há ainda uma terapêutica específica, e o tratamento, em geral, é dirigido para suas complicações (MAFFEI, 2008).

A deposição de gordura, chamada placa de ateroma, aparece nas camadas internas das artérias. A formação dessas placas começa com a deposição de pequenos cristais de colesterol na íntima. Em seguida, as placas aumentam com a proliferação do tecido fibroso e de músculo liso, causando uma protuberância no interior das artérias e, consequentemente, reduzindo o fluxo de sangue para uma determinada região. A produção de tecido conjuntivo por fibroblastos e a deposição de cálcio causam o endurecimento das artérias. Finalmente, a superfície irregular das artérias resulta na formação do coágulo, o que leva à obstrução brusca do fluxo de sangue (RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

Os estudos epidemiológicos identificaram inúmeros fatores clínicos possivelmente associados à disfunção endotelial e ao desenvolvimento das placas ateroscleróticas, admitindo como principais fatores de risco para aterosclerose: idade acima de 50 anos; sexo masculino; hipercolesterolemia com níveis elevados de LDL modificados (considerada o mais importante fator de risco para a aterogênese); hipertensão arterial sistêmica (por causar lesão endotelial); radicais livres gerados pelo tabagismo; diabetes melito; além de obesidade e fatores genéticos ou história familiar de doença aterosclerótica (MAFFEI, 2008; BRITO, 2008).

Há regiões do leito vascular que são particularmente propensas à formação da placa de ateroma, como as artérias coronarianas, a bifurcação carotídea, a aorta abdominal infrarenal e as artérias ilíaco-femorais. Isso se deve a uma série de variáveis hemodinâmicas que foram propostas para explicar a distribuição seletiva das placas: estresse de cisalhamento, separação do fluxo e estase, oscilação dos vetores do estresse de cisalhamento, turbulência e hipertensão (RUTHERFORD, 2005).

A aterosclerose é responsável por mais de 85% das doenças arteriais periféricas, e os sinais e os sintomas resultam da isquemia dos tecidos dependentes da artéria acometida.

Nos membros inferiores, a isquemia pode resultar da obstrução lenta e progressiva ou da obstrução aguda da artéria, levando à claudicação intermitente, dor em repouso ou até mesmo gangrena no membro, com risco de perda do mesmo (MAFFEI, 2008). O quadro clínico do paciente portador de DAOP depende da fase da doença aterosclerótica, da extensão e da gravidade das lesões arteriais, entre outros fatores. A doença pode ser classificada em estágios, de acordo com Fontaine, ou em graus e categorias, como propõe Rutherford (Quadro 1). Apesar do tratamento clínico, muitos pacientes necessitam de intervenção cirúrgica para restituição do fluxo sanguíneo adequado.

Quadro I – Classificação de Fontaine e Rutherford

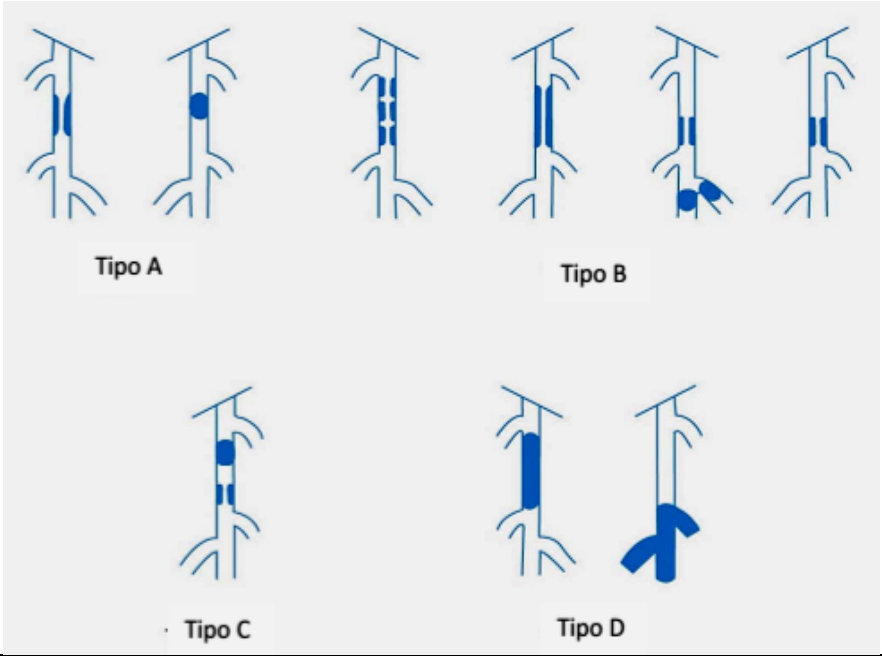
	Fontaine			Rutherford
Estágio	Quadro clínico	Grau	Categoria	Sintomas clínicos
I	**Assintomático**	0	0	Assintomático
IIa	**Claudicação leve**	I	1	Claudicação leve
IIb	**Claudicação moderada a grave**	I	2	Claudicação moderada
III	**Dor em repouso**	I	3	Claudicação grave
IV	**Ulceração ou gangrena**	II	4	Dor isquêmica em repouso
		III	5	Perda tecidual menor
		III	6	Perda tecidual maior

Fonte: adaptado de Maffei (2008).

O tratamento ideal da doença oclusiva periférica é controverso. Os principais fatores a serem considerados incluem a gravidade dos sintomas, comorbidades, a sobrevida do paciente e o padrão anatômico da doença. Opções para revascularização incluem cirurgias abertas, como *by-pass* e endarterectomia ou endovascular – angioplastia com balão, com *stents* de metal ou *stents* recobertos. A escolha do tratamento intervencionista, endovascular ou cirurgia aberta, depende basicamente da extensão da doença no setor FP e da avaliação de *inflow* e *outflow*. Para isso, o TASC *working group* desenvolveu uma classificação com o objetivo de simplificar a terapia mais adequada (Quadro II). Embora o tratamento endovascular tenha mostrado resultados favoráveis em outros leitos vasculares, tais como as artérias ilíacas (SULLIVAN et al., 1997; TETTEROO et al., 1998) e a aorta abdominal (MARTINEZ; RODRIGUEZ-LOPEZ; DIETHRICH, 1997), os resultados são extremamente variáveis nas artérias infrainguinais. Na verdade, a artéria femoral superficial continua sendo um grande desafio para o especialista endovascular, uma vez que é propensa a frequente reestenose após intervenções endovasculares, com taxas variando de 30 a 50% (SCHILLINGER et al., 2006; SCHILLINGER et al., 2007; LAIRD

et al., 2010). Já foi demonstrado que procedimentos de revascularização realizados no segmento FP estão associados com maior resposta inflamatória do que em outros leitos arteriais, o que pode contribuir para maiores taxas de reestenose nesse segmento (SCHILLINGER et al., 2002).

Quadro II – Classificação TASC II para território fêmoro-poplíteo



Tipo da Lesão	Descrição
A	– Estenose única < 10 cm de comprimento – Oclusão única - < 5 cm de comprimento
B	– Lesões múltiplas (estenoses ou oclusões) cada qual < 5cm – Estenose única ou oclusão < 15 cm não envolvendo a artéria poplítea infra-genicular – Lesões múltiplas ou isoladas na ausência de vasos tibiais contínuos para melhorar o inflow para uma ponte distal – Oclusão intensamente calcificada < 5 cm em comprimento – Estenose poplítea isolada
C	– Estenoses ou oclusões múltiplas totalizando > 15 cm de com ou sem calcificação – Estenoses ou oclusões recorrentes que necessitam tratamento após duas intervenções endovasculares
D	– Oclusão da AFC* ou AFS** (> 20 cm, envolvendo a artéria poplítea) – Oclusão da artéria poplítea e trifurcação dos vasos tibiais

* Artéria femoral comum
** Artéria femoral superficial
Fonte: adaptado de Norgren (2007).

Acredita-se que as características hemodinâmicas e da parede de cada segmento arterial influenciem na susceptibilidade de reestenose, no entanto a extensão da resposta inflamatória pode também contribuir para o padrão específico de reestenose intra-*stent*, tão variável em artérias ilíacas, carótidas e femorais.

A fisiopatologia da reação da parede vascular após implante de *stent* ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que a lesão da íntima e da média, pelo *stent*, pode causar uma resposta inflamatória perivascular e que a gravidade da lesão arterial durante o implante de *stent* se correlaciona com o aumento da inflamação (FARB et al., 1999; VIRMANI; FARB, 1999). Esse processo inflamatório vascular desempenha um papel importante na proliferação de células do músculo liso vascular e posterior crescimento de uma neoíntima (KORNOWSKI et al., 1998; YUTANI et al., 1999). A proliferação vascular de células musculares lisas e a formação de uma neoíntima hipertrófica subsequente na artéria tratada levam à reestenose intra-*stent*.

O *stent* é geralmente utilizado se o resultado da angioplastia com balão for tecnicamente insatisfatório ou se existir oclusão arterial, recolhimento elástico imediato, dissecção ou reestenose. A resposta de um vaso ao implante de um *stent* depende do desenho, comprimento, composição do *stent*, sistema de entrega e da técnica de implantação (LOWE; OESTERLE; KHACHIGAN, 2002). A inflamação na parede do vaso em resposta à lesão por balão ou à implantação do *stent* inicia a formação de uma neoíntima hipertrófica por meio da proliferação de células de músculo liso e remodelamento vascular constritivo (O'BRIEN; SCHWARTZ, 1994; ROSS, 1999; ORFORD et al., 2000). Esse processo de formação da neoíntima e um estreitamento recorrente do lúmen têm sido referidos como manifestação da resposta inflamatória de cicatrização expressa especificamente no tecido vascular (FORRESTER et al., 1991).

O evento inicial para a formação da HI é a desnudação endotelial. A lesão da camada de endotélio expõe as células musculares lisas (CMLs) subjacentes a elementos do sangue em circulação, ativando, então, uma cascata de eventos que culminam na hiperplasia miointimal (CLOWES; REIDY; CLOWES, 1983). Em poucos segundos após a perda do endotélio, plaquetas agregadas se aderem ao local da lesão, mantendo-se aderidas até sete dias depois (FINGERLE et al., 1989). As plaquetas formam uma monocamada no local do trauma e descarregam o conteúdo dos seus grânulos densos, e dentre as substâncias libertadas está o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que causam a migração e a proliferação de CMLs na parede vascular lesionada (ROSS et al., 1974; ROSS, 1981). Após a agregação e a adesão plaquetária, ocorre a quimiotaxia

leucocitária. Os leucócitos são fundamentais na secreção de várias citocinas e fatores de crescimento que influenciam os eventos posteriores na HI (MITRA; DEL CORE; AGRAWAL, 2005). Um exemplo são os macrófagos que produzem PDGF e interleucina-1 (IL-1), ambos liberados na parede arterial durante o processo de reparação e promovem a proliferação das CMLs (ROSS; RAINES; BOWENPOPE, 1986; LIBBY; WARNER; FRIEDMAN, 1988). A proliferação das CMLs se inicia nas primeiras 24 horas após a lesão e continua durante várias semanas (CLOWES; CLOWES; REIDY, 1986). Sob a influência do PDGF, as CMLs iniciam a migração para a íntima entre um e três dias após lesão (CHEN et al., 2006). A matrix extracelular (MEC) geralmente atua como uma barreira para a migração das CMLs da média para a camada íntima, no entanto, após um trauma vascular, a MEC é modificada para permitir o movimento dessas células. A migração de células e a reconfiguração da MEC estão associadas com aumento na expressão e na atividade de enzimas que degradam a matriz. Dois exemplos são o ativador de plasminogênio, que fragmenta coágulos e ativa as enzimas que degradam a matriz, e as metaloproteinases da matriz, que degrada o colágeno e a elastina (BENDECK et al., 1994; HASENSTAB; FOROUGH; CLOWES, 1997). Finalmente, para restaurar a barreira protetora do endotélio prejudicado pela lesão, a proliferação endotelial deve ocorrer. Concomitante com a proliferação e a migração de CMLs vasculares, a regeneração endotelial começa através da estimulação por fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) em menos de 24 horas após a lesão (LINDNER; MAJACK; REIDY, 1990). Essa regeneração começa a partir das extremidades da área desnudada e se aproxima do centro, dentro de várias semanas, restaurando a continuidade endotelial (CLOWES; REIDY; CLOWES, 1983).

Os *stents* revestidos são recobertos internamente por uma camada de politetrafluoretileno expandido (ePTFE) e foram primariamente indicados para aneurismas arteriais e fístulas (STORGER; HAASE, 1999). O seu uso também mostrou-se seguro e eficaz em ferimentos penetrantes arteriais (ROCHA et al., 2013). Recentemente, sugeriu-se que a superfície recoberta dos *stent*s revestidos possam prevenir reestenose mais efetivamente que os *stent*s convencionais (RUEF; HOFMANN; HAASE, 2004). Kedora et al. (2007) demonstraram, em seus estudos, que a angioplastia com *stent* revestido em segmento FP suprapatelar tem resultados semelhantes à revascularização cirúrgica com prótese de PTFE. A cobertura microporosa de politetrafluoretileno do *stent* recoberto inibe o desenvolvimento de reestenose intra-*stent* no segmento FP, e dados clínicos sugerem o potencial desse dispositivo em oferecer melhores taxas de perviedade do que a angioplastia

com *stent* não recoberto nesse segmento tão desafiador (JAHNKE et al., 2003; SAXON et al., 2003; SAXON et al., 2008).

A literatura tem demonstrado, dentre outros, o papel das citocinas e proteases no processo de inflamação vascular crônica, porém esses fatores que contribuem para a reestenose intra-*stent* ainda não foram completamente elucidados, principalmente nos vasos periféricos (JOVILIANO et al., 2011). Nas últimas décadas, a introdução e a difusão de novas técnicas de tratamento endoluminal reacendeu a importância do estudo da fisiopatologia do processo da reestenose intra-*stent*.

2.2 Sistema calicreína-cinina

O sistema calicreína-cinina é uma cascata metabólica endógena que resulta na liberação de cininas vasoativas. Esse sistema complexo inclui os precursores das cininas, conhecidos como cininogênios e suas proteases, as calicreínas. As cininas têm efeitos tanto pró-inflamatórios quanto cardioprotetores e estão envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, incluindo o controle da pressão arterial, a cascata de coagulação e a inflamação (MOREAU et al., 2005).

As cininas são peptídeos farmacologicamente ativos que são formados nos tecidos e em diferentes fluídos biológicos pela ação enzimática das calicreínas sobre os cininogênios. Dentre as cininas, a mais importante é o nonapeptídeo bradicinina (BK, Arg^{1}-Pro^{2}-Pro^{3}-Gly^{4}-Phe^{5}-Ser^{6}-Pro^{7}- Phe^{8}-Arg^{9}), descoberta por três fisiologistas brasileiros, liderados por Maurício Rocha e Silva, durante estudos sobre a histamina, em 1949 (SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949). A calidina ou Lys-BK e a Met-Lys-BK também fazem parte da família das cininas e são convertidas em BK pela ação de aminopeptidases presentes no plasma e urina.

Cininogênios são proteínas derivadas de globulinas sintetizadas principalmente pelo fígado, cérebro, rins, neutrófilos e plaquetas, que são secretados para a circulação (BHOOLA; FIGUEROA; WORTHY, 1992a; SCHMAIER et al., 1999). Em humanos, podem se apresentar de duas formas, como cininogênio de alto peso molecular e como cininogênio de baixo peso molecular. Muitas enzimas, como tripsina, uropepsina e plasmina, podem gerar BK a partir de cininogênio, mas as mais potentes enzimas com atividade cininogenásica são as calicreínas, presentes no plasma ou tecidos (BHOOLA; FIGUEROA; WORTHY, 1992a).

A calicreína plasmática é sintetizada pelo fígado. Encontra-se na circulação na forma inativa e é denominada de pré-calicreína ou fator de Fletcher. É convertida em calicreína ativa pelo fator de Hageman ativo (fator XIIa). Quando ativa, a calicreína plasmática cliva o cininogênio de alto peso molecular (CAPM) para gerar a BK. De forma interessante, a calicreína plasmática é capaz de converter o fator XII, inativo, em fator XIIa, que participa da cascata de coagulação intrínseca. Assim, parece que cininas podem ser geradas em paralelo com a formação de trombina em sítios inflamatórios, já que calicreína plasmática pode ser ativada por esse fator de coagulação (KAPLAN et al., 1997). A calicreína tecidual é sintetizada pelas glândulas salivares, rins, cérebro, pâncreas e neutrófilos e tem ampla distribuição no organismo, como rins, artérias e veias, coração, cérebro, dentre outros tecidos, indicando que o SCC tem importante função parácrina (CARRETERO; SCICLI, 1988). Essa protease, ao contrário da calicreína plasmática, cliva o cininogênio de baixo peso molecular (CBPM) para gerar Lys-bradicinina (calidina), que é subsequentemente convertido para BK por uma segunda clivagem (KAPLAN et al., 1998).

A meia-vida estimada das cininas é extremamente curta, menos de 30 segundos no plasma (SAAMELI; ESKES, 1962). Cininas ativas são rapidamente clivadas por várias peptidases, denominadas de cininases. As cininases mais relevantes, na maioria dos tecidos ou circulação, são: as cininases I e a enzima conversora de angiotensina (cininase II ou ECA). As cininases I, conhecidas coletivamente como carboxipeptidases M (CPM) e N (CPN), removem os resíduos Arg9 de ambas as cininas, gerando des-Arg9 Bk ou des-Arg9 Lys-Bk. A cininase II, também conhecida como enzima conversora de angiotensina (ECA), é uma dipeptidilcarboxi peptidase que inativa a BK e a Lys-BK (BHOOLA; FIGUEROA; WORTHY, 1992a; MARGOLIUS, 1996).

Estudos farmacológicos demonstraram que as cininas atuam através de dois tipos de receptores de cininas: o receptor da bradicinina B1 (B1R) e o receptor B2 da bradicinina (B2R). Os B2R são receptores expressos constitutivamente na maioria dos tecidos e apresentam alta afinidade por BK, estando envolvidos em diversos efeitos das cininas, como vasodilatação, efeitos antitróficos vasculares e cardíacos e controle do fluxo renal e excreção de sódio. A administração de um agonista B2 de longa duração resultou em uma melhora da função cardíaca e do remodelamento tecidual, além de diminuição da expressão gênica de fatores teciduais relacionados à injúria e à inflamação em camundongos submetidos a infarto do miocárdio (MARKETOU et al., 2010). Os B1R são induzidos sob condições de stress, incluindo a inflamação e o trauma. Esse tipo de receptor

está pobremente expresso em condições fisiológicas no organismo, mas pode ser induzido *in vivo* e *in vitro* por endotoxinas, citocinas e fator de crescimento, indicando que esses receptores podem ser importantes em condições como inflamação ou lesão tissular (BHOOLA; FIGUEROA; WORTHY, 1992a). As cininas intactas se ligam a receptores B2 da bradicinina, enquanto metabólitos das cininas, como Des-Arg9-BK ou Des-arg10-Lys-BK, ligam-se a receptores B1 da bradicinina. Ambos, B1R e B2R, são sete receptores transmembranares acoplados com proteínas-G, e sua estimulação eleva as concentrações intracelulares de Ca^{2+} e a atividade fosfolipase A2, levando à liberação de vários mediadores, incluindo o óxido nítrico (NO), as prostaglandinas (PGs), os ácidos araquidônicos e outros agentes inflamatórios (MORAND-CONTANT; ANAND-SRIVASTAVA; COUTURE, 2010; KUHR et al., 2010; KAKOKI; SMITHIES, 2009).

Conforme Figura 1, a pré-calicreína e a pró-calicreína são ativadas em calicreína plasmática e tecidual, respectivamente. Elas agem sobre os cininogênios, CAPM e CBPM, para gerar BK e calidina (Lys BK), que atuam através do receptor B2 (B2R). A BK é gerada a partir da calidina pela ação de uma Arginina Aminopeptidase (AAP). Esses peptídeos podem ainda ser processados para as suas des-Arg metabólitos pelas carboxipeptidases (cininases I). As Des-Arg cininas se ligam ao receptor B1 (B1R). As cininas são rapidamente inativadas pela cininase II (Adaptado de Pathak et al., 2013).

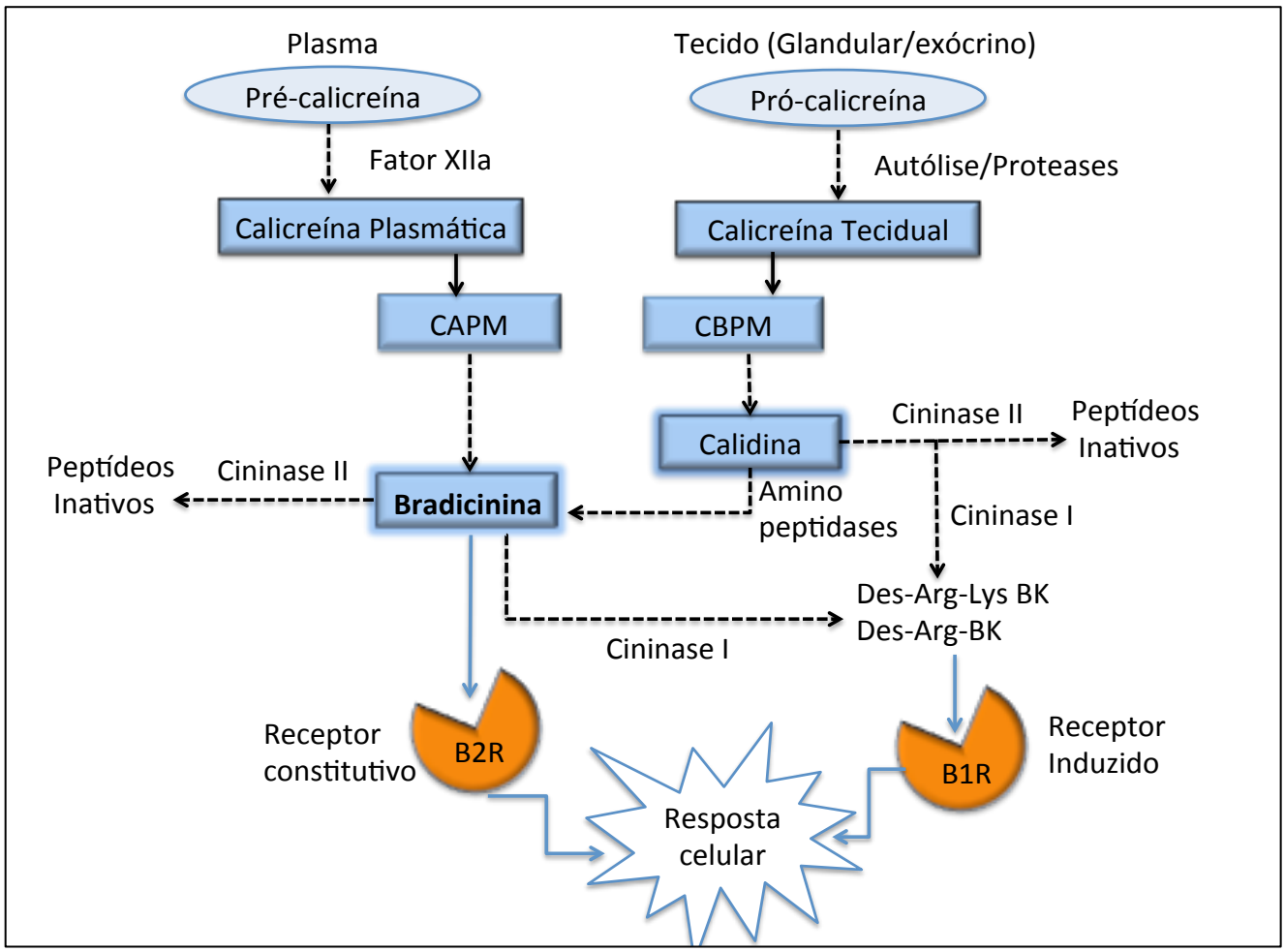


Figura 1 – Diagrama esquemático do sistema calicreína-cininas (SCC)

Fonte: adaptado de Pathak et al. (2013).

Existem diversas evidências indicando que as cininas são rapidamente geradas após lesão tecidual e parecem modular a maioria dos eventos observados durante os processos inflamatórios, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático, migração celular, dor, edema e hiperalgesia por estímulo das terminações nervosas, além de que atuariam na contração de vários músculos lisos (uterino, intestinal e brônquico) e regulação do volume e composição da urina (REGOLI; BARABE, 1980; HALL; MORTON, 1991; CALIXTO et al., 2000). O efeito mais proeminente induzido pela administração intravenosa de BK é a queda da pressão arterial resultante de vasodilatação periférica. Esse efeito resulta da ativação de receptores do tipo B2 presentes nas células endoteliais vasculares e da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio que se difundem para a musculatura lisa vascular.

Vale ressaltar que as ações celulares das cininas podem ser diretas ou indiretas e são atribuídas a suas propriedades de estimular a liberação de diversos mediadores como a

substância P, fator de ativação plaquetária (PAF), leucotrienos, prostaglandinas, noradrenalina e óxido nítrico (NO), além de estimular um aumento da permeabilidade vascular, facilitando a diapedese de neutrófilos e acesso de outros componetes do SCC (BHOOLA; FIGUEROA; WORTHY, 1992a). As cininas também podem estimular a síntese de DNA e a proliferação celular, podendo perpetuar a inflamação crônica (BHOOLA; ELSON; DIEPPE, 1992b). Elas estimulam também a produção do fator de necrose tumoral (TNF) e da interleucina-1 (IL-1) pelos macrófagos que, dentre outras funções, promove a quimiotaxia e a aderência de neutrófilos ao endotélio (BURCH; CONNOR; TIFFANY, 1989; TIFFANY; BURCH, 1989).

Outros estudos têm demonstrado a participação do SCC em doenças inflamatórias sistêmicas, como o lupus eritematoso sistêmico, com manifestações mucocutâneas e nefrite lúpica com elevação significativa tanto dos cininogênios quanto das enzimas (calicreínas plasmática e tecidual e cininase II) no plasma e urina desses pacientes (DELLALIBERA-JOVILIANO; REIS; DONADI, 2010a; DELLALIBERA-JOVILIANO; REIS; DONADI, 2001). Na tromboangeíte obliterante, também verificou-se participação do SCC com elevação nos níveis desses mesmos componentes no plasma, com especial menção aos tabagistas ativos que apresentaram maiores níveis em relação aos portadores da doença e ex-tabagistas (DELLALIBERA-JOVILIANO; JOVILIANO; EVORA, 2010b).

Deve-se relatar também a interação do SCC com o sistema renina-angiotensina. Como citado anteriormente, a cininase II, ou ECA, atua em ambos os sistemas, sendo que, por um lado, tem a função de degradar as cininas biologicamente ativas (dentre essas, a principal é a bradicinina) e, por outro lado, tem a função de converter a angiotensina I (Ang I) em angiotensina II (Ang II). Os receptores da Ang II existem em dois subtipos: AT1R e AT2R. A Ang II atua principalmente através dos receptores AT1 (AT1R) para exercer a maioria de seus efeitos biológicos. O AT1R é expresso no músculo liso vascular, coração, pulmões, fígado, rim, cérebro e suprarrenais (TIMMERMANS et al., 1993). Nos músculos lisos vasculares, a estimulação do AT1R medeia a vasoconstrição, a formação da MEC, a proliferação celular, a resposta inflamatória e o estresse oxidativo (DE GASPARO, 2002; WASSMANN; NICKENIG, 2006).

Procedimentos de revascularização podem causar lesão e trauma em quantidades variáveis e inevitáveis para a parede vascular. A lesão varia desde danos restritos ao endotélio vascular à lesão de toda a espessura da parede vascular dependendo da intervenção realizada. Várias enzimas-chave na via renina-angiotensina tecidual são expressas em resposta à lesão vascular, levando o tecido vascular tanto a responder

vigorosamente à Ang II quanto a produzi-la. O estiramento/lesão vascular induz a expressão da ECA tecidual e estimula a liberação de Ang II (SADOSHIMA et al., 1993; RAKUGI et al., 1994b; BECKER et al.,1998). Além disso, o AT1R – principal receptor responsável pela ação fisiológica bem como pelos efeitos fisiopatológicos da Ang II - é expresso em níveis aumentados na íntima em resposta à injúria vascular (VISWANATHAN et al., 1992). A inibição sistêmica da cininase II tem reduzido significativamente a HI após ATP com cateter-balão em carótidas de ratos de uma forma dose-dependente (POWELL et al., 1989; RAKUGI et al., 1994a).

A angiotensina II contribui para a disfunção endotelial através de vários mecanismos. Em estados patológicos, como hipertensão, insuficiência cardíaca ou aterosclerose, ela exerce efeito pró-apoptótico, pró-trombótico, pró-inflamatório e pró-oxidante (DE GASPARO, 2002a; WERNER et al., 2008). Por intermédio de suas ações sobre o AT1R, a Ang II estimula a produção de NADPH oxidase vascular, a formação de radicais de superóxido (GRIENDLING et al., 1994; HITOMI et al., 2006) e, pela ativação do inibidor do ativador do plasminogênio-1 e fator tecidual, favorece um ambiente pró-trombótico (VAUGHAN; LAZOS; TONG, 1995; SIRONI et al., 2001). Ela também inicia uma resposta pró-inflamatória por indução de expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e da molécula de adesão intercelular -1 (ICAM-1), do fator de necrose tumoral-α (TNF-α), da interleucina-6 (Il-6) e da proteína quimiotáctica de monócitos-1 (MCP-1) de modo similar ao observado no diabetes e na aterosclerose (TUMMALA et al., 1999; MERVAALA et al., 1999; SCHIEFFER et al., 2000). Como consequência, a angiotensina II promove a disfunção endotelial e, além disso, desencadeia apoptose endotelial vascular através da ativação de caspase-3 (DIMMELER et al., 1997).

A atividade tecidual local da cininase II tem sido correlacionada com o grau de HI (RAKUGI et al., 1994a). A administração de Ang II estimula o crescimento de CMLs in vitro em modelos de cultura de células de músculo liso de aorta de ratos (GEISTERFER; PEACH; OWENS, 1988) e humanos (CAMPBELL-BOSWELL; ROBERTSON, 1981) . Ademais, experiências in vivo utilizando um modelo de rato de lesão por balão em carótida demonstraram que a administração da Ang II induz a síntese de DNA de células do músculo liso e a proliferação destas no sítio de lesão vascular (DAEMEN et al., 1991). Ang II promove tanto a hipertrofia (GEISTERFER; PEACH; OWENS, 1988) quanto a hiperplasia de CMLs (CAMPBELL-BOSWELL; ROBERTSON, 1981; DAEMEN et al., 1991).

Em estados de estresse vascular, como na aterosclerose ou na lesão vascular, as

CMLs sofrem uma rápida proliferação e migração. A Ang II altera o equilíbrio entre as vias proliferativas e antiproliferativas que medeiam o crescimento das CMLs por ativação dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (PGDFs), dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e do fator de crescimento tumoral -β (TGF- β) (fatores de crescimento autócrinos); ela estimula tanto a via proliferativa quanto antiproliferativa no músculo liso vascular, sendo o resultado final a hipertrofia e/ou hiperplasia das CMLs vasculares (ITOH et al., 1993; GIBBONS; PRATT; DZAU, 1992). Além disso, a angiotensina II estimula a produção da metaloproteinase da matriz (TAKAGISHI et al., 1995), que é um passo fundamental na proliferação e migração de CMLs vasculares, e, em última análise, participa de diversos componentes da reestenose e do remodelamento cardiovascular (SIWIK; PAGANO; COLUCCI, 2001; FUNCK et al., 1997). A Figura 2 representa o papel da ECA tanto no sitema das cininas quanto na produção de angiotensina II, contribuindo para a HI.

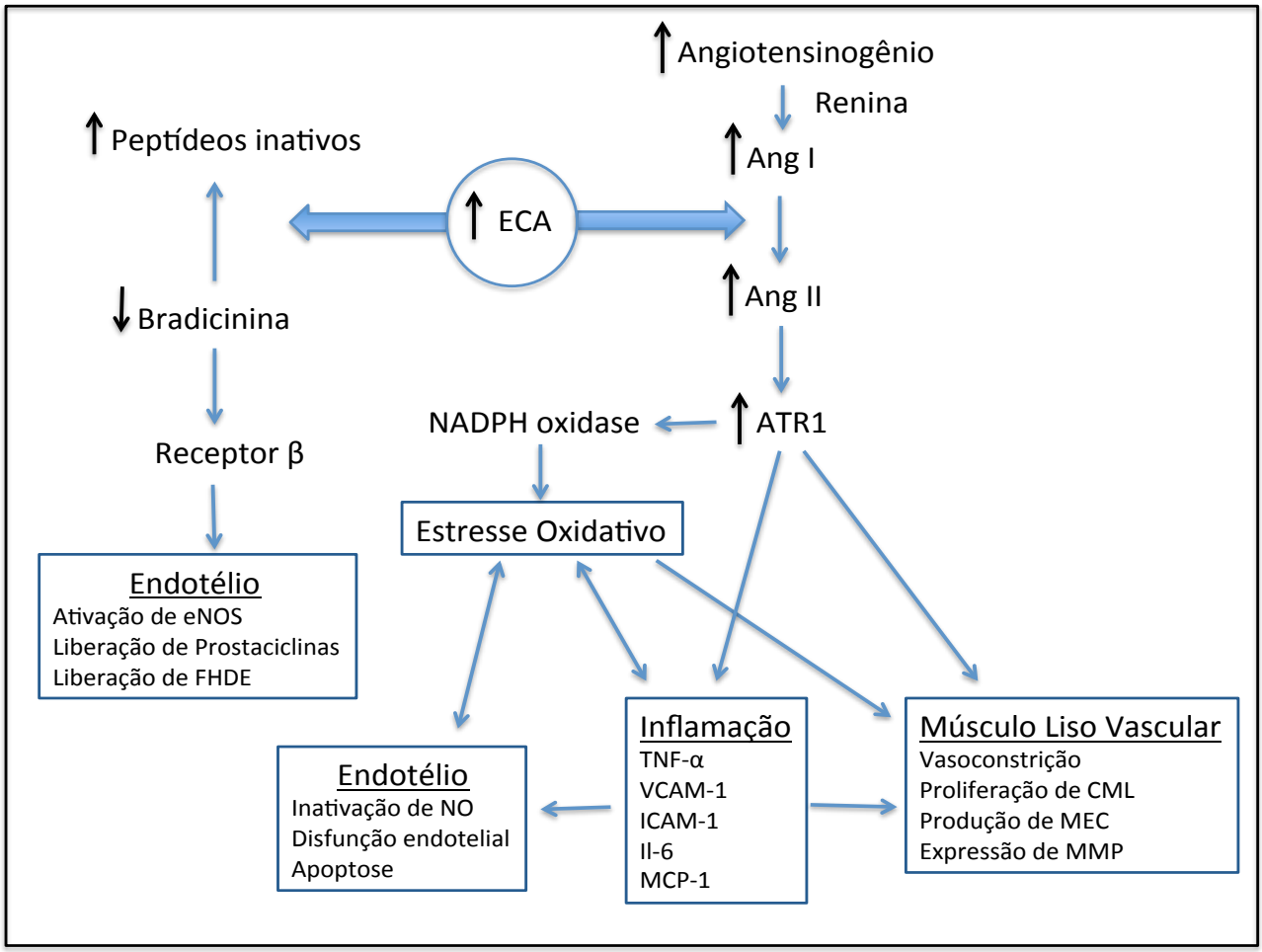


Figura 2 – Representação esquemática demonstrando o papel da ECA na fisiopatologia da hiperplasia intimal, ressaltando os efeitos no endotélio vascular e no músculo liso vascular

Fonte: adaptado de Osgood (2012).

2.3 Óxido nítrico (NO)

O papel do óxido nítrico (NO) na reestenose/hiperplasia intimal tem sido estudado por meio da dosagem sérica de nitritos e nitratos. O óxido nítrico é um gás com meia-vida na ordem dos segundos e é altamente difusível, o que lhe permite rapidamente atingir as células adjacentes. É sintetizado por uma família de óxido nítrico sintases (NOS) que produzem NO e citrulina através da oxidação da L-arginina. Três isoformas distintas de NOS foram identificadas nos seres humanos e em outros organismos (IGNARRO et al.,1999), sendo que duas dessas formas estão expressas constitutivamente: a NOS neuronal (nNOS, também conhecido como NOS-1 porque foi primeira isoforma descoberta) e a NOS endotelial (eNOS; NOS-3), ambas reguladas por cálcio e

calmodulina. A terceira isoforma é induzível (iNOS; NOS-2) e sua expressão é manifestada em uma série de células diferentes, incluindo macrófagos, células endoteliais, CMLs vasculares e miócitos cardíacos. A iNOS é regulada pela estimulação de citocinas, lipopolissacárides (LPS), cininas e outros, sendo capaz de produzir quantidades de NO muito superiores às produzidas pelas outras duas isoformas (LEI et al., 2013).

Em células endoteliais, o óxido nítrico é essencial para a manutenção da integridade e da homeostase do endotélio (MONCADA; HIGGS, 1993). O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela ação da eNOS na presença de oxigênio, NADP (H) e do cofator da NOS, tetra-hidrobioterina (BH4) (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988). O NO sintetizado difunde-se rapidamente na camada de células de músculo liso e nas plaquetas, onde ativa a guanilato ciclase (GC), com a consequente produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). A presença de GMPc, por sua vez, promove o relaxamento vascular e inibição da agregação de plaquetas, mantendo o equilíbrio entre fatores pró e antitrombóticos no sangue e na parede arterial. No entanto, como a meia-vida de NO é muito breve, oxidando-se rapidamente em nitrato, a ativação contínua da eNOS torna-se um fator determinante da síntese de NO e em sua biodisponibilidade tecidual (MONCADA; HIGGS, 1993). Normalmente, a eNOS é ativada pelo fluxo de sangue turbulento contra a parede endotelial luminal *(shear stress)* bem como pelo estiramento das células da parede vascular, pelas alterações na tensão de oxigênio e estimulação do receptor muscarínico pela acetilcolina, promovendo o relaxamento do músculo vascular, um efeito conhecido como "vasodilatação dependente do endotelio" (POHL; BUSSE, 1989; HUTCHESON; GRIFFITH, 1991).

Conforme ilustra a Figura 3, a acetilcolina (Ach) ou a bradicinina liga-se ao seu receptor acoplado à proteína G que leva a um aumento de cálcio (Ca^{+2}) intracelular. O estresse mecânico também promove este aumento por abertura de ionóforos de Cálcio. O Ca^{+2} liga-se a calmodulina e este complexo ativa a eNOS, a qual converte L-arginina em NO e citrulina. A iNOS ativa também pode participar desta conversão. A seguir o NO formado age na célula muscular lisa ativando a GC, a qual converte guanosina trifosfato (GTP) em GMPc. O GMPc é o responsável pelos efeitos finais da cascata como o relaxamento, diminuição da agregação e adesão plaquetária.

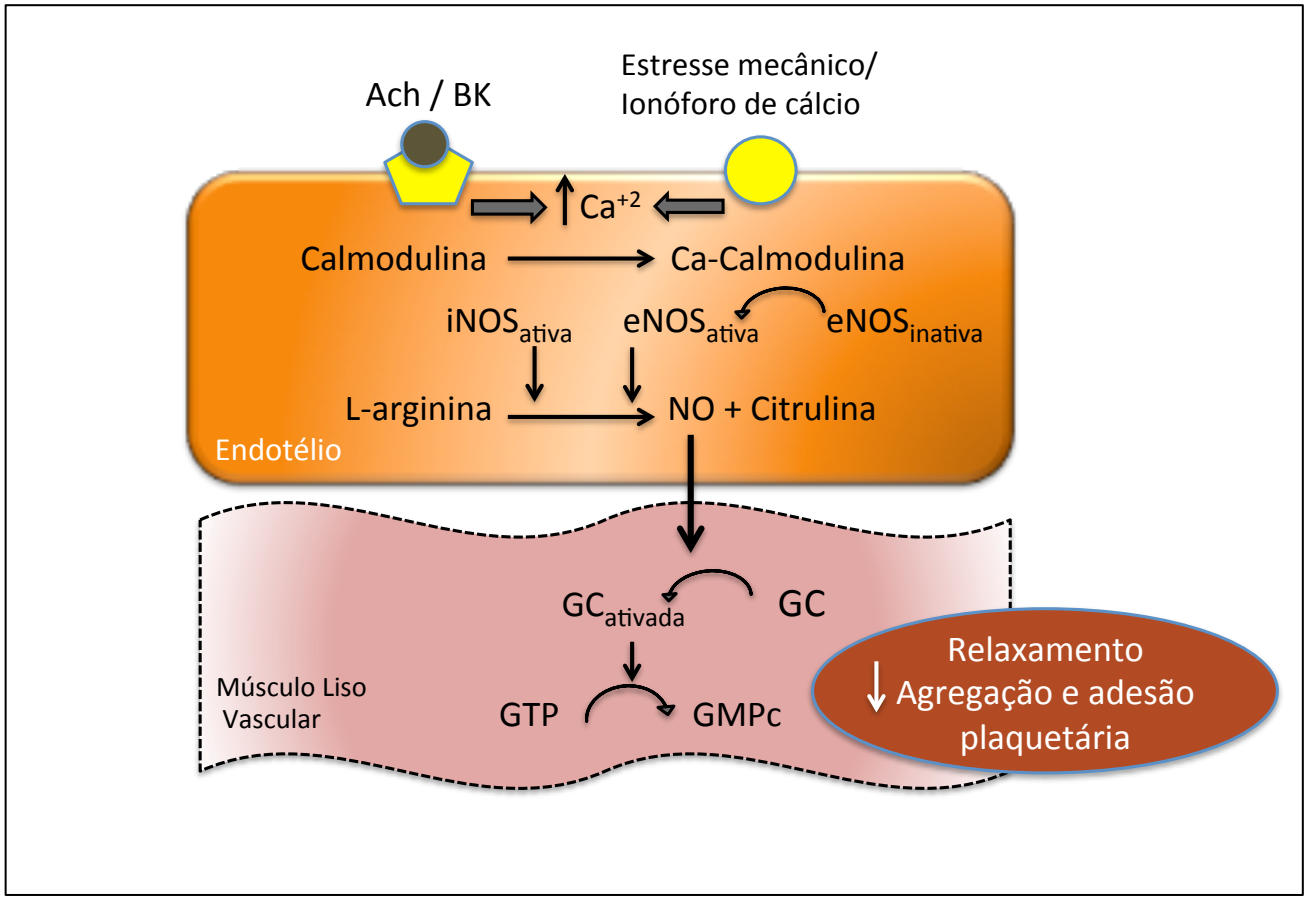


Figura 3 – Síntese de óxido nítrico na célula endotelial

Fonte: adaptado de Alef (2012).

Na presença de fatores de risco para doença cardiovascular, incluindo hipercolesterolemia, tabagismo, diabetes melito e hiper-homocisteinemia, associados à predisposição genética e fatores ambientais, o endotélio arterial perde sua função reguladora normal da homeostase; um conceito denominado "disfunção endotelial" (WIDLANSKY et al., 2003). A lesão física ou bioquímica do endotélio prejudica a produção de mediadores homeostáticos vasculares, tais como NO, o que resulta na formação aumentada de trombos, em um tônus vascular aberrante e disfunção do crescimento de CML. De fato, uma das características de um endotélio disfuncional é a biodisponibilidade diminuída de níveis NO. Quando presente, a disfunção endotelial serve como um marcador precoce de aterosclerose (VERBEUREN et al., 1986).

O NO desempenha um papel protetor na lesão vascular; inibe a proliferação e a migração de CML, tanto através de vias GMPc dependentes quanto por vias GMPc independentes (GARG; HASSID, 1989; CORNWELL et al., 1994; DUBEY; JACKSON; LUSCHER, 1995; SARKAR et al., 1996); aumenta a proliferação e a migração de células

endoteliais e inibe sua apoptose (ZICHE et al., 1994; GUO et al., 1995; PAPAPETROPOULOS et al., 1997; TZENG et al., 1998); suprime a agregação de plaquetas (MELLION et al., 1983; MCCALL et al., 1989) e inibe a adesão de leucócitos, monócitos e de plaquetas ao endotélio (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991;YAN et al., 1996; HICKEY et al., 1997; PENG; SPIECKER; LIAO, 1998). O resultado desses efeitos é a inibição da hiperplasia da íntima após lesão mecânica ou imunológica da parede do vaso.

Dado o importante papel do NO na manutenção de um ambiente vascular normal, muitos investigadores aventaram a hipótese de que a incrementação de NO no local da lesão poderia impedir o desenvolvimento da hiperplasia neointimal. A Tabela 1 resume uma gama de terapias baseadas em NO que foram investigadas (SADAF et al., 2007).

Tabela 1 – Os efeitos terapêuticos de óxido nítrico sobre a hiperplasia intimal

Método	Fonte de NO	% Inibição	Espécie	Modelo	Referência/ano
Inalação NO	NO	43	Rato	Angioplastia Balão	Lee,1996
L-arginina sistêmica	L-arginina	39	Coelho	Angioplastia Balão	McNamara, 1993
	L-arginina	65	Rato	Angioplastia Balão	Chen, 1999
Doadores NO	Molsidomine	32	Porco	Angioplastia Balão	Groves, 1995
sistêmicos	Linsidomine, Molsidomine	18	Humano	Angioplastia Coronariana	Lablanche, 1997
	Aspirina - NO	23	Camundongo	Angioplastia Balão	Napoli, 2001
	Molsidomine	0	Humano	Angioplastia Coronariana	Wohrle, 2003
Terapia genética	Adenovirus eNOS	70	Rato	Angioplastia Balão	von der Leyen, 1995
NOS	Adenovirus eNOS	37	Rato	Angioplastia Balão	Chen, 1998
	Adenovirus eNOS	72	Rato	Angioplastia Balão	Janssens, 1998
	Adenovirus eNOS	28	Porco	Angioplastia Coronariana	Varenne, 1998
	Adenovirus iNOS	95	Rato	Angioplastia Balão	Shears, 1998
	Adenovirus iNOS	30	Porco	Enxerto Venoso	Kibbe, 2001
	Adenovirus iNOS	37	Porco	Angioplastia Coronariana	Wang, 2001
Doadores locais NO	NO-albumina	77	Coelho	Angioplastia Balão	Marks, 1995
	L-arginine	37	Coelho	Lesão Iliaca	Schwarzacher, 1997
	SPER/NO	41	Coelho	Enxerto Venoso	Chaux, 1998
	SNAP	36	Coelho	Enxerto Venoso	Fulton, 1998
	SPER/NO	73	Rato	Angioplastia Balão	Kaul, 2000
	SIN-1	46	Porco	Angioplastia Coronariana	Harnek, 2003
Próteses liberam	*Stent* liberador NO	0	Porco	*Stent* Coronária	Yoon, 2002
NO	*Stent* liberador NO	32	Coelho	*Stent* Aórta	Do, 2004
	Stent liberador NO	24	Rato	Angioplastia Balão	Hou, 2005

SPER/NO = espermine/NO; SNAP = S-nitroso-N-acetylpenicillamine; SIN-1 = 3-morpholino-sydnonimine
Fonte: adaptado de Sadaf (2007).

Em 1996, Lee et al. examinaram os efeitos da inalação de NO e demonstraram uma redução de 43% na HI, porém sob administração contínua, levantando questões sobre a

viabilidade da aplicação em seres humanos. Em estudo realizado por McNamara et al. (1993), administrou-se L-arginina (precursor de NO) em coelhos após lesão induzida por cateter na aorta torácica. Esse tratamento, muito simples, resultou em uma redução da hiperplasia da íntima em 39% em comparação com os controles não tratados. Essa redução foi revertida pela coadministração de L-NAME (L-arginine methyl ester, um inibidor da NOS), indicando que esses efeitos eram específicos para NO. Chen, Mattar e Lumsden (1999) administraram L-arginina na água de beber dos ratos que foram submetidos a lesão por balão na artéria carótida: os animais tratados com L-arginina mostraram redução de 65% na HI em comparação com os controles. Apesar desses sucessos em modelos animais, não há testes em humanos que tenham demonstrado conclusivamente a eficácia clínica da administração de L-arginina sistêmica sobre a inibição da hiperplasia miointimal.

Além de L-arginina, muitos estudos também têm utilizado a administração sistêmica de doadores de NO. Groves et al. (1995) administraram, por via oral, o doador molsidomina a cada oito horas, por 48 horas, em um modelo de angioplastia com balão em carótida de porco e mostraram redução de 32% na HI em 21 dias. No entanto, essa redução ocorreu apenas quando a lâmina elástica interna das artérias permanecia intacta após a angioplastia. Não houve influência significativa sobre a HI nas lesões arteriais mais graves. É possível que os efeitos antiproliferativos de NO administrado por via oral tenham sido surpreendidos quando a lesão era grave e, portanto, não foram associados a uma redução no espessamento da camada íntima. Apesar desse fato, Napoli et al. (2001) demonstraram que camundongos que receberam um derivado de aspirina para liberação de NO experimentaram menor reestenose após angioplastia coronária transluminal percutânea. Além de resultados contraditórios em estudos clínicos humanos, a administração sistêmica de NO pode ter efeitos indesejáveis, como vasodilatação e hipotensão, dores de cabeça e aumento nas complicações hemorrágicas, limitando, em última análise, sua aplicação clínica.

As técnicas de transferência genética surgiram como uma opção terapêutica interessante para tratar doenças vasculares, e, como tal, muito esforço tem sido investido em estudar os efeitos da transferência do gene NOS sobre a hiperplasia miointimal. Em 1995, von der Leyen et al. (1995) utilizaram um liposoma viral altamente eficiente (Sendai) para transferir o gene eNOS para artérias carótidas de ratos após lesão por balão e demonstraram uma redução de 70% na hiperplasia intimal em duas semanas. Chen et al. (1998) utilizaram um retrovírus para transferir gene eNOS para CMLs e utilizaram o modelo de lesão por balão na artéria carótida de ratos para demonstrar que a HI foi inibida

em 37% em duas semanas após a lesão. Em modelo animal maior, Varenne et al. (1998) descobriram que a transferência mediada por adenovírus de eNOS para CMLs restabelece a produção de NO nas artérias coronárias lesadas de porcos, reduzindo significativamente a reestenose arterial.

A transferência de genes de iNOS demonstrou efeitos similares sobre a hiperplasia intimal. Shears et al. (1998) mostraram que a entrega adenoviral de genes iNOS humanos em artérias carótidas de ratos com lesão por balão resultou em uma redução de 95% no espessamento intimal após duas semanas. Esse efeito protetor foi revertido por infusão contínua de um inibidor seletivo de iNOS. Para estudar um modelo clinicamente mais relevante, enxertos de veia foram infectadas com AdiNOS e interpostas em artérias carótidas de suínos. A superexpressão de iNOS inibiu hiperplasia da íntima nos enxertos em 30% aos 21 dias após a cirurgia de *bypass* (Kibbe et al., 2001). Esses resultados foram apoiados por Wang et al. (2001), que demonstraram que a transferência de genes iNOS inibe a HI em 37% no modelo de *stent* coronário porcino.

Muitos investigadores têm estudado os efeitos da entrega local de NO no leito arterial lesionado. Marks et al. (1995) investigaram o impacto de um doador local de NO (pS-NO-BSA) em lesão arterial por balão em coelhos. Localmente entregue, o pS-NO-BSA reduziu o desenvolvimento de hiperplasia da neoíntima em 77% e também inibiu a deposição de plaquetas após o desnudamento da artéria. Além disso, Schwarzacher et al. (1997) mostraram que a entrega intramural de L-arginina foi capaz de aumentar a produção de NO local e inibir a formação da HI em 37%, utilizando modelo de angioplastia com balão em artérias ilíacas de coelhos. Outros doadores locais de NO, como óxido nítrico/espermina (SPER/NO), quando aplicados localmente, também têm demonstrado inibir a formação da HI: 41% em modelos de enxerto de veia de coelho após quatro semanas (CHAUX et al., 1998) e 73% nos modelos de angioplastia com balão de ratos após duas semanas (KAUL et al., 2000).

Cada uma das terapias mencionadas tem algumas limitações em sua aplicabilidade clínica por causa de efeitos colaterais sistêmicos, preocupações de segurança, sistemas de entrega complexos ou incapacidade de se concentrar NO no local da lesão por períodos prolongados de tempo. Para contornar esses problemas, pesquisas recentes têm sido direcionadas para a administração de NO através de materiais protéticos de liberação de NO (VERMA; MARSDEN, 2005). Yoon et al. (2002), utilizando um *stent* metálico revestido com um polímero de poliuretano incorporado com um doador de NO (nitroprussiato de sódio), para investigar seu efeito sobre a HI em modelo de lesão

coronária de porcos, não encontraram diferença na área de HI entre os grupos de controle e tratamento após quatro semanas. Em 2004, Do et al. realizaram um estudo utilizando *stents* impregnados contendo microesferas bioabsorvíveis do doador de NO, N-etil-2-etanamina (1-etil-2-hidroxi-2-nitrosohydrazino) em aortas de coelhos. A libertação de óxido nítrico foi mantida durante três semanas e a área de HI no grupo tratado com o NO foi reduzida em 32% em relação aos controles após 28 dias. Um ano mais tarde, Hou et al. (2005) também demonstraram redução na proliferação neointimal quando usaram silicone contendo nitroprussiato de sódio para revestir o interior de um *stent* autoexpansível recoberto com politetrafluoretileno. Depois de implantar o *stent* na artéria carótida de porco, a área média da neoíntima foi reduzida de 2,4 $mm^{2,}$ nos controles, para 0,49 mm^2 nos tratados, o que resultou em uma redução de 24% de estreitamento dos vasos pós controle angiográfico.

Constata-se que terapias a base de óxido nítrico podem ter um impacto significativo sobre o controle da HI na área clínica, e, com base nesse conhecimento, este estudo procurou correlacionar os níveis de NO com o desfecho de reestenose pós angioplastia periférica com *stent* revestido .

2.4 Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMPs) da MEC são uma família de endopeptidases, zinco dependentes, amplamente conhecidas por sua capacidade proteolítica em degradar vários componentes da MEC e promover seu remodelamento (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006). A atividade desequilibrada das MMPs promove processos ateroscleróticos, incluindo a migração de células do músculo liso vascular e a proliferação e infiltração de células inflamatórias na parede vascular (GALIS; KHATRI, 2002; NEWBY, 2006). A inibição das MMPs tem sido sugerida como uma estratégia potencialmente importante na terapia farmacológica de doenças cardiovasculares (CASTRO et al., 2011a; CASTRO; TANUS-SANTOS; GERLACH, 2011b).

As MMPs foram descobertas pela primeira vez em 1962 e descritas em um estudo sobre a morfogênese da cauda de girinos, que observava a atividade colagenolítica durante o processo de degradação de proteínas da MEC (GROSS; LAPIERE, 1962). As MMPs são convencionalmente classificadas em: colagenases, gelatinases, estromelisinas, MMPs de membrana (MT-MMPs) e outras MMPs, com base em sua estrutura e especificidade do substrato em que atuam (Tabela 2) (KUZUYA; IGUCHI, 2003). Elas são sintetizadas e

secretadas como pré-forma latente (zimogênios ou pró MMPs) em condições fisiológicas e sua atividade é regulada em múltiplos níveis, incluindo a transcrição do gene, a ativação de zimogênios e a interação com seus inibidores específicos a fim de limitar sua atividade (CHEN et al., 2013).

Tabela 2 – Classificação e nomenclatura da família das MMPs

	MMP	Nomenclatura comum
Colagenases		
	MMP-1	Colagenase-1
	MMP-8	Colagenase-2
	MMP-13	Colagenase-3
	MMP-18	Colagenase-4
Gelatinases		
	MMP-2	Gelatinase-A
	MMP-9	Gelatinase-B
Estromelisinas		
	MMP-3	Estromelisina-1
	MMP-10	Estromelisina-2
	MMP-11	Estromelisina-3
MMP de membrana		
	MMP-14	MT1-MMP
	MMP-15	MT2-MMP
	MMP-16	MT3-MMP
	MMP-17	MT4-MMP
	MMP-24	MT5-MMP
	MMP-25	MT6-MMP
Outras MMPs		
	MMP-7	Matrilisina-1
	MMP-12	Metaloelastase
	MMP-19	
	MMP-20	Enamelisina
	MMP-26	Matrilisina-2

Fonte: adaptado de Kuzuya (2003)

As MMPs e seus inibidores (inibidores teciduais das metaloproteinases – TIMPs) são fundamentais no remodelamento da MEC, estando envolvidas em muitos processos fisiológicos, tais como desenvolvimento embrionário, ovulação, remodelação óssea e cicatrização de feridas (WITTE et al., 1998). A sua atividade aumentada também tem sido implicada em numerosos processos de doenças, incluindo artrite (LEWIS et al., 1997), metástase de células tumorais (TARABOLETTI et al., 1995), doenças periodontais (CREEMERS et al., 2001), além de ter um importante papel em doenças cardiovasculares,

como a aterosclerose (GALIS et al., 1994), a cardiomiopatia dilatada (TYAGI et al., 1996) e reparação cardíaca pós infarto agudo do miocárdio (CLEUTJENS et al., 1995).

No vaso sanguíneo, as MMPs têm uma função fundamental na manutenção da integridade do vaso por degradar a MEC enquanto nova matriz está sendo sintetizada. No entanto, em determinadas condições, essas MMPs podem contribuir para processos patológicos cardiovasculares. Evidências sugerem que as MMPs contribuem para o desenvolvimento de novas placas ateroscleróticas, permitindo que as CMLs migrem a partir da camada média vascular para a íntima e, também, que podem contribuir para a ruptura dessas placas por degradarem a capa fibrosa que as rodeiam (KUZUYA; IGUCHI, 2003). Sabe-se que as MMPs desempenham um papel-chave na patogênese da reestenose controlando a degradação da MEC, o que facilita o remodelamento da íntima após angioplastia (DOLLERY; MCEWAN; HENNEY, 1995; BENDECK; IRVIN; REIDY, 1996).

As células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, são uma importante fonte de MMPs no tecido vascular. Fatores inflamatórios, incluindo o TNF-α e as interleucinas (IL), estimulam a expressão de MMPs (SIASOS et al., 2012) que, por sua vez, degradam a MEC para facilitar a migração e o recrutamento de células inflamatórias, incluindo células e receptores de superfície celular, além de clivarem outras moléculas não relacionadas à MEC para mediar a adesão, a proliferação e a apoptose de células na parede dos vasos que estão envolvidas no processo inflamatório (PARKS et al., 2004). Portanto, as MMPs são mediadores inflamatórios que ligam a inflamação com a angiogênese e o remodelamento vascular.

Geralmente, a expressão da maior parte das MMPs é encontrada em baixos níveis no tecido adulto normal, mas é suprarregulada durante determinados processos de remodelamento fisiológicos e patológicos. A indução ou estimulação ao nível de transcrição é mediada por uma variedade de citocinas inflamatórias, hormônios e fatores de crescimento, tais como a interleucina-1 (IL-1), a IL-6, o TNF-α, o fator de crescimento epidérmico (EGF), o PDGF, o bFGF e o CD40 (MALIK et al.,1996; SCHONBECK et al., 1997). Outros fatores, tais como corticosteróides, ácido retinóico, heparina e IL-4, demonstraram inibir expressão gênica das MMPs (WASSENAAR et al., 1999). Nem todas as MMPs reagem da mesma forma para o mesmo estímulo. Por exemplo, o TGF-β estimula a MMP-2 e a MMP-9, mas inibe a síntese de MMP-1 e MMP-3 (MAUVIEL, 1993). No caso do interferon-γ (IFN-γ), o impacto sobre a expressão das MMPs é do tipo célula-específico, considerando que o IFN-γ aumenta a expressão de MMP-1 em

queratinócitos e diminui a expressão de MMP-1 em macrófagos e fibroblastos (MAKELA; SALO; LARJAVA, 1998).

Estímulos hormonais, incluindo a angiotensina II, o estrogênio e a progesterona, também participam no remodelamento vascular através da ativação de MMPs vasculares. A Ang II estimula a atividade da MMP-8 e da MMP-13 em lesões ateroscleróticas, induzindo hemorragias intraplaca e ruptura de placa via degradação de colágeno intersticial tipo I (CHENG et al., 2009). Além disso, tem sido observado aumento precoce da expressão MT1-MMP, com aumento subsequente da atividade da MMP-2 e da MMP-9 na formação de aneurisma Ang II induzido (EAGLETON et al., 2006; NAGASAWA et al., 2013). Mulheres na pós-menopausa que receberam terapia de reposição hormonal são mais propensas a sofrer de hiperplasia da íntima após a intervenção vascular, o que implica o papel significativo de estrogênio e progesterona no remodelamento vascular (CHEN et al., 2013). As CMLs vasculares incubadas com estrogênio e progesterona mostram aumento na atividade de MMP-2 (GRANDAS et al., 2009; MOUNTAIN et al., 2012).

Dentre as MMPs, a MMP-2 e a MMP-9 vêm sendo descritas com um papel especial e importante em várias doenças cardiovasculares. Estudos mostram aumento da MMP-2 e da MMP- 9 após angioplastia em carótidas de porco (SOUTHGATE et al., 1996) e achados similares foram encontrados em humanos, como em um estudo com angioplastia coronariana com colocação de *stent* revestido com droga no qual se observou aumento de MMP-2 e MMP-9 após 24 horas do procedimento naqueles pacientes que viriam a apresentar reestenose angiográfica maior que 50% (KATSAROS et al., 2010). Hojo et al. (2002) também encontraram expressão e atividade aumentadas de MMP-2 na circulação coronariana após angioplastia e uma correlação positiva entre os níveis de MMP-2 e o grau de reestenose angiográfica. Além disso, a deleção gênica (*knockout*) em animais para MMP-2 e MMP-9 demonstrou a inibição da migração das CMLs da camada média para a íntima em modelo experimental de lesão arterial (KUZUYA et al., 2003; JOHNSON; GALIS, 2004).

A MMP-2 se caracteriza em sua forma latente por apresentar massa molecular de 72kDa e, na sua forma ativada, de 64 a 68kDa, sendo encontrada na musculatura vascular lisa, no endotélio e nos glomérulos (CAROME et al., 1994). Vários estudos sugerem que a MMP-2 está envolvida no remodelamento vascular associado a doenças cardiovasculares por promover tanto a degradação excessiva das proteínas da MEC quanto por acentuar a migração de CMLs (LI et al., 1996; JENKINS et al., 1998). A MMP-9 apresenta massa molecular de 92kDa em sua forma latente e 82kDa em sua forma ativa (GALIS et al.,

1994) estando presente em macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células mesangiais, células endoteliais e CMLs (VAN DEN STEEN et al., 2002). Há evidências de que ocorra grande expressão da MMP-9 em regiões de placas ateroscleróticas, e vários estudos sugerem que a MMP-9 pode ser um biomarcador de doenças cardiovasculares (ALTIERI et al., 2003; LYNCH et al., 2004).

Os inibidores endógenos das MMPs são os TIMPs, pequenas proteínas de aproximadamente 23kDa. Os TIMPs são expressos por uma variedade de tipos de células e estão presentes na maioria dos tecidos e fluidos corporais. Atualmente, a família TIMP consiste de quatro membros estruturalmente relacionados, TIMP-1, -2, -3 e -4 (DONNELLY; COLLINSON; MANNING, 2003). Os TIMPs se ligam de forma não covalente às MMPs ativas em uma razão molar 1:1. A inibição é realizada através de sua capacidade para interagir com o local de ligação do zinco dentro do domínio catalítico das MMPs ativas (CREEMERS et al., 2001). Existe um certo grau de especificidade da atividade de TIMP em relação a diferentes membros distintos da família das MMPs; em geral, a TIMP-2 mostra uma preferência pela MMP-2, e a TIMP-1 pela MMP- 9 (LI et al., 1998; CHOW; CENA; SCHULZ, 2007).

No presente estudo, procurou-se correlacionar a atividade MMP-2 e MMP-9, além das TIMPs-1 e -2 séricas com a reestenose observada em artérias periféricas pós angioplastia com *stent* recoberto.

3 – OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a evolução clínica e o processo inflamatório relacionado à angioplastia transluminal percutâtena com *stent* revestido em pacientes portadores de DAOP do segmento fêmoro-poplíteo e correlacioná-lo com a presença de reestenose ou não.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a evolução clínica com base nos sintomas, sinais e ITB aos 30 dias, três meses e seis meses após a ATP;

2. Avaliar a incidência de reestenose em pacientes tratados com ATP, com colocação de *stent* revestido no segmento fêmoro-poplíteo, durante o período de seis meses;

3. Determinar os níveis séricos de nitrito/nitrato dos pacientes antes do procedimento, 24h e seis meses após a ATP com colocação de *stent* revestido;

4. Dosagem sérica das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) antes do procedimento, 24h e seis meses após a ATP com colocação de *stent* revestido;

5. Dosagem sérica dos inibidores plasmáticos das metaloproteinases (TIMPs 1 e 2) antes do procedimento, 24h e seis meses após a ATP com colocação de *stent* revestido;

6. Estudar o SCC de todos os pacientes tratados utilizando a quantificação de proteínas (cininogênio de alto e baixo peso molecular) e dosagem sérica das enzimas (cininase II, calicreína plasmática e tecidual) antes do procedimento, 24h e seis meses após a ATP com colocação de *stent* revestido;

7. Correlacionar todos os dados obtidos com a presença de reestenose intra-*stent* revestido.

4 – POPULAÇÃO E MÉTODO

4 POPULAÇÃO E MÉTODO

4.1 População

Seleção dos pacientes e população estudada: foram incluídos no presente estudo 38 pacientes, todos atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas (HCRP) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) no período de julho de 2011 a setembro de 2013, independentemente de grupo étnico, idade e sexo, com diagnóstico de DAOP e que apresentavam indicação de ATP do segmento FP. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP para ser avaliada a sua relevância científica e aprovação (Parecer: nº 300.238).

Critério de inclusão: pacientes com claudicação limitante, dor de repouso e/ou ulceração isquêmica limitada aos dígitos do pé - categoria de Rutherford 3, 4 e 5 (Rutherford, 2005), com evidência angiográfica de doença fêmoro-poplítea na ausência de qualquer doença proximal significativa. Foram incluídos apenas pacientes que preencheram os critérios *Trans-Atlantic Inter-Society Consensus* - TASC II (Norgren et al,2007) para intervenção endovascular (A, B e C) e pacientes com no mínimo duas artérias de deságue em perna. Foram incluídos somente os pacientes que autorizaram participação no estudo por meio de termo de consentimento livre esclarecido (Anexo A).

Critérios de exclusão: foram excluídos pacientes com doenças subjacentes (psicose medicamentosa, meningites, afecções por vírus neurotrópicos, neurocisticercose, esclerose múltipla, tumor cerebral ou intraespinal, neurossífilis, asma, rinite alérgica, lúpus); pacientes com lesões tróficas muito extensas e/ou infectadas ou utilizando medicamentos com possibilidade de interferir no resultado dos marcadores inflamatórios; pacientes sem condições clínicas ou laboratoriais para realização do procedimento invasivo proposto; pacientes que passaram previamente por angioplastia com *stent*; pacientes com trombose do *stent* com necessidade de trombólise intra-arterial ou que, por qualquer motivo, não completaram o tempo total de seguimento de seis meses (até a realização da arteriografia controle e/ou dosagens laboratoriais); e pacientes que se recusaram a participar do estudo.

Avaliação pré-tratamento: o *status* clínico da DAOP foi determinado pelo registro da observação clínica dos sintomas, dos sinais clínicos e do índice tornozelo/braquial (ITB). Os dados demográficos e fatores de risco foram registrados em ficha individual contendo um questionário padronizado: sexo, idade, tabagismo, diabetes melito,

hipertensão, dislipidemia, insuficiência renal. Essas variáveis foram expressas em números absolutos e porcentagem. Para avaliação dos fatores anatômicos e hemodinâmicos da doença arterial, um estudo arteriográfico foi realizado em todos os pacientes, sendo registrado o grau de estenose ou a presença de oclusão, localização, comprimento da lesão a ser tratada, diâmetro da artéria e qualidade do deságue distal. O grau de estenose foi quantitativamente mensurado a partir de imagens em subtração digital e comparado com o segmento arterial aparentemente normal adjacente. Nos casos de doença difusa com múltiplas pequenas estenoses localizadas próximas a uma determinada lesão, as estenoses foram tratadas e quantificadas como lesão única.

4.2 Método

4.2.1 Descrição do dispositivo

Foi utilizado modelo único de *stent* revestido – GORE® VIABAHN® Endoprosthesis. Trata-se de um *stent* de nitinol flexível, autoexpansível, revestido internamente por uma camada de politetrafluoretileno expandido (ePTFE). A flexibilidade desse *stent* permite que ele atravesse áreas tortuosas, como a artéria femoral superficial, e se adapte à complexidade anatômica da artéria. Os diâmetros da endoprótese disponíveis para o segmento fêmoro-poplíteo variam de 5 a 8mm, e comprimentos de 5, 10 e 15cm, com introdutor recomendado variando de 6Fr para *stent* de 5mm a 9Fr para *stents* de 8mm.

4.2.2 Realização do procedimento e liberação do dispositivo

Os procedimentos foram realizados por equipe treinada em cirurgia endovascular, da Divisão de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital de Clinicas de Ribeirão Preto. Comprimidos de ácido acetil salicílico de 100mg e clopidogrel de 300mg (dose de ataque) foram administrados antes do procedimento naqueles pacientes que não faziam seu uso rotineiro. Logo após a punção femoral ipsi ou contra lateral e colocação de introdutor 6 a 8Fr, foram administrados 5.000UI de heparina não fracionada endovenosa. Para a execução da arteriografia, foi utilizado contraste não iônico de baixa osmolalidade (Iopamiron 300, Bracco® Imaging S.p.A., Italy). Lesões estenosantes ou oclusivas foram ultrapassadas utilizando-se fio-guia hidrofílico 0.035, e a pré-dilatação foi realizada com cateter balão de tamanho apropriado (sem *oversizing*). As lesões foram inteiramente cobertas por *stent* recoberto autoexpansível (GORE® VIABAHN® Endoprosthesis), com diâmetro de acordo com o diâmetro nativo do vaso. Após a colocação do *stent*

revestido, realizou-se a dilatação intra-*stent* somente nos casos de estenose residual (estenose>30%). O protocolo medicamentoso pós-intervenção dos pacientes compreendeu o uso contínuo de uma estatina (sinvastatina 40mg), de antiagregantes plaquetários (AAS 100mg e clopidogrel 75mg) e cilostazol (100mg 2x/d) por seis meses, além das medicações de uso habitual dos pacientes.

4.2.3 Acompanhamento pós-operatório

Todos os pacientes foram acompanhados no mesmo ambulatório, com retornos agendados para trinta dias, três meses e seis meses (sendo que o paciente teve livre acesso ao ambulatório se necessário). Nas consultas de retorno, os pacientes foram submetidos a exame físico minucioso, realizado por um dos componentes da equipe, um cirurgião vascular capacitado, avaliando a evolução dos sintomas de claudicação, dor de repouso e cicatrização das lesões troficas. Os pacientes foram submetidos ao cálculo do ITB (durante consulta ambulatorial) e a ultrasson Doppler após seis meses, e, na presença de alterações em um desses exames, foi realizada angiografia para comprovação da presença de reestenose. Quando presentes, as reestenoses foram mensuradas por meio de programa de informática específico (K- pacs IMAGE® Information Systems Ltd., Office 404, 4th floor, Albany House, 324/326 Regent Street, London, W1B 3HH, United Kingdom) e os valores apresentados em porcentagem. Foi considerada reestenose significativa quando igual ou superior a 50%, sendo tratada conforme a indicação de cada caso naquele momento, e o paciente manteve o acompanhamento necessário no ambulatório até receber alta.

4.2.4 Colheita do material

Durante a internação do paciente, foi feita a coleta de sangue periférico imediatamente antes do procedimento e 24 horas após, com o paciente ainda internado. Nova coleta de sangue foi realizada após seis meses do procedimento, durante o atendimento ambulatorial.

Coletou-se sangue através de veia periférica da região antecubital em um volume aproximado de 10mL, o qual foi imediatamente distribuído em tubos da marca BD Vacutainer®: tubo de plástico com Citrato de Sódio Tamponado 0,109 mol e 0,105 mol (3,2%), na proporção de nove partes de sangue para uma parte de solução de Citrato, para análise das calicreínas e cininogênios; tubo com Heparina de Sódio, para a análise de NO, metaloproteinases e atividade da cininase II.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 5.000rpm por 10min para obtenção do plasma, que foi armazenado a -70°C.

4.2.5 Análise laboratorial

4.2.5.1 Óxido nítrico (nitritos e nitratos)

As amostras de plasma foram desproteinizadas por incubação com etanol 95% por 30min e centrifugadas a 10.000 rpm por 5min e utilizado o sobrenadante. Todas as etapas foram realizadas a 4°C. A determinação do NO foi realizada por quimioluminescência NO/ozônio (DWEIK et al. 1.998). A concentração de nitrato foi medida utilizando 5ul da amostra plasmática. Foram injetadas em uma câmara de reação contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCl) a 95°C, que converte o nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é dragado, usando gás nitrogênio, para a câmara de quimioluminescência do Sievers NOAnalizer® (Sievers 280i NOA, Sievers, Boulder, CO, EUA). A detecção do NO decorre de sua reação com o ozônio, emitindo luz vermelha (NO + O3→NO2+ O2; NO2 →NO2 + hv). O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente gerada é convertida por um conversor analógico-digital e analisada em um computador. A área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato da amostra. A concentração de nitrato é calculada por comparação com uma curva padrão usando concentrações conhecidas no intervalo de 100 a 1μM de nitrato de sódio. Os valores de nitrato foram expressos em micromolar (μM).

4.2.5.2 Metaloproteinases

A quantificação das metaloproteinases foi realizada por meio de Zimografia, que é uma técnica de eletroforese em que um substrato proteico, frequentemente gelatina, é polimerizado com a acrilamida durante a solidificação do gel de corrida. Essa técnica se baseia no peso molecular das substâncias, sendo utilizada para identificar a atividade proteolítica das enzimas, que se separam em bandas no gel de poliacrilamida, sob condições não redutoras. Os géis são corados com *Coomassie blue*, e a atividade enzimática é demonstrada pela ausência de coloração (bandas brancas) nas áreas onde o substrato (gelatina) foi degradado.

Preparo das amostras: as amostras foram mantidas no freezer (-20c) até o momento do uso, ficando por 15 minutos à temperatura ambiente antes da aplicação. As

amostras para quantificação de MMP-9 foram preparadas com 15 µl de plasma adicionando 35 µl de água, e, desta mistura, foi retirado 10 µl que, por sua vez, recebeu 10 µl de tampão não redutor 2x, e deste foi aplicado 10 µl no gel. As amostras para quantificação de MMP-2 foram preparadas com 10 µl de plasma adicionando 90 µl de água, e, desta mistura, retirado 10 µl que, por sua vez, recebeu 10 µl de tampão não redutor 2x, e deste foi aplicado 10 µl no gel.

Os géis de poliacrilamida a 12% contendo 1% de gelatina com as amostras acima especificadas foram colocados em placas apropriadas e submetidos a corrente elétrica de 13mA e 40V à temperatura de 4°C. Terminada a corrida, os géis foram retirados das placas e deixados durante à noite em tampão Tris CaCl2 50 mM pH 7,4 para a degradação, pelas metaloproteinases, da gelatina contida no gel. Em seguida, os géis foram corados (utilizando corante Coomassie Blue® G-250), descorados, fotografados em equipamento Kodak Eletrophoresis Documentation and Analysis® System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY, USA), colocados em solução de contração e secos, envoltos por papel celofane. As formas pró e ativa das MMP-2 e MMP-9 foram identificadas através de suas massas moleculares 72kDa, 64kDa, 92kDa e 88kDa, respectivamente (Gerlach et al., 2005, 2007). A leitura das bandas foi realizada com o auxílio do programa Image J, e os valores foram normalizados pela divisão pelo padrão de cada gel. Os valores finais foram expressos em unidades arbitrárias (UA).

4.2.5.3 Inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs 1 e 2)

Para a quantificação das TIMPs 1 e 2, foi utilizado teste *sandwich* ELISA, utilizando Kit industrializado próprio. Esse ensaio emprega a técnica de sanduíche enzima imunoensaio quantitativo. As amostras e as enzimas recombinantes foram incubadas durante duas horas, à temperatura ambiente, em 96 poços, revestidas com anticorpo monoclonal. As amostras de TIMP-1 foram adicionadas a um anticorpo secundário conjugado (peroxidase) por uma hora (Sistemas Quantikine Imuno®, R & D, catálogo no. DTM100), à semelhança do TIMP-2 (Quantikine imunoensaio, R & D Systems, catalogo no. DTM200). Qualquer TIMP, 1 ou 2, presente é ligada pelo anticorpo imobilizado. Após a lavagem para retirar quaisquer substâncias não ligadas, um anticorpo policlonal ligado à enzima específica para o TIMP1 ou 2 humano foi adicionado aos poços. Seguindo uma lavagem para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, o substrato colorimétrico foi adicionado a cada poço, e a mudança de cor ocorreu em proporção à quantidade de TIMP1 ou 2 ligada no passo inicial. O desenvolvimento da cor foi

interrompido e a intensidade dela foi medida em um espectrofotômetro. Os valores das TIMPs 1 e 2 foram expressos em ng/ml.

4.2.5.4 Cininogênios

As concentrações do cininogênio total e as frações CAPM e CBPM foram avaliadas por métodos imunoenzimáticos. As dosagens foram realizadas em duplicata. As determinações do cininogênio total, do CBPM e do CAPM, no plasma, foram realizadas por meio da dosagem da cinina liberada após hidrólise tripsínica do plasma in natura (cininogênio total) ou do plasma previamente tratado com Caulim – 1,5 mg/mL, por 30 minutos, a 37°C (CBPM) utilizando ensaio imunoenzimático (Markit M, Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japão). A determinação do CAPM de cada amostra foi feita pela diferença entre os valores de cininogênio total e os valores do CBPM (MAJIMA et al., 1996; ROTHSCHILD; BODEN; COLMAN, 1996).

Preparo das amostras: antes de iniciar o ensaio, as amostras foram submetidas às etapas de desnaturação, neutralização e tripsinização. Foram utilizadas amostras de 20 µL de plasma tratado ou não com Caulim, seguindo os procedimentos descritos por Diniz e Carvalho (1963). A solução final, contendo as cininas liberadas, foi diluída 3,9 vezes em água destilada e deionizada. A uma alíquota de 100 µL dessa solução, foi acrescentado 20 µL de uma solução desproteinizante, contendo ácido tricloroacético a 20%. Após a centrifugação por 10 minutos a 1000 x g, alíquotas de 20 µL do sobrenadante de cada amostra foram diluídas vinte vezes em tampão neutralizador (Tris-HCl 0,55 M, pH 8,0, contendo NaCl a 0,9%, gelatina a 0,2% e ácido tricloacético a 1,66%) conforme as instruções do fabricante. Assim, as amostras ficaram prontas para serem distribuídas nas placas.

Em placas de poliestireno de 96 poços, previamente revestidos com anticorpo anti-IgG de coelho, foram adicionados em cada poço, 100 µL de anticorpo de coelho antibradicinina. Essa preparação foi incubada por uma hora à temperatura ambiente. Após a lavagem dos poços com tampão apropriado (tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, contendo Triton X-405 a 0,03%, Tween 80 a 0,05 % e NaCl a 0,9%), foram adicionados 100 µL de cada amostra e realizada incubação por uma hora à temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados, a cada poço, 50 µL de bradicinina conjugada à peroxidase, sendo a placa incubada a 4°C por uma noite. Após esse período, a placa foi lavada quatro vezes com o tampão de lavagem, e adicionados em cada poço 100 µL de substrato cromogênico. Após trinta minutos de incubação no escuro, a reação foi interrompida pela

adição de ácido sulfúrico 1,6 N. A leitura foi feita a 492nm (filtro diferencial de 630nm). Para cálculo da concentração de cininogênio, os valores das absorvâncias obtidos nas amostras foram interpolados na curva padrão. Os resultados foram expressos em equivalente de bradicinina por ml de plasma.

4.2.5.5 Calicreína plasmática

Para a determinação da atividade da pré-calicreína, foi utilizado o método descrito por De La Cadena et al. (1987), que se fundamenta na medida da atividade amidolítica da pré-calicreína, após a ativação, sobre o substrato sintético H-D-Pro-Phe-Arg-paranitroanilida (S-2302), liberando o cromógeno paranitroanilina. Esse método consta basicamente de três etapas: inativação dos inibidores da calicreína, ativação da pré-calicreína e avaliação da atividade amidolítica da calicreína propriamente dita.

Para inativação dos inibidores da calicreína, as amostras de plasma foram descongeladas a 37°C, e 50 µL dessas amostras foram incubadas com 50 µL de ácido clorídrico 0,16N por quinze minutos. Em seguida, foi acrescentado a cada amostra 50 µL de um tampão fosfato de sódio 0,1M contendo NaCl 0,15M, EDTA 1mM e azida sódica a 0,02%, pH 7,6 e 50 µL de NaOH 0,16N. Após, 50 µL dessas amostras foram diluídas oito vezes em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,9, contendo PEG 0,1%. Para a ativação da calicreína, 30 µL das amostras, preparadas como descrito acima, foram colocadas, em duplicatas, em poços de uma placa de poliestireno, previamente preenchidos com 20 µL do tampão Tris-HCl e 50 µL do ativador de pré-calicreína plasmática. Após cinco minutos de incubação, a atividade amidolítica da calicreína formada foi determinada pela adição de 50 µL do substrato específico S-2302 (2mM), incubando-se a preparação por mais dez minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido acético a 50%. Todas as etapas foram realizadas a 23°C. Os controles negativos (blanks) contiveram os mesmos reagentes, exceto o plasma ou o substrato. A intensidade da coloração desenvolvida na reação foi detectada com auxílio de um leitor de placas Sigma Diagnostics EIA Multi-well *Reader* (EUA), a 405nm, com filtro diferencial de 630nm. Para o cálculo dos valores de pré-calicreína plasmática das amostras, foi utilizado uma curva padrão de calicreína plasmática humana nas concentrações de 0,6; 1,2; 1,8; 3,0; 4,2; e 6,0mU. Os resultados foram expressos em unidades de calicreína plasmática/mL de plasma.

4.2.5.6 Calicreína tecidual

Para a determinação da atividade da calicreína tecidual, foi utilizado o método

descrito por Amundsen et al. (1979). O método se baseia na atividade amidolítica da calicreína tecidual sobre o substrato cromogênico H-D-Val- Leu-Arg-paranitroanilida (S-2266), com consequente liberação do cromógeno paranitroanilina cuja intensidade da cor, medida espectofotometricamente, é proporcional à concentração da calicreína tecidual presente na amostra.

Ensaio: Foram feitas determinações da atividade amidolítica do plasma na presença ou na ausência da aprotinina, potente inibidor da calicreína tecidual. A diferença entre essas duas determinações expressa a atividade de calicreína tecidual. Em dois tubos de ensaio, foram colocados 20 µL de plasma, diluídos 45 vezes em tampão Tris 0,2 M, pH 8,2, contendo ou não 0,1mg/mL de aprotinina. Os tubos foram incubados por cinco minutos a 37°C em banho-maria. Ao término desse tempo, foram adicionados 100 µL de substrato cromogênico específico S-2266 (Chromogenix, Suécia) (1,5mM), incubando-se a 37°C por vinte minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido acético a 50%. Imediatamente após, efetuou-se a leitura das amostras em espectofotômetro (Micronal B382, Brasil), no comprimento de onda de 405nm. Visando eliminar possíveis interferências ocasionadas pela coloração do plasma, foram utilizados tubos-controle constituídos por todos os reagentes, com exceção do substrato. Os resultados foram obtidos a partir de curva padrão, com a utilização de 5, 10, 20, 30, 40, 50, e 50nmol de paranitroanilina, sendo os resultados expressos em µM pNa/mL plasma.

4.2.5.7 Cininase II ou ECA (enzima conversora de angiotensina)

A atividade da cininase II foi determinada com a utilização do hipuryl-L-histidyl-L-leucine (Hip-His-Leu) como substrato e medida pela análise fluorimétrica para o dipeptídeo His-Leu formado (YANG; NEFF, 1972). O volume de 40 µL de plasma foi incubado a 37ºC com 200 µL de solução de Hip-His-Leu (10mM) em Tampão Tris HCl 20mM com NaCL 0,3M. Após trinta minutos, foi adicionado 1 mL de NaOH 0,5M para interromper a ação enzimática. O dipeptídeo His-Leu foi detectado pela adição de 0,1 mL de *o*-phthalaldehyde (OPA) 1% (massa/volume, em etanol absoluto), seguido da adição de 0,2mL de HCl 6M após quatro minutos. A fluorescência foi medida em fluorímetro Shimadzu HPLC (baixa sensibilidade) com comprimento de onda de excitação de 365nm e de emissão de 495nm. Os ensaios foram feitos em duplicata. Foi construída uma curva padrão para o dipeptídeo His-Leu (0-25 nmol) com a finalidade de estabelecer os parâmetros da relação entre concentração de His-Leu e fluorescência medida pelo espectrofluorímetro.

Foram realizados dois controles: um branco geral por placa, no qual se coloca todos os componentes da reação, menos o plasma, e outro para cada amostra de plasma, no qual se adiciona todos os componentes do ensaio descrito, com exceção do hip- his-leu. Os valores dos controles (branco e plasma) mensurados foram subtraídos de cada amostra. Como, para cada amostra, a análise foi efetuada em duplicata, houve duas leituras para cada amostra e, por esse motivo, para cada amostra, foi calculada a média das leituras efetuadas e, em seguida, o valor obtido foi inserido em uma fórmula para encontrar o valor da atividade da ECA:

[Atividade de ECA]= ([leitura]-y) /slope.

Essa fórmula utiliza o slope e o valor de y obtidos pela curva padrão. A atividade da ECA foi expressa em nmol de His-Leu/min/mL de plasma. Sendo assim, para todos os resultados que serão apresentados neste trabalho, uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 nmol de His-Leu por minuto, por mL de plasma, nas condições descritas.

4.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para verificar normalidade dos dados. Para a comparação das características demográficas e variáveis clínicas dos grupos sem reestenose e com reestenose, foi utilizado o teste exato de Fisher. Para a única variável contínua (idade), primeiro foi feito o teste *f* para variâncias desconhecidas, sendo identificadas variâncias populacionais iguais. Após isso, foi feito o teste *t* para variâncias iguais. Para a análise dos marcadores inflamatórios (óxido nítrico, metaloproteinaises, TIMPs, cininogênios, calicreínas e cininase II), entre os grupos sem reestenose e com reestenose, em cada tempo, nas variáveis com distribuição normal, foi utilizado o teste *t*, e nas variáveis com não normalidade foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para análise das amostras intragrupo nos diversos tempos, para variáveis com normalidade, foi utilizado o teste *t* para dados pareados, e, para variáveis com não normalidade, foi utilizado o teste de Wilcoxon pareado. Foi utilizado o software IBM® SPSS® versão 20.0 com nível de significância menor que 0,05.

No anexo B estão identificados detalhadamente, quais testes foram usados em cada análise.

5 – RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população

5.1.1 Dados clínicos

Foram recrutados 38 pacientes para o estudo, sendo que, destes, nove foram excluídos pelos motivos expostos no método (trombose intraoperatória com necessidade de trombólise, presença de *stent* prévio, perda de seguimento e óbito). Dos 29 pacientes que completaram os seis meses de seguimento, dois pacientes se apresentaram com trombose do *stent* e também foram excluídos do estudo (dados em anexo), restando 27 pacientes: 23 casos sem reestenose (85,2%) e quatro casos com reestenose (14,8%). Os *stents* utilizados foram únicos e não ocorreram fraturas da estrutura dos *stents* durante o tempo de seguimento. A distribuição dos grupos está representada esquematicamente na Figura 4 e na Figura 5.

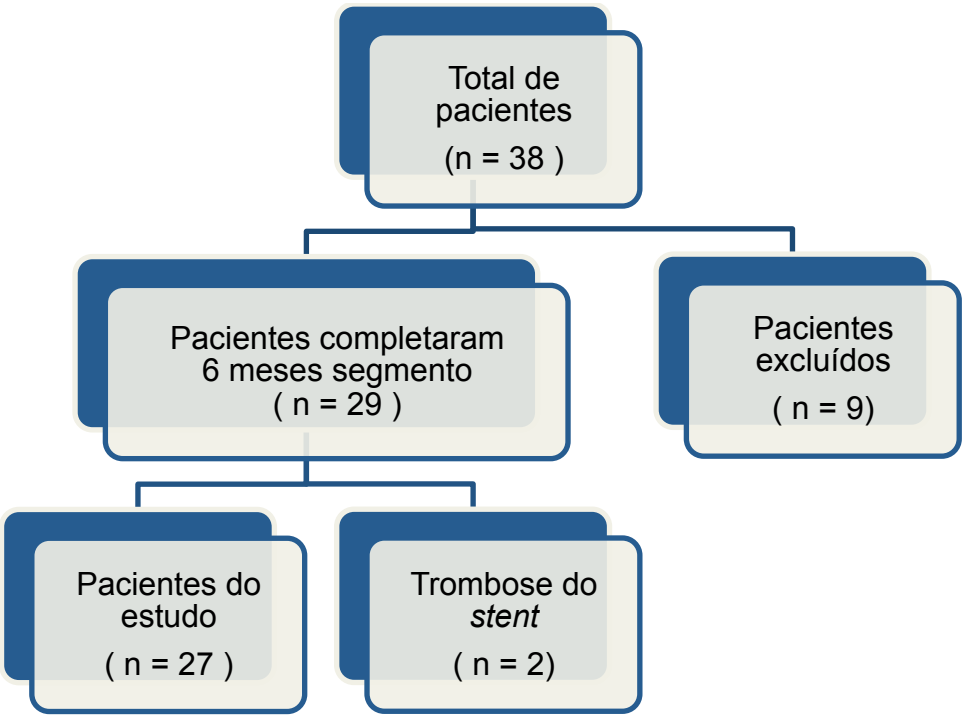


Figura 4 – Organograma ilustrando a distribuição dos pacientes por grupo experimental

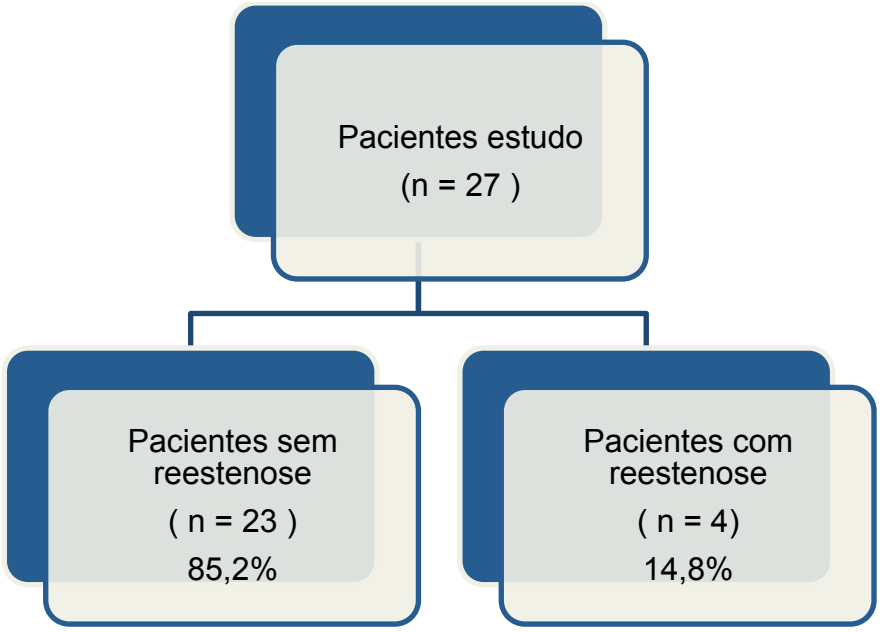
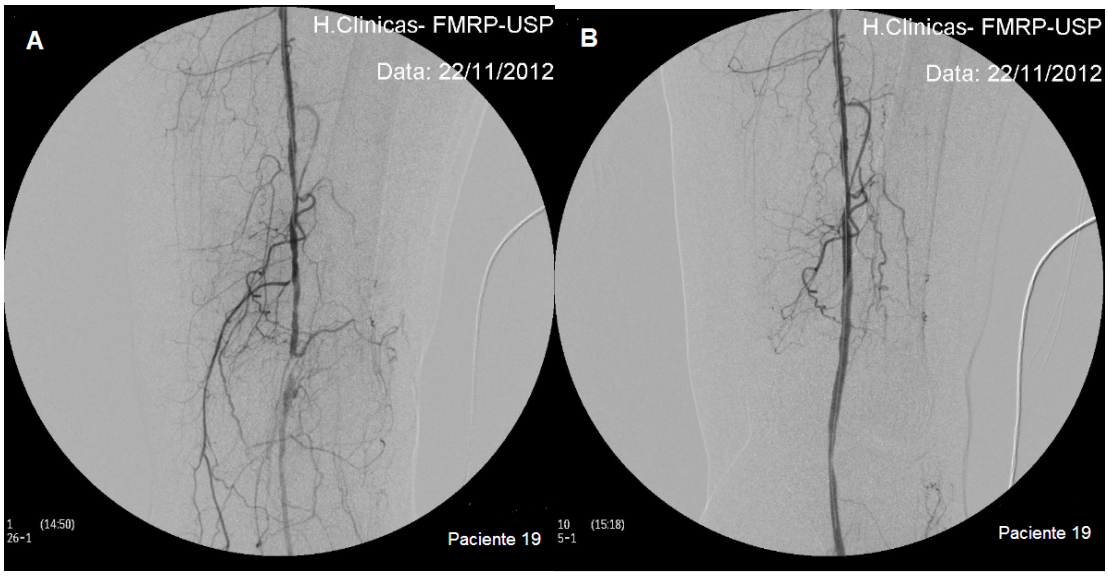


Figura 5 – Organograma ilustrando a distribuição dos pacientes por grupo experimental

A Figura 6 mostra a arteriografia de um paciente com uma oclusão de artéria femoral distal (canal de Hunter) direita, tratado satisfatoriamente com ATP/*stent*, sem reestenose significativa em seis meses.



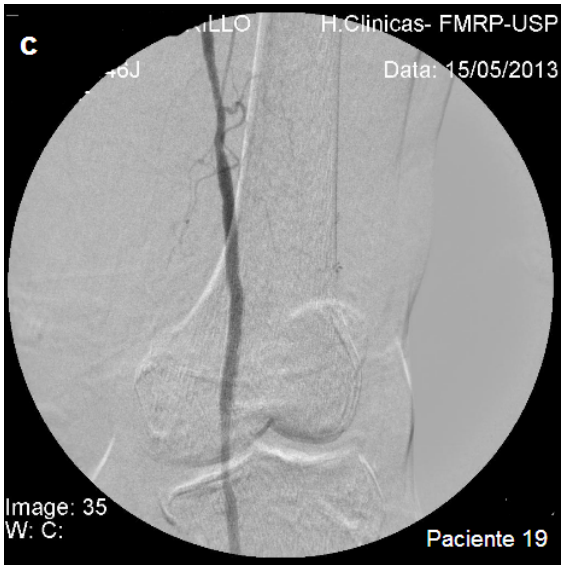
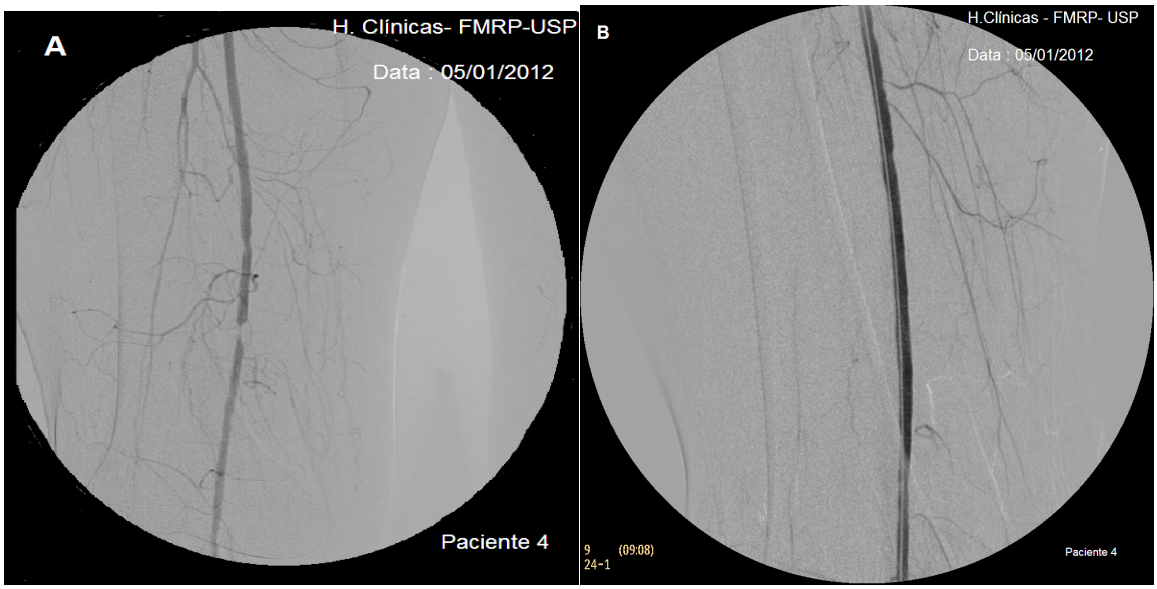


Figura 6 – Imagens arteriográficas de segmento fêmoro-poplíteo do membro inferior direito (paciente n^0 19). A, angiografia pré ATP/*stent* mostrando oclusão segmentar da artéria femoral distal. B, angiografia pós ATP/*stent* imediata mostrando sucesso terapêutico sem estenose residual. C, angiografia controle de seis meses sem evidências de reestenose intra-*stent* igual ou maior que 50%

A Figura 7 mostra a arteriografia de um paciente com uma lesão parecida com o caso anterior e resultado imediato adequado, entretanto observa-se, no controle angiográfico de seis meses, redução acentuada do lúmen na borda superior do *stent*, devido à hiperplasia intimal exacerbada.



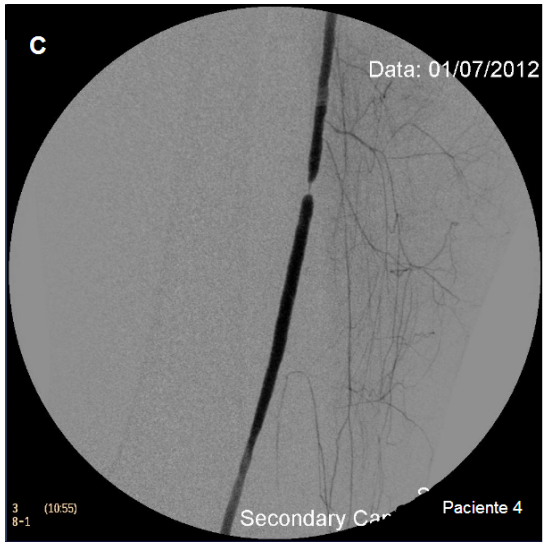


Figura 7 – Imagens arteriográficas de segmento fêmoro-poplíteo em membro inferior direito (paciente n^0 4). A, arteriografia pré-procedimento mostrando falha de enchimento em segmento de artéria femoral direita, terço médio de coxa, compatível com oclusão segmentar do vaso. B, angiografia pós ATP/*stent* imediata mostrando bom resultado sem sinais de complicações. C, angiografia controle de seis meses mostrando imagem de contrastação filiforme na borda superior do *stent* compatível com reestenose maior que 90%

Os pacientes do estudo foram separados em dois grupos, sem reestenose e com reestenose, e analisados quanto a suas características demográficas, fatores de risco cardiovascular e medicação em uso, apresentados na Tabela 3. A média de idade dos pacientes do grupo sem reestenose foi de 68,6 anos e do grupo com reestenose 52,7 anos ($p<0,05$), sendo a maioria do sexo masculino nos dois grupos (69,5% sem reestenose x 75% com reestenose). Os fatores de risco: hipertensão (73,9% x 75%), diabetes melitus (34,7% x 75%), dislipidemia (17,4% x 50%) e tabagismo (73,9% x 50%), tanto no grupo sem reestenose quanto no grupo com reestenose, foram semelhantes ($p>0,05$).

Na Tabela 3 também foi analisado o tipo de isquemia de membros inferiores, com respeito à presença de isquemia crítica (dor em repouso e lesão trófica) ou não, sendo essa incidência similar nos dois grupos (60,8% sem reestenose x 50% com restenose, $p>0,05$). Os principais grupos de anti-hipertensivos utilizados foram descritos: inibidor da ECA, bloqueador do receptor de angiotensina, beta-bloqueador e diurético, sem diferença estatística entre os grupos; além do uso de estatina (34,7% sem restenose x 0% com reestenose, $p>0,05$).

Dessa forma, a não ser pela idade menor no grupo com reestenose, não foram encontradas diferenças demográficas ou clínicas significativas entre aqueles que não apresentaram reestenose e os que apresentaram reestenose.

Tabela 3 – Características demográficas e clínicas dos subgrupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

	Total n = 27	**Sem Reestenose n = 23 (85,2)**	**Reestenose n = 4 (14,8)**	**Valor p**
Idade (anos)	66,2 ± 10,6	68,6 ± 8,6	52,7 ± 13,9	0,005
Sexo (masculino)	19 (70,3)	16 (69,5)	3 (75)	0,999
Hipertensão	20 (74)	17 (73,9)	3 (75)	0,999
Diabetes	11 (40,7)	8 (34,7)	3 (75)	0,272
Dislipidemia	6 (22,2)	4 (17,4)	2 (50)	0,204
Tabagismo	19 (70,3)	17 (73,9)	2 (50)	0,558
Isquemia crítica *	16 (59,2)	14 (60,8)	2 (50)	0,999
Inibidor da ECA	13 (48,1)	11 (47,8)	2 (50)	0,999
BRA	3 (11,1)	3 (13)	0 (0)	0,999
Beta-bloqueador	5 (18,5)	4 (17,4)	1 (25)	0,999
Diurético	9 (33,3)	8 (34,7)	1 (25)	0,999
Estatina	8 (29,6)	8 (34,7)	0 (0)	0,285

Os valores foram expressos pela média ± desvio padrão ou em porcentagem (%)
* isquemia crítica = dor em repouso e/ou lesão trófica.
BRA = bloqueadores dos receptores de angiotensina
p significativo < 0,05

5.1.2 Evolução clínica

Os pacientes que evoluíram com reestenose apresentaram manutenção das queixas de claudicação e/ou dor em repouso e/ou não cicatrização das lesões tróficas, além da queda no ITB. Foi realizado nova angioplastia com balão em dois pacientes. Em dois outros, fez-se necessário o implante de novo *stent* devido à imagem de dissecção . Os dois pacientes que se apresentaram com trombose do *stent* pós seis meses do procedimento estavam assintomáticos e foi optado por manter tratamento clínico (uma mulher de 74 anos, TASC C; um homem de 44 anos, TASC A). Todos os pacientes mantiveram o acompanhamento ambulatorial após o término do estudo.

A Tabela 4 detalha todos os pacientes incluídos no estudo, variáveis demográficas, classificação clínica de Rutherford, classificação radiológica segundo TASC II, desfecho (reestenose ≥ 50%) e os ITB pré-procedimento, 24 horas e seis meses pós procedimento. Os pacientes estão numerados de acordo com suas designações durante o estudo, sendo que

não apresentam sequência numérica completa.

Tabela 4 – Pacientes do estudo (n = 27) com descrição de suas variáveis demográficas de sexo e idade, classificação da isquemia de membros inferiores, classificação do TASC, desfecho clínico/radiológico e ITB (reestenose significativa ≥50%)

Nº do Paciente no estudo	Idade	Sexo	Classificação de Rutherford (Categoria)	TASCII	Desfecho	ITB Pré	ITB Pós 24h	ITB Pós 6m
1	66	M	5	A	-----	0,6	0,85	0,85
3	62	M	5	A	REESTENOSE	>2*	>2	>2
4	32	M	5	A	REESTENOSE	0,46	0,83	0,48
7	59	M	3	C	------	0,66	0,9	0,92
8	63	M	5	D	------	0,45	0,87	1,0
9	70	M	3	B	------	0,64	0,91	0,9
11	70	M	4	C	-------	0,4	1,1	1,0
12	61	F	3	C	-------	0,6	1,0	1,0
13	65	M	5	B	------	0,5	0,75	0,74
16	74	M	3	D	-----	0,64	1,1	1,0
17	77	M	3	B	------	0,47	1,12	1,0
18	78	M	4	C	------	0,38	1,0	1,0
19	82	F	3	B	------	0,6	0,95	0,85
20	81	M	5	D	-------	0,65	1,0	0,85
21	60	M	3	A	REESTENOSE	0,57	1,0	0,62
22	57	F	3	C	REESTENOSE	0,48	0,8	0,5
23	80	F	4	C	------	0,65	0,94	1,0
25	67	M	5	C	-------	0,6	0,83	0,8
27	84	F	5	A	-------	0,85*	0,86	>1,5
29	52	F	3	C	-------	0,64	1,09	0,9
30	64	M	3	C	-------	0,61	1,0	1,0
32	62	M	5	A	-------	0,7	0,96	0,9
34	64	M	5	B	-------	0,5	0,84	0,8
35	71	M	5	B	------	0,6	0,92	0,94
36	69	F	5	B	------	>1*	>1,5	>1,5
37	60	F	3	B	------	0,55	1,0	1,02
38	59	M	5	B	-------	0,32	0,9	0,92

* Falso índice – excluído para análise estatísitca

A Tabela 5 agrupa os pacientes em relação ao tipo de isquemia, de acordo com a classificação de Rutherford e a classificação TASC II, além da evolução do ITB, nos subgrupos sem e com reestenose.

Tabela 5 – Classificação e agrupamento de acordo com o tipo de isquemia com base na classificação de Rutherford, TASC II e evolução do ITB nos subgrupos de pacientes sem e com reestenose

	Total n = 27	Sem reestenose n = 23 (85,2)	Reestenose n = 4 (14,8)	Valor *p*
Categoria de Rutherford				
3	11 (41,4)	9 (39,1)	2 (50)	0,999
4	3 (10,3)	3 (13)	0(0)	0,999
5	13 (48,3)	11 (47,9)	2 (50)	0,999
Classificação TASCII				
A	6 (24,1)	3 (13)	3 (75)	0,024
B	9 (34,5)	9 (39,1)	0 (0)	0,267
C	12 (41,4)	11 (47,9)	1 (25)	0,605
ITB - Pré	0,55 ± 0,09	0,56 ± 0,10	0,50 ± 0,04	0,226
Pós 24h	0,94 ± 0,09	0,95 ± 0,09	0,87 ± 0,08	0,228
Pós 6m	0,87 ± 0,15	0,92 ± 0,08	0,53 ± 0,06	0,0005

p significativo < 0,05

A análise estatística dos dois subgrupos com e sem resetenose mostra que houve redução significativa no ITB pós seis meses no grupo com reestenose.

A Figura 8 apresenta o perfil dos pacientes com relação ao tipo de isquemia, de acordo com a classificação de Rutherford.

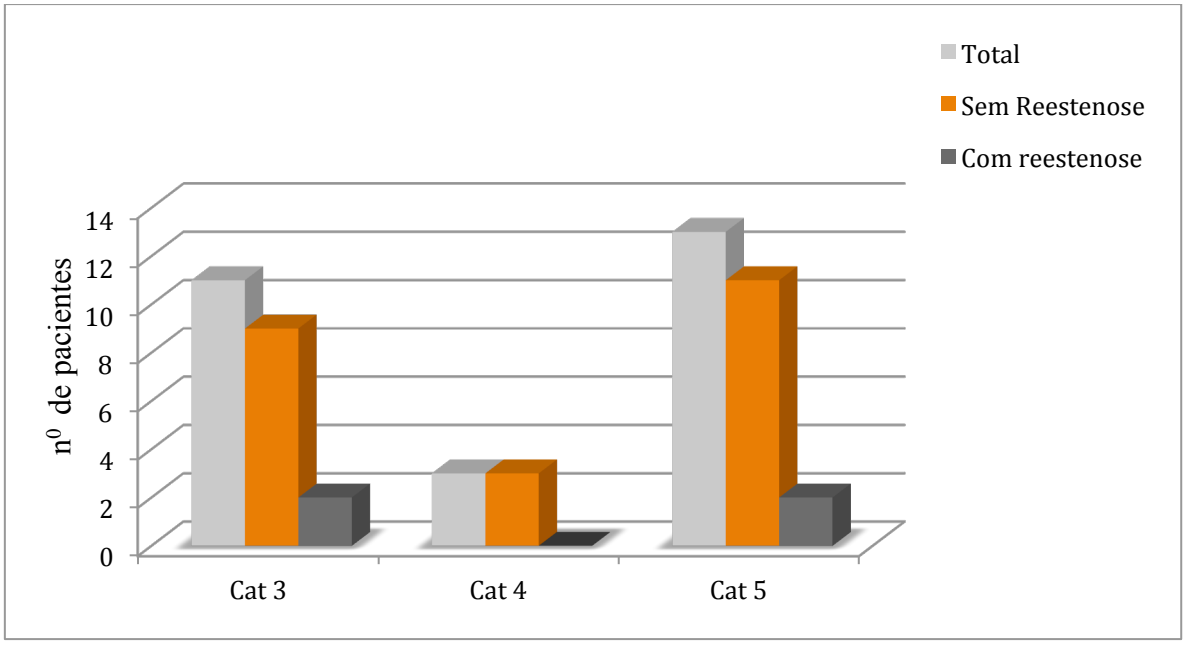


Figura 8 – Classificação dos pacientes de acordo com o tipo de isquemia, com base na classificação de Rutherford

p> 0,05

Não houve diferença estatística entre subgrupos sem e com reestenose de acordo com as categorias clínicas de Rutherford.

A Figura 9 apresenta os pacientes de acordo com a classificação do TASC II:

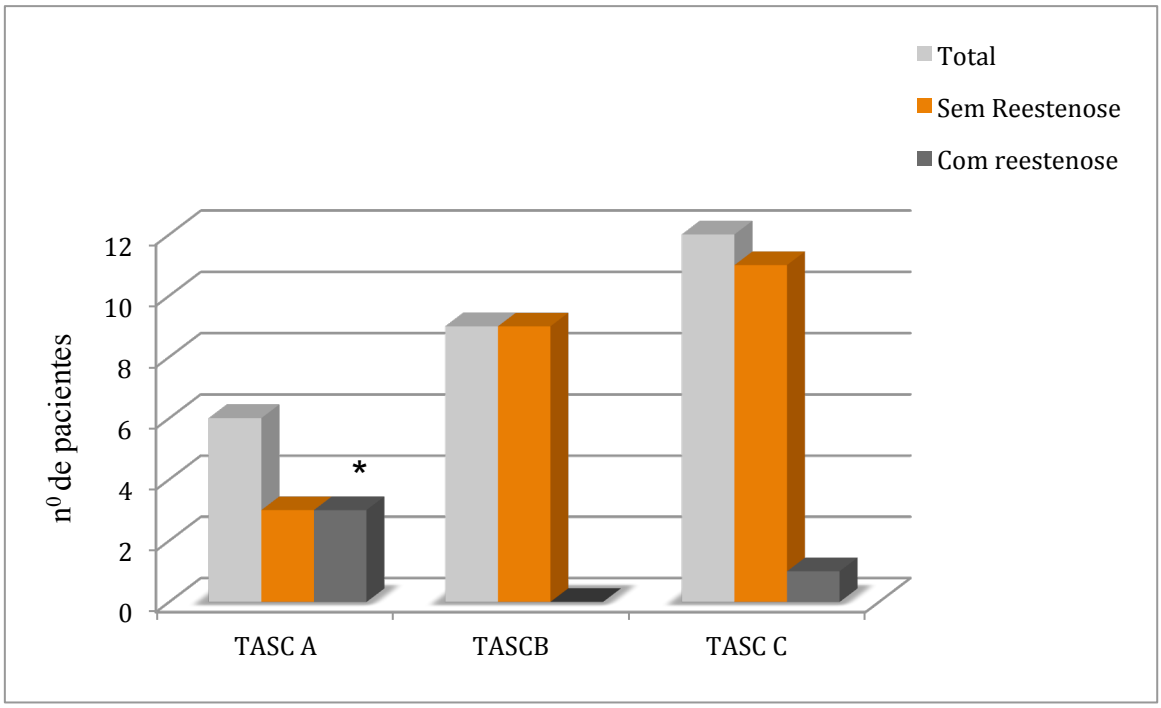


Figura 9 – Classificação dos pacientes do grupo estudo de acordo com a classificação do TASC II

*p<0,05

Os pacientes TASC II A evoluíram com maior número de estenoses comparativamente aos demais tipos.

A Tabela 6 mostra o tipo de lesão inicial, se estenose ou oclusão, o tipo de deságue em artérias de perna, se duas ou três artérias pérvias, além do comprimento do *stent* utilizado no grupo sem e com reestenose, com o intuito de correlacionar a gravidade da lesão com o desfecho desfavorável da reestenose. .

Tabela 6 – Relação entre o tipo de lesão inicial, número de artérias pérvias em perna e o comprimento do *stent* utilizado nos subgrupos de pacientes sem e com reestenose

	Total n = 27	**Sem reestenose n = 23 (85,2)**	**Reestenose n = 4 (14,8)**	**Valor *p***
Tipo de lesão inicial				
Estenose	3 (13,8)	3 (13)	0 (0)	0,999
Oclusão	24 (86,2)	20 (87)	4 (100)	0,999
Deságue em perna				
2 artérias	17 (62)	13 (56,5)	4 (100)	0,263
3 arterias	10 (38)	10 (43,5)	0 (0)	0,263
Comprimento *Stent*				
5 cm	5 (18,5)	4 (17,4)	1 (25)	0,999
10 cm	13 (48,1)	10 (43,5)	3 (75)	0,325
15 cm	9 (25,9)	9 (39,1)	0	0,267

p significativo < 0,05

O comportamento foi semelhante entre os grupos sem e com estenose independentemente do tipo de lesão inicial, número de artérias de deságue e o comprimento do *stent*.

5.2 Dosagens dos marcadores inflamatórios

5.2.1 Sistema calicreínas-cininas

5.2.1.1 Cininogênio de alto peso molecular (CAPM)

A Tabela 7 e a Figura 10 apresentam a média ± desvio padrão da atividade do CAPM em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido.

Tabela 7 – Média ± desvio padrão da atividade do CAPM em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 horas	6 meses
Sem reestenose	1,43 ± 0,24	1,22 ± 0,20***	0,90 ± 0,20*/**
Reestenose	1,34 ± 0,33	1,02 ± 0,12 #	0,75 ± 0,12 */**

*** p<0,05 antes versus seis meses.**
**** p<0,05 24 horas versus seis meses.**
***** p<0,05 antes versus 24 horas.**
 # p< 0,05 com reestenose versus sem reestenose.

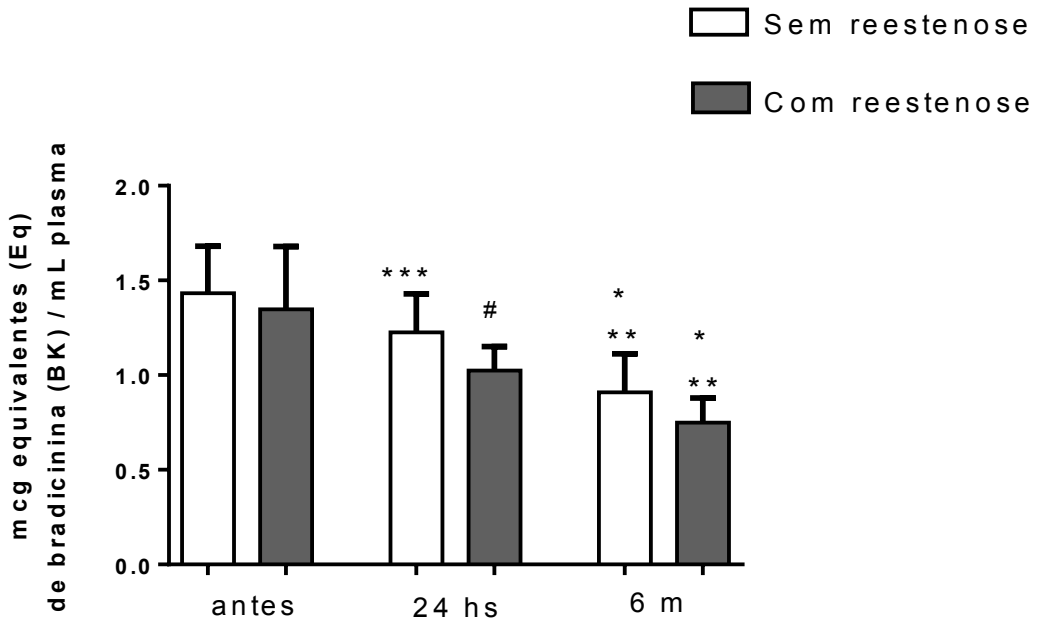


Figura 10 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade do CAPM medida em em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

*p<0,001 antes versus seis meses; **p<0,001 24 horas versus seis meses; *** p<0,001 antes versus 24 horas, # p< 0,05 com reestenose versus sem reestenose.

Na análise intragrupo, constata-se que a atividade do CAPM, em ambos os grupos,

com e sem reestenose, diminuiu significativamente no decorrer do tempo. Entre os grupos com e sem reestenose, ocorreu redução da atividade do CAPM nos pacientes com reestenose no tempo de 24 horas. Em geral, o grupo com reestenose apresentou níveis reduzidos de CAPM em todos os tempos.

5.2.1.2 Cininogênio de baixo peso molecular (CBPM)

A Tabela 8 e a Figura 11 mostram a média ± desvio padrão da atividade do CBPM em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Tabela 8 – Média ± desvio padrão da atividade do CBPM em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 horas	6 meses
Sem reestenose	2,24 ± 0,27	1,99 ± 0,15***	1,24 ± 0,17*/**
Reestenose	1,84 ± 0,31#	1,62 ± 0,27***/#	1,00 ± 0,14*/**/#

*** p<0,05 antes versus seis meses.**
**** p<0,05 24 horas versus seis meses.**
***** p<0,05 antes versus 24 horas.**
 # p< 0,05 com reestenose versus sem reestenose.

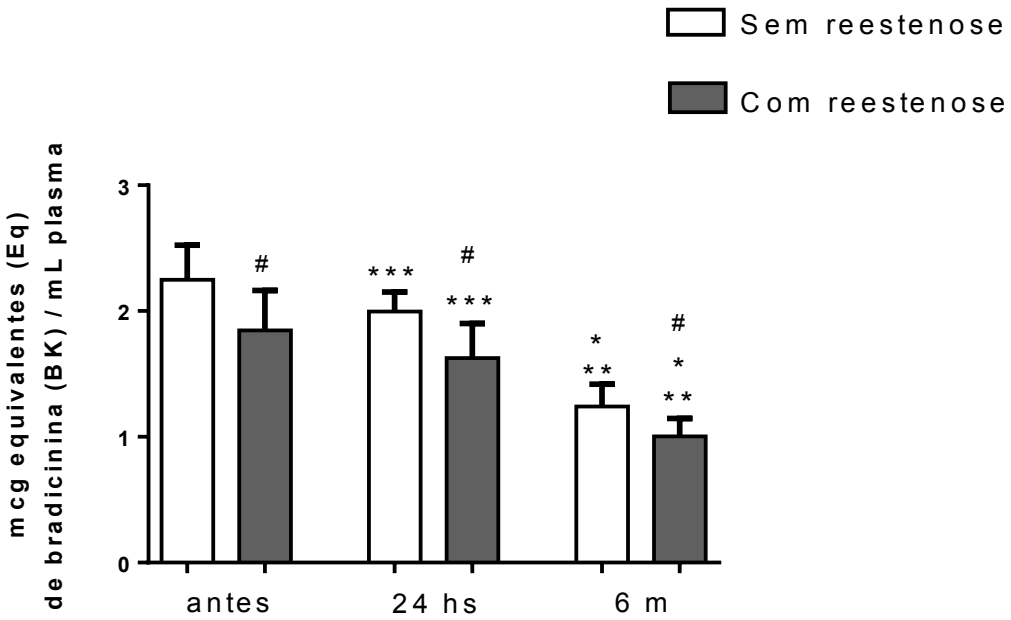


Figura 11 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade do CBPM medida em em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

*p<0,001 antes versus seis meses;**p<0,001 24 horas versus seis meses; *** p<0,001 antes versus 24 horas; # p< 0,05 com reestenose versus sem reestenose.

Na análise da atividade do CBPM observa-se similaridade com o comportamento do CAPM. Intragrupo, constatou-se que a atividade do CBPM nos grupos com e sem reestenose, diminuiu no decorrer do tempo. Os pacientes que evoluíram com reestenose apresentaram redução significativa dos níveis de CBPM quando comparados com os pacientes sem reestenose nos tempos antes, em 24 horas e seis meses da ATP/*stent* revestido.

5.2.1.3 Calicreína plasmática

A Tabela 9 e a Figura 12 mostram a média ± desvio padrão da atividade da Calicreína Plasmática em U/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido.

Tabela 9 – Média ± desvio padrão da atividade da Calicreína Plasmática em U/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 horas	6 meses
Sem reestenose	2,50 ± 0,28	1,97 ± 0,20***	1,75 ± 0,14*/**
Reestenose	2,36 ± 0,39	1,82 ± 0,25***	1,70 ± 0,14*

*** p<0,05 antes versus seis meses.**
**** p<0,001 24 horas versus seis meses.**
***** p<0,05 antes versus 24 horas.**

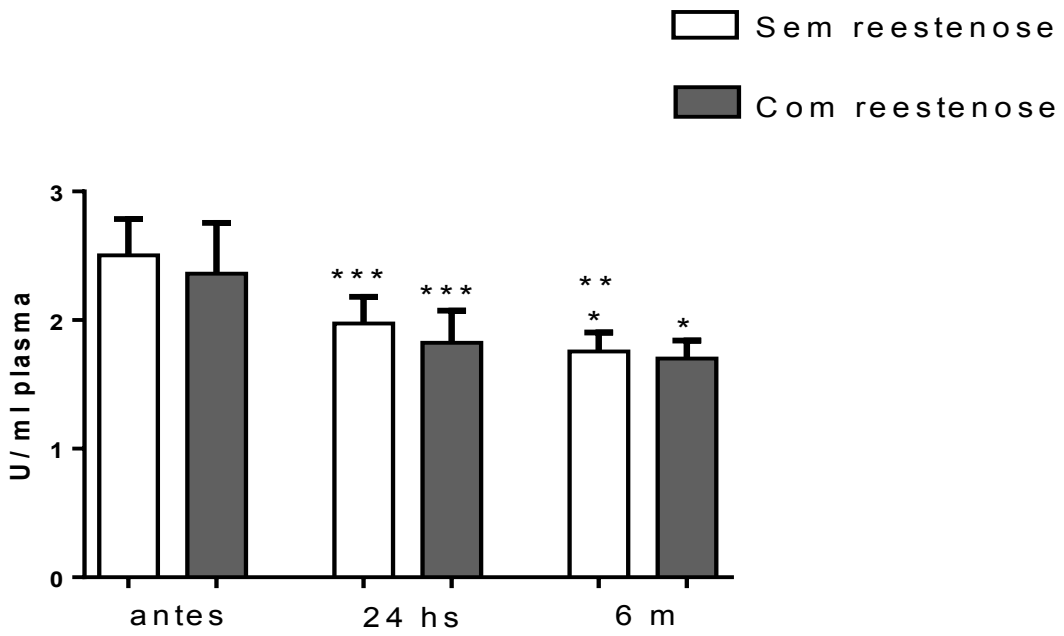


Figura 12 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade da calicreína plasmática medida em U/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

*p<0,05 antes versus seis meses, **p<0,001 24 horas versus seis meses, *** p<0,05 antes versus 24 horas,

Observa-se redução significativa na atividade da calicreína plasmática na análise intragrupos, tanto no grupo com reestenose quanto no grupo sem reestenose, no decorrer do tempo. Não houve diferença estatística entre os grupos com e sem reestenose.

5.2.1.4 Calicreína tecidual

A Tabela 10 e a Figura 13 apresentam a média ± desvio padrão da atividade da calicreína tecidual em µM pNa/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido.

Tabela 10 – Média ± desvio padrão da atividade da calicreína tecidual em µM pNa/mL plasma, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 h	6 meses
Sem reestenose	1,80 ± 0,31	1,53 ± 0,19***	1,43 ± 0,16*/**
Reestenose	2,01 ± 0,24	1,77 ± 0,20***	1,52 ± 0,17*/**

*** p<0,01 antes versus seis meses.**
**** p<0,01 24 horas versus seis meses.**
***** p<0,05 antes versus 24 horas.**

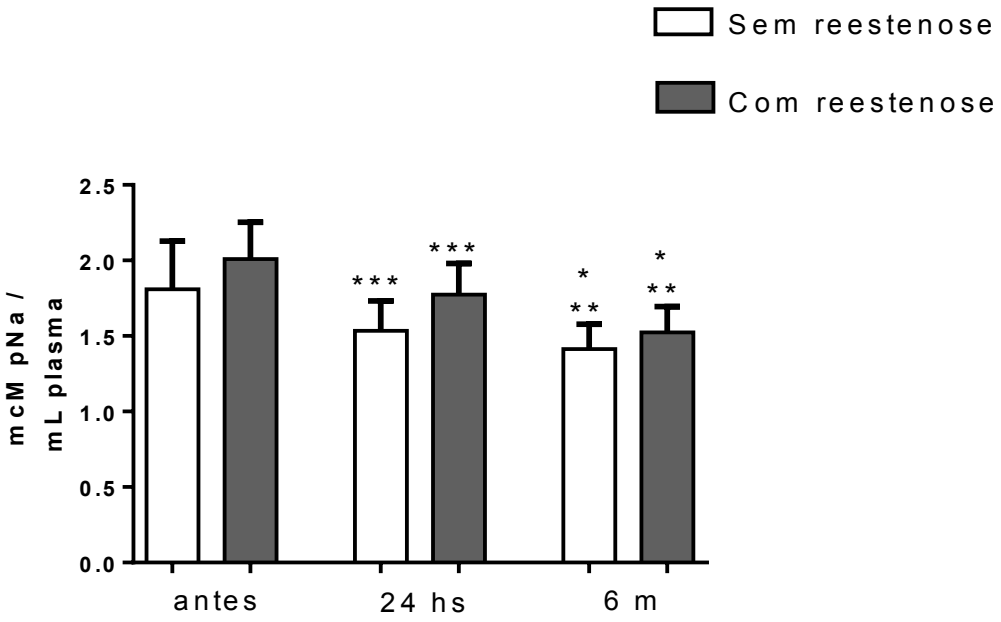


Figura 13 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade da calicreína tecidual medida em µM pNa/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

*p<0,01 sem reestenose antes versus seis meses, **p<0,01 sem reestenose 24 horas versus seis meses, *** p<0,05 sem reestenose antes versus 24 horas

A análise da calicreína tecidual também mostra concordância com os níveis decrescentes do seu substrato, o CBPM. Intragrupos, observa-se tanto no grupo com reestenose quanto no grupo sem reestenose que houve redução significativa na atividade da calicreína tecidual no decorrer do tempo. Não houve diferença estatística entre os grupos com e sem reestenose

5.2.1.5 Cininase II

A Tabela 11 e a Figura 14 mostram a média ± desvio padrão da atividade da cininase II em nmoles His-Leu/ml/min, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Tabela 11 – Média ± desvio padrão da atividade da cininase II em nmoles His-Leu/ml/min, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 h	6 meses
Sem reestenose	1,15 ± 0,21	1,50 ± 0,29***	1,65 ± 0,31 * / **
Reestenose	1,25 ± 0,23	1,67 ± 0,32***	1,77 ± 0,38 *

*** p<0,05 sem reestenose antes versus seis meses.**
**** p<0,001 sem reestenose 24 horas versus seis meses.**
***** p<0,01 sem reestenose antes versus 24 horas.**

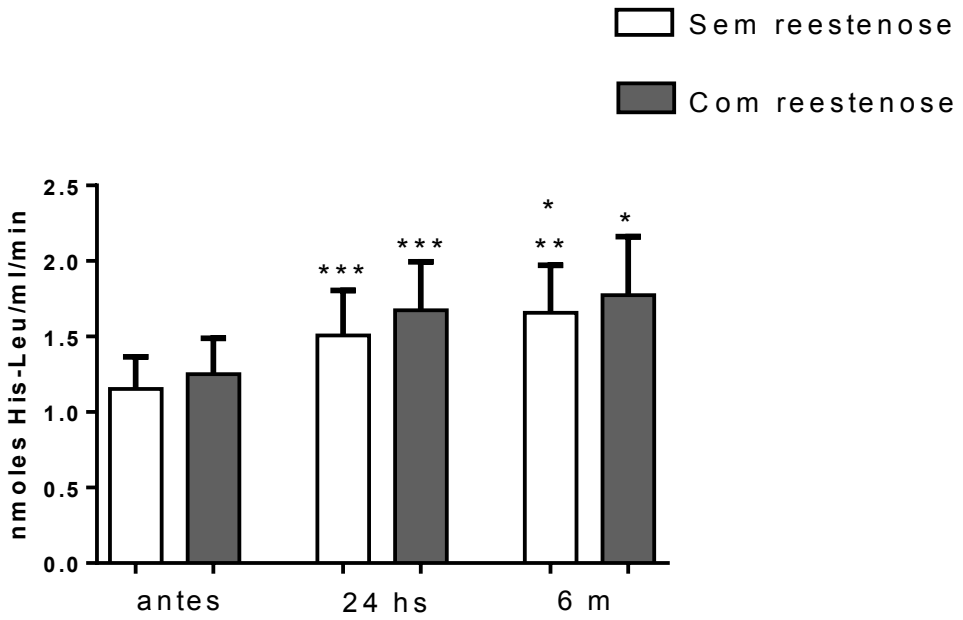


Figura 14 – Gráfico (média ± desvio padrão) da atividade da cininase II medida em em nmoles His- Leu/ml/min, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

*p<0,05 antes versus seis meses; ** p<0,001 24 horas versus seis meses; *** p<0,01 antes versus 24 horas.

Houve aumento significativo da atividade enzimática da cininase II na análise intragrupos, nos diversos tempos e em ambos os grupos. Nota-se elevação, apesar de não significativa, da cininase II antes do procedimento no grupo com reestenose em relação ao grupo sem reestenose.

5.2.2 Nitritos e nitratos - NO

A média e o desvio padrão das medidas de nitritos e nitratos antes do procedimento, em 24 horas e seis meses após a ATP/*stent* revestido estão expressos na Tabela 12 e na Figura 15.

Tabela 12 – Média ± desvio padrão da atividade do óxido nítrico representado pela concentração de nitritos/nitratos medida em micromolar (µM), nos grupos sem e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 h	6 meses
Sem reestenose	29,44 ± 22,90	28,3 ± 20,93	25,62 ± 12,37
Reestenose	23,10 ± 8,20	26,48 ± 7,98	28,22 ± 4,15

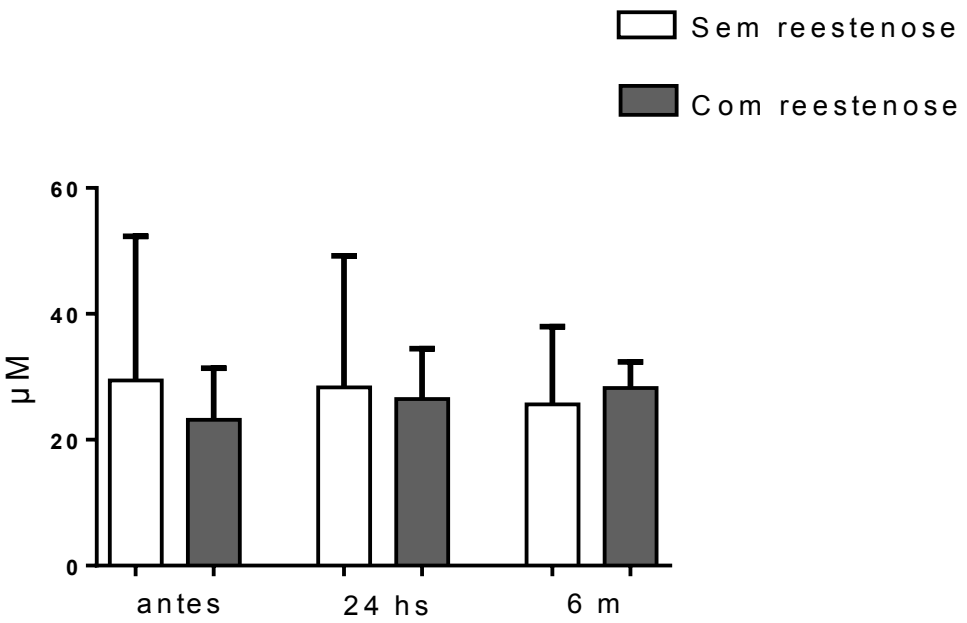


Figura 15 – Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de nitritos/nitratos medida em micromolar, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

Não houve diferença na atividade do NO com base na dosagem de nitritos e nitratos entre os subgrupos de pacientes sem e com reestenose. Em geral, observa-se diminuição da concentração basal de nitrito/nitrato no subgrupo com reestenose, porém sem diferença estatística.

5.2.3 Metaloproteinases

A Figura 16 representa um dos géis que foram analisados para a quantificação da MMP-2 por zimografia. Observa-se que as bandas, na faixa de peso molecular para a MMP-2, apresentam intensidades semelhantes quando se comparam os pacientes com reestenose, sem reestenose e controle.

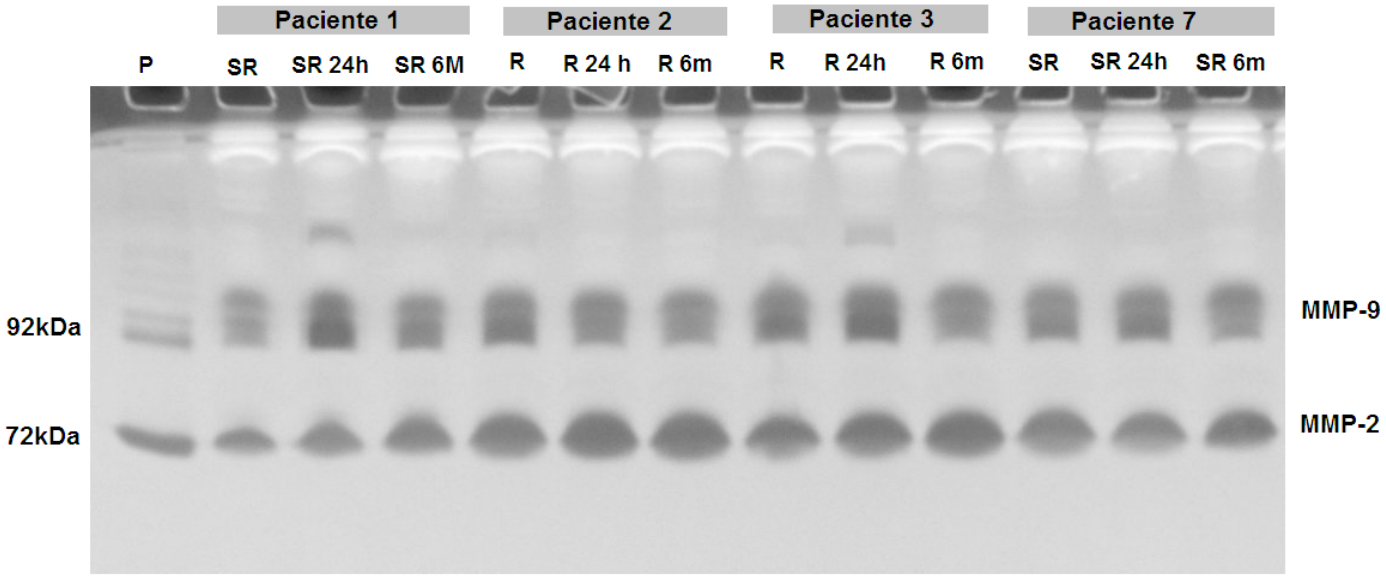


Figura 16 – Gel de zimografia mostrando, na posição horizontal, as identificações das faixas das bandas da MMP-2 (72kDa) e MMP-9 (92kDa). Na parte de cima da Figura 16, identificam-se pacientes e os tempos da coleta do plasma. Nota-se, da esquerda para a direita, o padrão (P), paciente sem reestenose (SR) antes, SR em 24 horas (SR 24h) e SR seis meses após (SR 6m); paciente com reestenose antes (R), R em 24 horas (R 24h) e R seis meses após (R 6m). Observa-se que a faixa da banda da MMP-9 não está homogênia, pois a preparação do gel foi realizada para a leitura da MMP-2

Na Tabela 13 e na Figura 17, notam-se a média e o desvio padrão da concentração de metaloproteinase-2 medidas por unidades arbitrárias nos grupos de pacientes sem e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido.

Tabela 13 – Média ± desvio padrão da concentração de metaloproteinase-2 por unidades arbitrárias, nos grupos sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 h	6 meses
Sem reestenose	2,18 ±1,27	2,27 ± 1,33	2,48 ± 1,60*
Reestenose	2,11 ± 1,98	2,09 ± 2,05	1,98 ± 1,92
*** p<0,005 antes versus 6 meses.**			

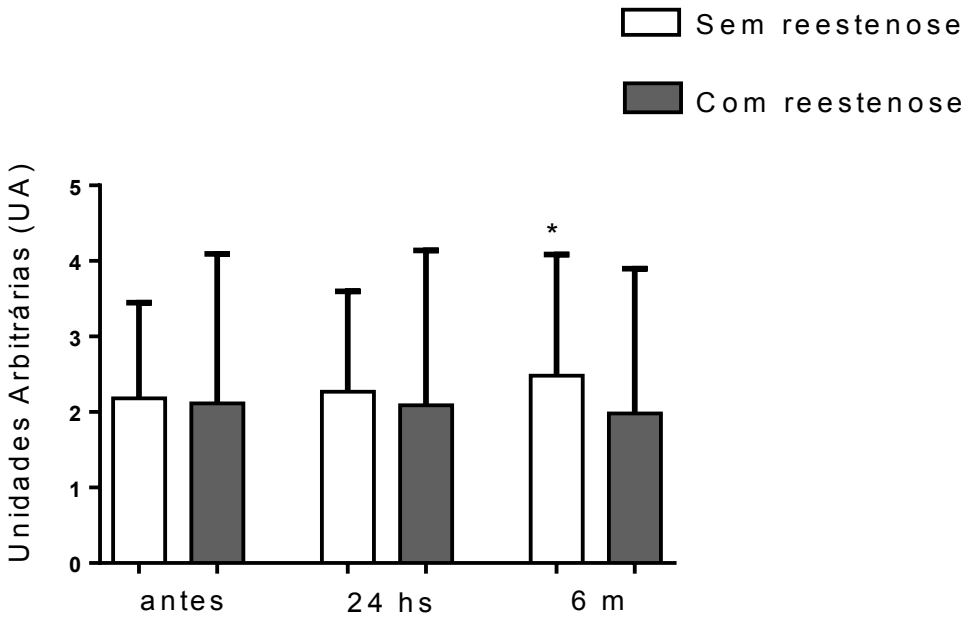


Figura 17 – Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de metaloproteinase-2 medida em Unidades Arbitrárias, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

* p<0,005 antes versus seis meses.

Houve um aumento significativo de MMP-2 no grupo sem reestenose após seis meses em comparação com antes do procedimento. Não se observa diferença entre os subgrupos com e sem reestenose, porém há uma tendência de queda no decorrer do tempo, no grupo com reestenose. O oposto ocorreu no grupo sem reestenose.

Na Tabela 14 e na Figura 18, observam-se a média e o desvio padrão da concentração de metaloproteinase-9 medidas por unidades arbitrárias nos grupos de pacientes sem e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânia com *stent* revestido.

Tabela 14 – Média ± desvio padrão da concentração de metaloproteinase-9 por unidades arbitrárias, nos grupos sem e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 horas	6 meses
Sem reestenose	0,79 ±0,46	0,87 ± 0,53	0,82 ± 0,46
Reestenose	1,03 ± 0,64	1,14 ± 0,79	0,93 ± 0,55

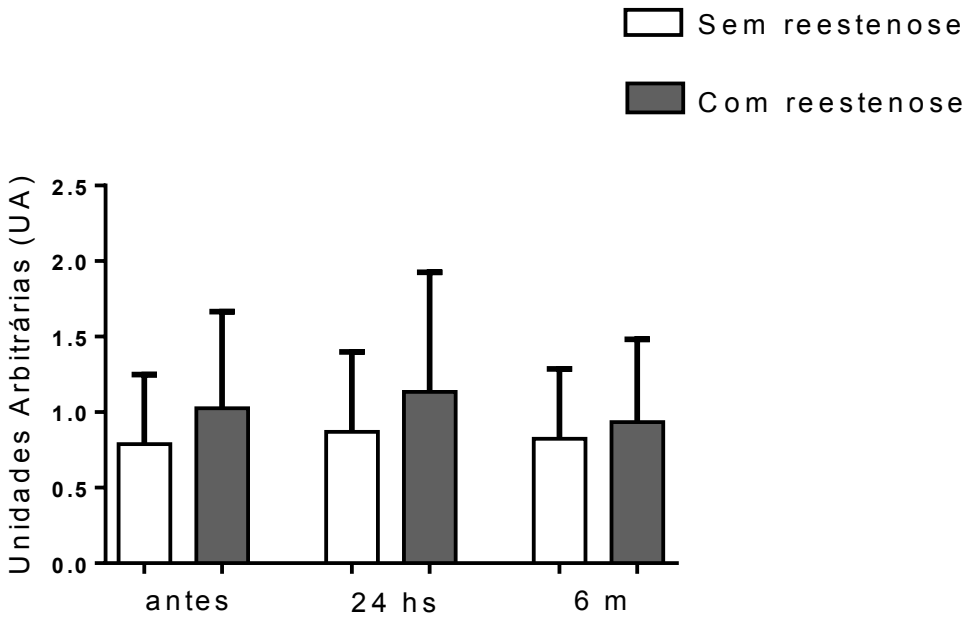


Figura 18 – Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de metaloproteinase-9 medida em Unidades Arbitrárias, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

Em relação à dosagem da MMP-9, não se observa diferença significativa entre os subgrupos com e sem reestenose, apesar de as concentrações MMP-9 se manterem mais elevadas no grupo com reestenose em todos os tempos.

5.2.4 Inibidores plasmáticos das metaloproteinases - TIMPS

A Tabela 15 e a Figura 19 mostram as concentrações (ng/ml) de TIMP-1 nos grupos sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido.

Tabela 15 – Média ± desvio padrão da concentração de TIMP-1 em ng/ml, nos grupos sem e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 horas	6 meses
Sem reestenose	3,53 ±1,21	3,55 ± 1,18	2,92 ± 1,15 */ **
Reestenose	4,10 ± 0,63	3,63 ± 0,43	3,22 ± 0,80

*** p<0,005 antes versus seis meses.**
**** p<0,005 24 horas versus seis meses.**

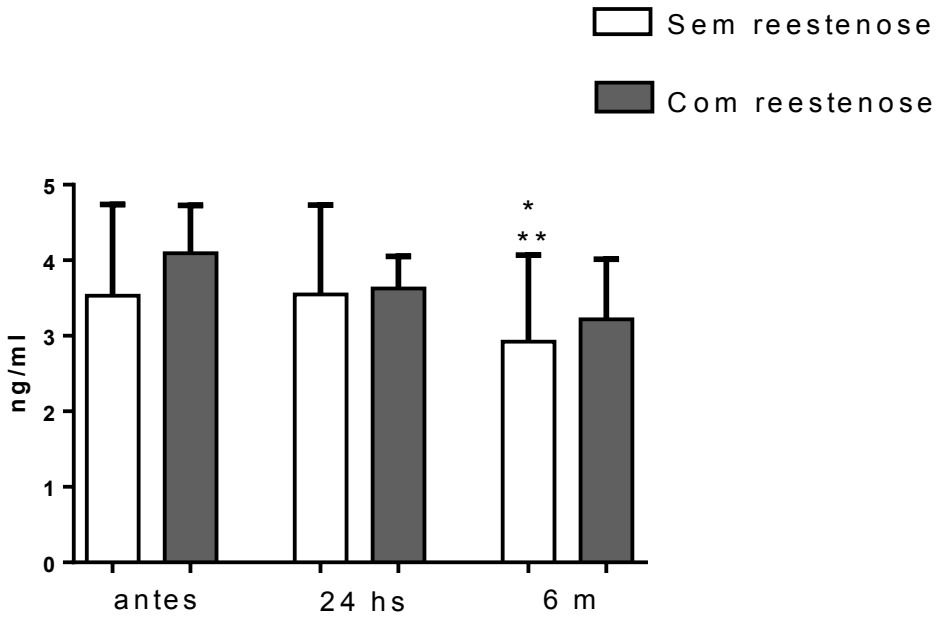


Figura 19 – Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de TIMP-1 medida em ng/ml, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

* p<0,005 antes versus seis meses, ** p<0,005 sem reestenose 24 horas versus seis meses.

A dosagem da TIMP-1 apresentou redução significativa no grupo sem reestenose em seis meses versus antes do procedimento e em seis meses versus 24 horas. Não houve

diferença entre os grupos, porém observam-se níveis de TIMP-1 mais elevados no grupo com reestenose acompanhando a dosagem mais elevada de MMP-9 nesse mesmo grupo.

A Tabela 16 e a Figura 20 apresentam a concentração de TIMP-2 antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido em grupos de pacientes sem e com reestenose.

Tabela 16 – Média ± desvio padrão da concentração de TIMP-2 em ng/ml, nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *stent* revestido

Grupos	Antes	24 horas	6 meses
Sem reestenose	4,15 ±1,67	4,49 ± 2,39	4,56 ± 1,48
Reestenose	2,90 ± 0,56	4,64 ± 3,11	3,08 ± 0,31#
# p<0,05 com reestenose versus sem reestenose.			

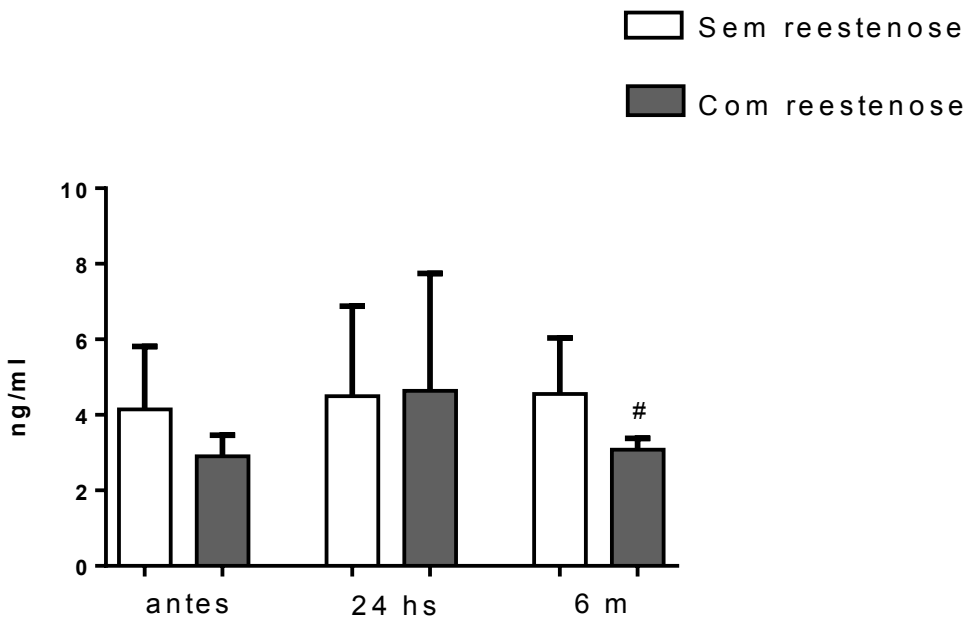


Figura 20 – Gráfico (média ± desvio padrão) da concentração de TIMP-2 medida em ng/ml, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *stent* revestido nos grupos de pacientes sem reestenose e com reestenose

# p<0,05 com reestenose versus sem reestenose.

Houve redução significativa na dosagem da TIMP-2 no grupo com reestenose em relação ao grupo sem reestenose no tempo de seis meses. Não houve diferenças nos demais tempos e na análise intragrupos nos diversos tempos. Mais uma vez, os níveis de TIMP-2 foram correspondentes à dosagem da MMP-2.

6 – DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As opções diagnósticas e terapêuticas para DAOP de artérias dos membros inferiores mudaram substancialmente durante as últimas décadas. Métodos de tratamento intervencionistas, tais como a ATP com colocação de *stents*, têm, em muitos casos, substituído a cirurgia vascular tradicional. No entanto, a ATP provoca uma lesão na parede do vaso, seguida por um processo de cicatrização exagerada denominada hiperplasia intimal, resultando em reestenose. Até agora, a reestenose tem permanecido como a maior limitação para a utilidade clínica da ATP no segmento FP.

Esta pesquisa clínica estuda o processo inflamatório subjacente à ATP com colocação de *stent* recoberto no território vascular FP mediante a avaliação dos sistemas das cininas, do NO e MMPs. Esses sistemas apresentam diversos e complexos papéis em inúmeras condições fisiopatológicas de diversas doenças, porém poucos estudos os relacionam à reestenose intra-*stent* no território arterial periférico. A compreensão do processo fisiopatológico da reestenose através do estudo dos diferentes sistemas que influenciam a atividade inflamatória pode contribuir significativamente para a busca de alternativas terapêuticas.

Comparando-se as características clínicas entre os subgrupos do estudo, observa-se que a idade média do grupo com reestenose é significativamente menor que a do subgrupo sem reestenose. Esse fato se justifica pela presença de um paciente jovem (32 anos) no grupo com reestenose, que apresentava diabetes melito tipo 1 e doença aterosclerótica precoce e agressiva, manifestando-se além da DAOP, com retinopatia diabética e neuropatia periférica graves. Porém, esse paciente não apresentava provas de atividades inflamatórias diferentes dos demais pacientes, o que justificou sua permanência no grupo estudado.

Em relação às demais características clínicas e demográficas, não foram constatadas diferenças significativas. Houve predominância do sexo masculino nos dois subgrupos, como já seria esperado, uma vez que a DAOP tem prevalência maior nesse gênero. Diabetes melito e dislipidemia foram mais prevalentes no subgrupo com reestenose, porém sem diferença significativa, Não foram constatadas diferenças entre os demais fatores de risco cardiovascular ou em relação ao uso das medicações. Os efeitos da angiotensina II no estímulo hipertrófico e proliferativo sobre as células musculares lisas e, por conseguinte, na contribuição à hiperplasia intimal está bem estabelecido (OSGOOD et

al., 2012), o que justifica a preocupação em relação ao uso dos inibidores da cininase II e inibidores dos receptores de angiotensina II.

Os grupos foram homogêneos em relação às características das lesões tratadas: tamanho do *stent* utilizado, presença de oclusão ou estenose e quanto ao número de artérias pérvias em perna (deságue). Não houve diferenças entre os grupos em relação à classificação clínica de Rutherford (presença ou não de isquemia crítica). Houve mais pacientes, proporcionalmente, com reestenose na classificação A do TASC II e observa-se redução significativa no ITB em 6 meses no grupo com reestenose. Em geral, nota-se a presença de isquemia crítica do membro afetado em mais da metade dos pacientes, como seria o esperado nos pacientes que necessitam de intervenção cirúrgica ou endovascular.

O papel das endopróteses no tratamento da doença oclusiva de artéria femoral superficial permanece em debate. Vários estudos têm mostrado resultado satisfatório após o emprego de *stents* revestidos no segmento FP, com índices conhecidos de reestenoses menores quando comparados com *stents* não recobertos de nitinol (JAHNKE et al., 2003; SAXON et al., 2003; SAXON et al., 2008). De fato, estudo realizado por Araújo et al. (2015) encontrou taxas de reestenose para esse mesmo segmento arterial, de 38,5%, com o uso de *stent* de nitinol, superior ao encontrado neste trabalho (14,8%).

Há estudos relatando taxa de reestenose que pode atingir até 60% no primeiro ano do procedimento, com *stents* não recobertos (SCHILLLINGER et al., 2001). Os *stent*s recobertos podem aumentar os custos iniciais dos procedimentos de angioplastias periféricas, porém a necessidade de um menor número de reintervenções, a fim de garantir perviedade primária assistida devido a menores taxas de reestenose, associada a taxas de complicações e dias de internação menores, e o seu caráter minimamente invasivo, faz do uso primário destes *stent*s uma opção a ser considerada para casos selecionados. Entretanto, mais estudos enfocando a relação custo/benefício são necessários, antes do uso destas endopróteses ser considerado como um tratamento de rotina.

O SCC constitui uma cascata complexa de várias enzimas que produzem peptídeos bioativos – as cininas e seus derivados, incluindo a bradicinina (BK). Em adição à noção clássica do SCC como um vasodilatador potente e um mediador de respostas inflamatórias, estudos recentes sugerem ligação entre o SCC e o estresse oxidativo. Anomalias no SCC têm sido implicadas na patogênese da hipertensão e em desordens cardiovasculares e renais (SHARMA et al., 1996; LINZ et al., 1995). No entanto, o papel funcional do SCC na fisiologia vascular não foi totalmente estabelecido. Para melhor compreender o papel desse sistema na biologia vascular, realizou-se a dosagem dos cininogênios de alto e baixo peso

molecular (substratos para a formação das cininas e suas enzimas de clivagem, as calicreínas plasmática e tecidual), além da dosagem da cininase II, em artérias femurais, correlacionando-as com a reestenose precoce (seis meses pós procedimento).

Observou-se redução nas concentrações, tanto do CAPM quanto do CBPM, ao longo do tempo nos dois subgrupos. Em uma análise mais detalhada, percebeu-se que, no grupo com reestenose, houve redução do CAPM após 24 horas do procedimento e menores níveis de CBPM em todos os tempos. A dosagem das calicreínas plasmática e tecidual acompanhou a queda observada na quantificação dos cininogênios, porém sem diferenças entre os grupos.

As cininas são geradas por clivagem proteolítica dos cininogênios pelas calicreínas. Portanto, pode-se inferir que a produção de cininas no grupo com reestenose está diminuída desde o tempo pré-procedimento. Vários estudos demonstraram o efeito da bradicinina em inibir o crescimento celular, visto que esta antagoniza os efeitos vasoconstritores de vários promotores de crescimento (EL-DAHR et al., 1996; KIEHNE; ROZENGURT, 1994; WIERNAS et al., 1998) e evidências acumuladas destacam a importância do SCC como sistema de proteção contra o estresse oxidativo e lesão de órgãos como coração e rim (KAYASHIMA; SMITHIES; KAKOKI, 2012).

Estudos que examinaram o efeito da BK no crescimento celular demonstraram resultados contraditórios. Por exemplo, a BK inibe o crescimento de CMLs e de fibroblastos gengivais induzidos pelo PDGF (DIXON; DENNIS, 1997; MCALLISTER et al., 1995). Da mesma forma, a BK bloqueia a hipertrofia dos miócitos ventriculares, mediada por Ang II, mas apenas na presença de células endoteliais (RITCHIE et al., 1998). Em contraste, quando as células endoteliais estavam ausentes, a BK apresentou efeito direto sobre hipertrofia dos miócitos ventriculares. Vários estudos mostraram que a BK inibe a proliferação de CMLs aórticas de rato (MALINSKI et al., 1993; TSUCHIDA et al., 1999; YAU; PINSK; ZAHRADKA, 1996). Esse ponto foi enfatizado por Agata et al. (2000), que mostraram que o aumento na produção de calicreína em artérias carótidas de ratos, por transferência genética mediada por adenovirus, presumivelmente resulta na síntese elevada de BK, que reduz a hiperplasia miointimal após angioplastia com balão. Por outro lado, Yau et al. (2001) evidenciaram que a BK aumenta o crescimento de CMLs na ausência de um endotélio íntegro e que antagonistas do receptor de bradicinina atenuam a proliferação neointimal pós angioplastia. Resultados negativos semelhantes foram relatados por Ribeiro et al. (2014), que demonstraram aumento na concentração de CAPM, CBPM, calicreína plasmática e tecidual em pacientes que evoluíram com reestenose pós

angioplastia com *stent* de nitinol no segmento FP. Esses resultados contraditórios demonstram mais uma vez a importância de melhor estudar os efeitos das cininas no processo de reestenose para determinar se terapias direcionadas para esse sistema serão efetivas.

Houve aumento significativo da atividade da cininase II (enzima responsável pela clivagem e inativação da BK) nos grupos com e sem reestenose no decorrer dos seis meses pós procedimento e também foram constatados níveis constantemente mais elevados da cininase II no grupo com reestenose, porém sem diferença estatística. Maior concentração da cininase II levaria a maior conversão de Ang I em Ang II. A maior concentração de Ang II estimularia seus receptores nas células endoteliais e nas células musculares lisas, com um estímulo proliferativo e hipertrófico, contribuindo para a HI. A atividade tecidual local da cininase II tem sido correlacionada com o grau de HI (RAKUGI et al., 1994a). Os efeitos benéficos dos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) na insuficiência cardíaca e reestenose têm sido atribuídos à regulação tanto da síntese de angiotensina II (ANG II) quanto da degradação da BK pela ECA (FARHY et al., 1993). A inibição sistêmica da cininase II tem reduzido significativamente a HI após angioplastia com cateter-balão em carótidas de ratos de uma forma dose-dependente (RAKUGI et al., 1994a; POWELL et al., 1989). Entretanto, o fracasso da terapia com inibidor da ECA para reduzir as taxas de reestenose em humanos sugere que a BK tem papel mais proeminente nas artérias danificadas e doentes do que inicialmente previsto a partir de modelos animais.

Os papéis vasoprotetores do NO são bem conhecidos e incluem a regulação da pressão arterial e do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária e adesividade leucocitária e prevenção da proliferação de CMLs (NAPOLI et al., 2006). A biodisponibilidade do NO é considerada um dos fatores centrais nas doenças vasculares (BARBATO; TZENG, 2004), embora não esteja claro se isso é causa ou resultado da disfunção endotelial. As concentrações de nitrito e nitrato retratam a medida indireta da formação do NO pelo organismo e podem refletir o que está acontecendo no sítio vascular em questão, pela conversão do NO local em nitrato, com este difundindo-se pelo plasma

No presente estudo, a concentração inicial de nitritos/nitrato no grupo de pacientes que apresentou reestenose foi menor que no subgrupo sem reestenose, porém sem diferença estatística. Sabe-se que em situações de disfunção endotelial existe diminuição das concentrações de NO e consequente diminuição de seu efeito parácrino protetor contra a agregação plaquetária e processos inflamatórios (IGNARRO; NAPOLI, 2004), logo esses pacientes com níveis de NO diminuídos poderiam estar mais propensos a eventos adversos,

dentre estes a HI. Distúrbios na biodisponibilidade do NO podem levar à perda das ações vasculoprotetoras e em alguns casos, podem até aumentar a progressão da doença aterosclerótica (NAPOLI et al., 2006). Apesar de estudos bem sucedidos em modelos animais utilizando várias técnicas para aumento do NO no leito vascular (AHANCHI; TSIHLIS; KIBBE, 2007), não há testes em humanos que tenham demonstrado conclusivamente a eficácia clínica desse incremento sobre a inibição da HI. Consequentemente, elucidar os mecanismos pelos quais o NO influencia na reestenose terá um impacto direto na compreensão das vantagens e desvantagens de terapias baseadas em NO.

Sabe-se que as MMPs desempenham papel-chave na patogênese da reestenose, controlando a degradação da matriz extracelular e facilitando a remodelação da íntima após angioplastia (DOLLERY; MCEWAN; HENNEY, 1995; BENDECK; IRVIN; REIDY, 1996). A movimentação das CMLs pela MEC estaria relacionada à degradação de vários componentes, incluindo membrana basal e lâmina elástica, oferecendo um passo limitante ao desenvolvimento da HI. Consequentemente, o aumento da expressão de enzimas proteolíticas, especialmente as MMPs, tem sido aventado como tendo papel relevante nessa migração, tanto em modelos experimentais (JOHNSON; GALIS, 2004; FRANCO et al., 2006; CHANG et al., 2008) quanto em humanos (COLOTTI et al., 2007). As MMPs degradariam a MEC e facilitariam a migração celular, mecanismo importante no desenvolvimento de reestenose após angioplastia com ou sem colocação de *stents* (BENDECK, 2002; ISLAM et al., 2003).

Dentre as MMPs, as gelatinases A e B (MMP-2 e 9, respectivamente) têm sido as mais estudadas, por estarem comprovadamente implicadas na migração de CMLs para a íntima, favorecendo o desenvolvimento de HI em modelos in vivo (JOHNSON; GALIS, 2004; WHATILING et al., 2004; CHOW; CENA; SCHULZ, 2007).

Para melhor elucidar a relação entre MMPs e reestenose, o presente estudo realizou a análise da atividade proteolítica, através do método de zimografia, das MMP-2 e MMP-9, antes, pós 24 horas e pós seis meses do implante de *stent* revestido em pacientes com DAOP de membros inferiores. Não foram encontradas diferenças estatísticas nas concentrações dessas MMPs entre os pacientes que apresentaram ou não reestenose. Em relação à MMP- 9, observou-se até aumento em todos os tempos nos pacientes com reestenose, indicando uma ativação prévia maior em relação ao grupo sem reestenose, porém sem significância estatística. A MMP-2 apresentou aumento, no grupo sem reestenose, após seis meses, quando comparada com os níveis antes do procedimento. A

falta de correlação entre a atividade das MMPs 2 e 9 e a reestenose também foi observada por Ribeiro et al (2014) num estudo recente, com o uso de *stents* de nitinol em artérias periféricas.

Verificou-se que níveis plasmáticos MMP-2 e MMP-9 pré-procedimento foram relacionados com reestenose tardia, em angioplastia coronariana de pacientes com angina estável (ZEMLIANSKAIA et al., 2004). Cedro et al (2003) demonstraram que a metaloproteinase-9 é rápida e transitoriamente liberada para o sangue durante a angioplastia coronariana, e essa liberação coincide com a estimulação mecânica pela insuflação do balão. Além disso, níveis plasmáticos de MMP-9 foram relacionados como preditores de mortalidade cardiovascular em pacientes com doença arterial coronariana (BLANKENBERG et al., 2003). Além disso, é considerado um importante marcador de inflamação de progressão da doença coronariana em pacientes com angina crônica estável (ZOURIDAKIS et al., 2004).

Ge et al. (2006) também investigaram a relação entre a MMP-9 e a reestenose tardia pós angioplastia coronariana. Embora eles tenham relatado que o aumento nos níveis plasmáticos de MMP-9, após o procedimento, estão associados a um maior risco de reestenose, não encontraram correlação entre níveis pré-procedimento para esse desfecho negativo. Como se pode notar, todos esses estudos foram realizados na avaliação da reestenose intra-*stent* em território central. Os dados publicados em seres humanos são limitados e não há dados consistentes quanto à participação das MMPs na reestenose, no território periférico

TIMPs são uma família de inibidores específicos de MMPs e são essenciais para a regulação do metabolismo normal do tecido conjuntivo. TIMPs exercem vários efeitos biológicos em outros tecidos conjuntivos, incluindo a atividade de fatores de crescimento, inibição da apoptose e inibição da angiogênese (RAJAGOPALAN et al., 1996). Neste estudo, observou-se redução na dosagem de TIMP-1, ao londo do tempo, mais significativa no grupo sem reestenose. Houve redução da TIMP-2, em seis meses, no grupo com reestenose comparado com o grupo sem reestenose, acompanhando redução da MMP-2 neste grupo no mesmo período. Ribeiro et al. (2014) também encontraram níveis estáveis de MMPs e TIMPs ao analisar reestenose com uso de *stents* de nitinol no segmento FP.

Além das TIMPs, um grande número de inibidores não endógenos das MMPs (IMMPs) estão sendo estudados e testados experimentalmente (JACOBSEN; LEWIS; COHEN, 2007). Os anticorpos inibidores e os inibidores das MMPs quimicamente sintetizados mostraram certos efeitos positivos nos modelos animais de doenças vasculares

(BENJAMIN; KHALIL, 2012; NEWBY, 2012). No entanto, apenas a doxiciclina, um antibiótico da classe das tetraciclinas e inibidor não específico das MMPs, foi aprovada pela *Food and Drug Administration* para a aplicação clínica até agora (NUTI; TUCCINARDI; ROSSELLO, 2007; FINGLETON, 2008). Isso se deve parcialmente à ampla distribuição das MMPs e efeitos proteolíticos sobrepostos, além da inespecificidade dos inibidores das MMPs, que acarretam uma série de efeitos colaterais às terapêuticas avaliadas, como a síndrome musculoesquelética, caracterizada por rigidez das articulações, dor, inflamação e tendinite (COUSSENS; FINGLETON; MATRISIAN, 2002; RENKIEWICZ et al., 2003; FINGLETON, 2008). A terapia genética tem sido bem sucedida em modelos animais, e a super expressão da TIMP pode ter aplicações bem sucedidas no futuro (VAN DER LAAN et al., 2003). Entretanto, maior compreensão sobre a influência das MMPs e das TIMPs no comportamento das células vasculares e seus mecanismos subjacentes específicos continua a ser essencial para o desenvolvimento de novas terapias.

A principal limitação deste estudo foi o pequeno número de pacientes que certamente refletiu sobre altos desvios-padrão. A existência de outro grupo de pacientes submetidos à ATP com *stent* não revestido permitiria comparar a atividade inflamatória causada pelos dois tipos de *stents*. Prescindiu-se também, neste estudo, de um grupo controle de pacientes com DAOP submetidos apenas à arteriografia, pois Ribeiro et al.(2014), em trabalho realizado neste Laboratório , haviam demonstrado que os mesmos marcadores inflamatórios permaneceram inalterados no grupo controle.

O mecanismo preciso em relação à reestenose intra-*stent* não é totalmente compreendido. Estudos preliminares têm mostrado que a inflamação pode ser um contribuinte, porém novas investigações devem ser realizadas para que se possa compreender a associação entre o implante de *stents* e a resposta inflamatória em artérias periféricas, principalmente após o surgimento de novos dispositivos como os *stents* revestidos, que têm demonstrado taxas de perviedade primária melhores do que os *stents* convencionais de nitinol.

7 – CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que pacientes submetidos à ATP/*stent* revestido apresentaram taxa de reestenose de 14,8% em seis meses. Comparativamente este índice é mais baixo que aqueles publicados sobre *stents* não revestidos. O grupo de pacientes com reestenose apresentou idade menor que o grupo sem reestenose e menor ITB em 6 meses. Houve queda nos níveis de cininogênios e de TIMP-2 (seis meses após a angioplastia) neste grupo e as metaloproteinases e o óxido nítrico tiveram comportamento semelhante entre os grupos sem e com reestenose.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGATA, J. et al. Bradykinin B(1) receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. **Hypertension**, v. 36, 364-70, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10988266>. Acesso em 23 jun. 2015.

AHANCHI, S. S.; TSIHLIS, N. D.; KIBBE, M. R. The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia. **J Vasc Surg**, v. 45, p. A64-73, jun. 2007. Supplement A. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17544026>. Acesso em: 11 fev. 2015.

AHMADI, R et al. Carotid artery stenting: effect of learning curve and intermediate-term morphological outcome. **J Endovasc Ther**, v. 8, n. 6, p. 539-46, dez. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11797965>. Acesso em: 23 set. 2014.

ALEF, M. J.; TZENG E.; ZUCKERBRAUN B. S. Nitric oxide and nitrite-based therapeutic opportunities in intimal hyperplasia. **Nitric Oxide,** v. 26, n.4, p. 285–294, maio 2012. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22504069>. Ac.esso em: 5 jul. 2014.

ALTIERI, P. et al. Metalloproteinases 2 and 9 are increased in plasma of patients with heart failure. **Eur J Clin Invest**, v. 33, n. 8, p. 648-56, ago. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12864774>. Acesso em: 02 dez. 2014.

AMUNDSEN, E. et al. Methods for the determination of glandular kallikrein by means of a chromogenic tripeptide substrate. **Adv Exp Med Biol**. v. 120A, p. 83-95, 1979. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 495341>. Acesso em: 02 dez. 2014.

ARAÚJO, P. V. et al. Interleukins and inflammatory markers in in-stent restenosis after femoral percutaneous transluminal angioplasty. **Ann Vasc Surg**, v. 29, n. 4, p. 731-7, maio 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25725274>. Acesso em: 25 jul. 2015.

BARBATO, J. E.; TZENG, E. Nitric oxide and arterial disease. **J Vasc Surg,** v. 40, p. 187-93, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218485>. Acesso em: 11 jun. 2015.

BECKER, B. N. et al. Mechanical stretch/relaxation stimulates a cellular renin-angiotensin system in cultured rat mesangial cells. **Exp Nephrol**, v. 6, p. 57-66, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523174>. Acesso em: 12 fev. 2014.

BENDECK, M. P.; IRVIN, C.; REIDY, M. A. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. **Circ Res**, v. 78, p. 38-43, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603503>. Acesso em: 01 mar. 2015.

BENDECK, M. P. et al. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. **Circ Res**, v. 75, p. 539-45, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8062427>. Acesso em: 13 jul. 2015.

BENDECK, M. P. Targeting pericellular proteolysis in vascular disease. **Circ Res**, v. 91, n. 10, p. 861-2, nov. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433829>. Acesso em 16 jan. 2015.

BENJAMIN, M. M.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. **EXS**, v. 103, p. 209-79, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22642194>. Acesso em: 21 jul. 2015.

BHOOLA, K. D.; ELSON, C. J.; DIEPPE, P. A. Kinins--key mediators in inflammatory arthritis? **Br J Rheumatol**, v. 31, n. 8, p. 509-18, ago. 1992b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1643449>. Acesso em: 05 out. 2014.

BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. Pharmacol Rev, v. 44, p. 1-80, 1992a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313585>. Acesso em: 12 jan. 2015.

BLANKENBERG, S. et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. **Circulation**, v. 107, p. 1579-85, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668489>. Acesso em: 12 mar. 2015.

BRITO, C. J. Hiperplasia Intimal. In: _____. **Cirurgia Vascular, Endovascular e Angiologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2008. cap. 10. p. 165-75.

BURCH, R. M.; CONNOR, J. R.; TIFFANY, C. W. The kallikrein-kininogen-kinin system in chronic inflammation. **Agents Actions**, v. 27, n. 3-4, p. 258-60, jun. 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2801307>. Acesso em: 14 jul. 2015.

CALIXTO, J. B. et al. Kinins in pain and inflammation. Pain, v. 87, n. 1, p. 1-5, jul. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863040>. Acesso em: 27 out. 2014.

CAMPBELL-BOSWELL, M.; ROBERTSON, A. L. Jr. Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. **Exp Mol Pathol**, v. 35, p. 265–76, 1981. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7286164>. Acesso em: 23 jul. 2015.

CAROME, M. A. Assessment of 72-kilodalton gelatinase and TIMP-1 gene expression in normal and sclerotic murine glomeruli. **J Am Soc Nephrol**, v. 5, n. 6, p. 1391-9, dez. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7894006>. Acesso em: 14 jan. 2014.

CARRETERO, O. A.; SCICLI, A. G. Kinins paracrine hormone. **Kidney Int Suppl**, v. 26, p. S52-9, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3059033>. Acesso em: 17 jun. 2015.

CASTRO, M. M. et al. Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: therapeutic potential in cardiovascular diseases. **Pharmacol Res**, v. 64, p. 551-60, 2011a.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689755>. Acesso em: 19 jul. 2015.

CASTRO, M. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Matrix metalloproteinases: targets for doxycycline to prevent the vascular alterations of hypertension. **Pharmacol Res**, v. 64, p. 567-72, 2011b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514386>. Acesso em: 02 jul. 2015.

CEDRO, K. et al. Release of matrix metalloproteinase-9 during balloon angioplasty in patients with stable angina: a preliminary study. **Int J Cardiol**, v. 92, p. 177–80, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14659850>. Acesso em: 20 abr. 2015.

CHANG, W. et al. Cordycepin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. **Eur J Pharmacol**, v. 597, n. 1-3, p. 64-9, nov. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18782572>. Acesso em 29 jul. 2015.

CHAUX, A. et al. Perivascular delivery of a nitric oxide donor inhibits neointimal hyperplasia in vein grafts implanted in the arterial circulation. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg**, v. 115, n. 3, p. 604-12, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535448>. Acesso em: 02 fev. 2015.

CHEN, C.; MATTAR, S. G.; LUMSDEN, A. B. Oral administration of L-arginine reduces intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. **J Surg Res**, v. 82, p. 17-23, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068520>. Acesso em: 03 ago. 2015.

CHEN, L. t al. Overexpression of human endothelial nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells and in balloon-injured carotid artery. **Circ Res**, v. 82, p. 862-70, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576106>. Acesso em 14 jun. 2015.

CHEN, Q. et al. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators os cell behaviors in vascular formation and remodeling. . **Mediators Inflamm**, 2013. 14p. [Article ID 928315] Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/mi/2013/928315/>. Acesso em: 27 maio 2015.

CHEN, Z. et al. Potent inhibition of platelet- derived growth factor-induced responses in vascular smooth muscle cells by BMS-354825 (dasatinib**). Mol Pharmacol,** v. 69, p. 1527-33, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436588>. Acesso em. 17 maio 2015.

CHENG, C. et al. Activation of MMP8 and MMP13 by angiotensin II correlates to severe intra-plaque hemorrhages and collagen breakdown in atherosclerotic lesions with a vulnerable phenotype. **Atherosclerosis**, v. 204, n. 1, p. 26-33, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19233360>. Acesso em: 12 maio 2015.

CHOW, A. K.; CENA, J.; SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 2, p. 189-205, set. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17592511>. Acesso em:

21 jun. 2015.

CLEUTJENS, J. P. et al. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. **J Mol Cell Cardiol**, v. 27, n. 6, p. 1281-92, jun. 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8531210>. Acesso em: 04 ago. 2015.

CLOWES, A. W.; CLOWES, M. M.; REIDY, M. A. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. III. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels. **Lab Invest,** v. 54, p. 295-303, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3512908>. Acesso em 14 jun. 2015.

CLOWES, A. W.; REIDY, M. A.; CLOWES, M. M. Mechanisms of stenosis after arterial injury. **Lab Invest,** v. 49, p. 208-15, 1983. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6876748>. Acesso em: 16 jul. 2015.

COLOTTI, C. et al. Matrix metalloprotease-2 and -9 concentration and activity in serum and culture medium samples: a methodological reappraisal. **Clin Chem Lab Med**, v. 45, n. 10, p. 1292-8, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17727309>. Acesso em: 4 fev. 2015.

CORNWELL, T. L. et al. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP, Am. J. PHYSIOL, v. 267, p. C1405-13, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7977701>. Acesso em: 19 nov. 2014.

COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. **Science**, v. 295, p. 2387-92, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923519>. Acesso em: 11 dez. 2014.

CREEMERS, E. E. et al. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? **Circ Res** v. 89, n. 3, p. 201-10, ago. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11485970>. Acesso em: 18 jan. 2015.

DAEMEN, M. J. et al. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. **Circ Res**, v. 68, p. 450-6, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1991349>. Acesso em: 12 jul. 2015.

De GASPARO, M. Angiotensin II and nitric oxide interaction. **Heart Fail Rev**, v. 7, p. 347-58, out. 2002b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379820>. Acesso em: 04 jun. 2015.

De GASPARO, M. AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features. **Drugs**, v. 62, n. 1, p. 1-10, 2002a. Spec. [in French]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036384>. Acesso em: 03 jun. 2015.

DELA CADENA, R. A.; SCOTT, C. F.; COLMAN, R. W. Evaluation of a microassay for human plasma prekallikrein. **J Lab Clin Med**. v. 109, n. 5, p. 601-7, maio 1987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 3646287>. Acesso em: 01 jun. 2014.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; JOVILIANO, E. E.; EVORA, P. R. Determination of kininogens levels and kallikrein/kininase II activities in patients with thromboangiitis obliterans. **Scand J Immunol**, v. 72, n. 2, p. 128-33, ago. 2010b . Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20618771>. Acesso em: 15 maio 2015.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; REIS, M. L.; DONADI, E. A. Kinin system in lupus nephritis. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 9-10, p. 1889-96, set. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562080>. Acesso em: 23 jul. 2015.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; REIS, M. L.; DONADI, E. A. The kinin system in patients with systemic lupus erythematosus exhibiting mucocutaneous lesions: a clinical study. **Scand J Immunol**, v. 71, n. 4, p. 292-7, abr. 2010a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20384873>. Acesso em 17 jul. 2015.

DIMMELER, S. et al. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. **Circ Res**, v. 81, p. 970–6, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9400377>. Acesso em: 6 jun. 2015.

DINIZ, C. R.; CARVALHO, I. F. A micromethod for determination of bradykininogen under several conditions. **Ann N Y Acad Sci**. v. 104, p.77-89, fev. 1963. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14027972>. Acesso em: 19 mar. 2014.

DIXON, B. S.; DENNIS, M. J. Regulation of mitogenesis by kinins in arterial smooth muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 273, p. C7–C20, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9252437>. Acesso em: 19 mar. 2015.

DWEIK RA, et al. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. **J Clin Invest**, v. 101, n. 3, p. 660-6, fev 1998. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9449700>. Acesso em 15 jan. 2014.

DO, Y. S.; et al. In-stent restenosis limitation with stent-based controlled-release nitric oxide: initial results in rabbits. **Radiology**, v. 230, p. 377-82, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14699187>. Acesso em: 13 ago. 2015.

DOLLERY, C. M.; MCEWAN, J. R.; HENNEY, A. M. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. **Circ Res**, v. 77, p. 863–8, 1995.

DONNELLY, R.; COLLINSON, D. J.; MANNING, G. Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. **J Hypertens**, v. 21, n. 9, p. 1627-30, 2003. <Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12923392>. Acesso em: 9 fev. 2015.

DORMANDY, J. A.; RUTHERFORD, R. B. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). **J Vasc Surg**, v. 31, p. S1-S296, jan. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666287>. Acesso em: 20 dez. 2014.

DUBEY, R. K.; JACKSON, E. K.; LUSCHER, T. F. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensin-1 receptors. **J. Clin. Invest**, v. 96, p. 141-49, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7615784>. Acesso em: 04 jun. 2015.

EAGLETON, M. J. et al. Early increased MT1-MMP expression and late MMP-2 and MMP-9 activity during angiotensin II induced aneurysm formation. **Journal of Surgical Research**, v. 135, n. 2, p. 345-51, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716358>. Acesso em: 01 ago. 2015.

EL-DAHR, S. S. et al. Bradykinin stimulates c-fos expression, AP-1-DNA binding activity and proliferation of rat glomerular mesangial cells. **Kidney Int,** v. 50, p. 1850-5, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943466>. Acesso em: 29 jul. 2015.

FARB, A. et al. Pathology of acute and chronic coronary *stent*ing in hu-mans. **Circulation**, v. 99, p. 44–52, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9884378>. Acesso em: 23 set. 2014.

FARHY, R. D. et al. Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. **Circ Res,** v. 72, p. 1202-10, 1993. Disponível em: <ttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684331>. Acesso 05 jun. 2015.

FINGERLE, J. et al. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, p. 8412-16, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2813399>. Acesso em: 14 maio 2015.

FINGLETON, B. MMPs as therapeutic targets--still a viable option? **Semin Cell Dev Biol**, v. 19, p. 61–68, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693104>. Acesso em 18 mar. 2015.

FORRESTER, J. S. et al. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. **J Am Coll Cardiol**, v. 17, n. 3, p. 758-69, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1993798>. Acesso em: 10 fev. 2015.

FRANCO, C. et al. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices. **Am J Pathol**, v. 168, n. 5, p. 1697-709, maio 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651635>. Acesso em 05 abr. 2015.

FULTON, G. J. et al. Local effects of nitric oxide supplementation and suppression in the development of intimal hyperplasia in experimental vein grafts. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 15, p. 279-89, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9610339>. Acesso em: 10 ago. 2015.

FUNCK, R. C. et al. Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. **Adv Exp Med Biol**, v. 432, p. 35-44, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9433509>. Acesso em: 16 jun. 2015.

GALIS, Z. S.; KHATRI, J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. **Circ Res**, v. 90, p. 251-62, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861412>. Acesso em 05 ago.

2015.

GALIS, Z. S. et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J Clin Invest**, v. 94, n. 6, p. 2493-503, dez. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989608>. Acesso: 24 jul. 2015.

GARG, U. C.; HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **J. Clin. Invest**, v. 83, p. 1774-7, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2540223>. Acesso em: 25 maio 2015.

GE, J. et al. Elevated matrix metalloproteinase expression after stent implantation is associated with restenosis. **Int J Cardiol**, v. 112, n. 1, p. 85-90, set. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16316696>. Acesso em: 9 jun. 2015.

GEISTERFER, A. A.; PEACH M. J.; OWENS, G. K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 62, p. 749–56, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3280155>. Acesso em: 11 dez. 2014.

GERLACH R. F.; UZUELLI J. A.; SOUZA-TARLA C. D.; TANUS-SANTOS J. E. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. **Anal Biochem**. v. 344, n. 1, p. 147-9, set. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 15950912>. Acesso em: 11 dez. 2014.

GERLACH R. F.; DEMACQ C.; JUNG K.; TANUS-SANTOS J. E. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma**. Clin Biochem**. v. 40, n.1-2, p. 119-23, jan. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 17150202>. Acesso em: 11 dez. 2014.

GIBBONS, G. H.; PRATT, R. E.; DZAU, V. J. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. **J Clin Invest**, v. 90, p. 456–61, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644917>. Acesso em: 14 fev. 2015.

GRANDAS, O. H. et al. Regulation of vascular smooth muscle cell expression and function of matrix metalloproteinases is mediated by estrogen and progesterone exposure. **Journal of Vascular Surgery**, v. 49, n. 1, p. 185-91, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18829229>. Acesso em 16 abr. 2015.

GRIENDLING, K. K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 74, p. 1141– 48, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8187280>. Acesso em: 7 jun. 2015.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 48, p. 1014-22, jun. 1962. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13902219>. Acesso em 26 jun. 2015.

GROVES, P. H. et al. The effects of exogenous nitric oxide on smooth muscle cell

proliferation following porcine carotid angioplasty. **Cardiovasc. Res**, v. 30, p. 87–96, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7553728>. Acesso em 19 nov. 2014.

GUO J. et al. Mechanisms of vascular preservation by a novel NO donor following rat carotid artery intimal injury. **Am. J. Physiol**, v. 269, p. H1122-31, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7573510>. Acesso em 07 dez. 2014.

HALL, J. M.; MORTON, I. K. Bradykinin B2 receptor evoked K+ permeability increase mediates relaxation in the rat duodenum. **Eur J Pharmacol**, v. 193, n. 2, p. 231-8, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1646733>. Acesso em: 12 abr. 2015.

HARNEK, J. et al. Local infusion of the nitric oxide donor SIN-1 after angioplasty: effects on intimal hyperplasia in porcine coronary arteries. **Acta Radiol**, v. 44, p. 395-402, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12846690>. Acesso em: 27 jun. 2015.

HASENSTAB, D.; FOROUGH, R.; CLOWES, A. W. Plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 increase after arterial injury in rats. **Circ Res**, v. 80, p. 490-6, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9118479>. Acesso em: 21 jul. 2015.

HICKEY, M. J. et al. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. **FASEB J**, v. 11, n. 12, p. 955-64, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9337148>. Acesso em 01 fev. 2015.

HITOMI, H. et al. Synergistic effect of mechanical stretch and angiotensin II on superoxide production via NADPH oxidase in vascular smooth muscle cells. **J Hypertens**, v. 24, p. 1089–95, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16685209>. Acesso em: 19 jul. 2015.

HOJO, Y. et al. Matrix metalloproteinase expression in the coronary circulation induced by coronary angioplasty. **Atherosclerosis**, v. 161, n. 1, p. 185-92, mar. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11882331>. Acesso em: 23 mar. 2015.

HOU, D. M. et al. Stent-based nitric oxide delivery reducing neointimal proliferation in a porcine carotid overstretch injury model. **Cardiovasc Intervent Radiol,** v. 28, p. 60-5, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15719180>. Acesso em 6 nov. 2014.

HUTCHESON, I. R.; GRIFFITH, T. M. Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. **Am J Physiol**, v. 261, p. H257-62, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1858928>. Acesso em: 12 jul. 2015.

IGNARRO L. J. et al. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. **J. Cardiovasc. Pharmacol**, v. 34, p. 876-84, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10598133>. Acesso em: 03 jun. 2015.

IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. Novel features on nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. **Curr. Atheroscler. Rep**, v. 6, p. 281-87, 2004. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11883-004-0059-9#page-1>. Acesso em: 08 maio 2015.

ISLAM, M. M. et al. A nonantibiotic chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits intimal thickening. **Am J Pathol**, v. 163, n. 4, p. 1557-66. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507662>. Acesso em: 11 maio 2015.

ITOH, H. et al. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. **J Clin Invest**, v. 91, p. 2268–74, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486785>. Acesso em 18 jun. 2015.

JACOBSEN, F. E.; LEWIS, J. A.; COHEN, S. M. The design of inhibitors for medicinally relevant metalloproteins. **ChemMedChem**, v. 2, p. 152-71, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17163561>. Acesso em: 13 dez. 2014.

JAHNKE, T. et al. Hemobahn stent-grafts for the treatment of femoropopliteal arterial obstructions: Midterm results of a prospective trial. **J Vasc Interv Radiol**, v. 14, p. 41-51, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525585>. Acesso em: 12 ago. 2014.

JANSSENS, S. et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. **Circulation**, v. 97, p. 1274-81, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570198>. Acesso em: 04 jul. 2015.

JEANS, W. D. et al. Fate of patients undergoing transluminal angioplasty for lower-limb ischemia. **Radiology**, v. 177, n. 2, p. 559-64, nov. 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2145608>. Acesso em: 17 fev. 2015.

JENKINS, G. M. et al. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. **Circulation**, v. 97, n. 1, p. 82-90, jan. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9443435>. Acesso em: 14 maio 2015.

JOHNSON, C.; GALIS, Z. S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 1, p. 54-60, jan. 2004. Disponívem em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14551157>. Acesso em: 18 out. 2014.

JOVILIANO, E. E. et al. Inflammatory markers and restenosis in peripheral percutaneous angioplasty with intravascular stenting: current concepts. **Ann Vasc Surg**, v. 25, n. 6, p. 846-55, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620656>. Acesso em: 13 mar. 2015.

KAKOKI, M.; SMITHIES, O. The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney. **Kidney Int**, v. 75, p. 101930, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190676>. Acesso em: 14 dez. 2014.

KAPLAN, A. P. et al. Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 16, p. 403-29, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9926288>. Acesso em: 19 nov. 2014.

KAPLAN, A. P. et al. The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. **Adv Immunol**, v. 66, p. 225-72, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9328643>. Acesso em: 02 maio 2015.

KATSAROS, K. M. et al. Increased restenosis rate after implantation of drug-eluting stents in patients with elevated serum activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. **JACC Cardiovasc Interv**, v. 3, n. 1, p. 90-7, jan. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20129576>. Acesso em: 24 jan. 2015.

KAUL, S. et al. Polymeric-based perivascular delivery of a nitric oxide donor inhib-its intimal thickening after balloon denudation arterial injury: role of nuclear factor-kappaB. **J Am Coll Cardiol,** v. 35, p. 493-501, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676700>. Acesso em: 03 jul. 2015.

KAYASHIMA, Y.; SMITHIES, O.; KAKOKI, M. The kallikrein-kinin system and oxidative stress. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 21, n. 1, p. 92-96, 2012**.** Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 22048723>. Acesso em 21 jun. 2015.

KEDORA, J. et al. Randomized comparison of percutaneous Viabahn stent grafts vs prosthetic femoral-popliteal bypass in the treatment of superficial femoral arterial occlusive disease. **J Vasc Surg**, v. 45, n. 1, p. 10-16, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126520>. Acesso em 19 jun. 2015.

KIBBE, M. R. et al. Adenovirus-mediated gene transfer of human inducible nitric oxide synthase in porcine vein grafts inhibits intimal hyperplasia. **J Vasc Surg**, v. 34, n. 1, p. 156-65, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11436090>. Acesso em: 01 jan. 2015.

KIEHNE, K.; ROZENGURT, E. Synergistic stimulation of DNA synthesis by bradykinin and vasopressin in Swiss 3T3 cells. **J Cell Physiol**, v. 160, p. 502-10, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8077288>. Acesso em: 13 jul. 2015.

KORNOWSKI, R. et al. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. **J Am Coll Cardiol**, v. 31, n. 1, p. 224-30, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9426044>. Acesso em: 01 nov. 2014.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci**, v. 88, p. 46-51, 1991. Disponívem em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1675786>. Acesso em: 28 mar. 2015.

KUHR, F. et al. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase

by kinin B1 and B2 receptors. **Neuropeptides**, v. 44, p. 145-54, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045558>. Acesso em. 03 jun. 2015.

KUZUYA, M.; IGUCHI, A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. **J Atheroscler Thromb**, v. 10, n. 5, p. 275-82, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14718744>. Acesso em: 17 set. 2014.

KUZUYA, M. et al. Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia. **Circulation**, v. 108, n. 11, p. 1375-81, set. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12939223>. Acesso em: 12 jul. 2015.

LABLANCHE, J. M. et al. Effect of the direct nitric oxide donors linsidomine and molsidomine on angiographic restenosis after coronary balloon angioplasty. The ACCORD Study. Angioplastic Coronaire Corvasal Diltiazem. **Circulation,** v. 95, p. 83-9, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994421>. Acesso em: 01 fev. 2015.

LAIRD, J. R. et al. Nitinol stent implantation versus balloon angioplasty for lesions in the superficial femoral artery and proximal popliteal artery: twelve-month results from the RESILIENT randomized trial. **Circ Cardiovasc Interv**, v. 3, n. 3, p. 267-76, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484101>. Acesso em: 23 dez. 2014.

LAMMER, J. et al. Heparin-bonded covered stents versus bare-metal stents for complex femoropopliteal artery lesions. **J Am Coll Cardiol**, v. 65, p. 1320-1327, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 23831445>. Acesso em: 23 dez. 2014.

LANDAU, C.; LANGE, R. A.; HILLIS, L. D. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. **N Engl J Med**, v. 330, p. 981-93, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8121462>. Acesso em: 10 ago. 2014.

LEE, J. S. et al. Chronic inhalation of nitric oxide inhibits neointimal formation after balloon-induced arterial injury. **Circ. Res**, v. 78, p. 337-42, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8575078>. Acesso em: 12 jun. 2015.

LEI, J. et al. Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. **Nitric Oxide**, v. 35, p. 175-85, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24095696<. Acesso em: 05 set. 2014.

LEWIS, E. J. et al. Ro 32-3555, and orally active collagenase inhibitor, prevents cartilage breakdown in vitro and in vivo. **Br J Pharmacol**, v. 121, p. 540-46, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9179398>. Acesso em: 11 nov. 2014.

LI, D. Y. et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. **Nature**, v. 393, n. 6682, p. 276-80, maio 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607766>. Acesso em: 08 out. 2015.

LI, Z. et al. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. **Am J Pathol**, v. 148, 1, p. 121-8, jan. 1996. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546199>. Acesso em: 07 out. 2015

LIBBY, P.; WARNER, S. J.; FRIEDMAN, G. B. Interleukin-1: a mitogen for human vascular smooth-muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. **J Clin Invest**, v. 81, p. 487-98, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3276731>. Acesso em: 19 set. 2014.

LINDNER, V.; MAJACK, R. A.; REIDY, M. A. Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries. **J Clin Invest**, v. 85, p. 2004-8, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC296670/>. Acesso em: 03 set. 2014.

LINZ, W. et al. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Pharmacol Rev**,v. 47, p. 25-49, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7784479>. Acesso em: 02 jul. 2015.

LOWE, H. C.; OESTERLE, S. N.; KHACHIGAN, L. M. Coronary in-stent restenosis: current status and future strategies. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, p. 183-93, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788206>. Acesso em: 25 set. 2015.

LYNCH, J. R. et al. Novel diagnostic test for acute stroke. **Stroke**, v. 35, n. 1, p. 57-63, jan. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14671250>. Acesso em: 23 nov. 2014.

MAFFEI F. H. A. Aterosclerose Obliterante Periférica: epidemiologia, fisiopatoligia, quadro clínico e diagnóstico. In: _____. **Doenças vasculares periféricas.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1141-57.

MAJIMA, M. et al. Determination of bradykinin-(1-5) in inflammatory exudate by a new ELISA as a reliable indicator of bradykinin generation. **Inflamm Res**. v. 45, n. 8, p. 416-23, Agos. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 8872516>. Acesso em: 23 nov. 2014.

MAKELA, M.; SALO, T.; LARJAVA, H. MMP-9 from TNFα-stimulated keratinocytes binds to cell membranes and type I collagen: a cause for extended matrix degradation in inflammation?. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 253, p. 325-35, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878537>. Acesso em: 05 fev. 2015.

MALIK, N. et al. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. **J Immunol**, v. 156, p. 3952-60, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621936>. Acesso em: 10 fev. 2015.

MALINSKI, T. et al. Nitric oxide synthase activity in genetic hypertension. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 194, p. 654-58, p. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688219>. Acesso em: 12 jun. 2015.

MARGOLIUS, H. S. Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. **Diabetes**, v. 45, p. 4–9. 1996. Supplement 1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529794>. Acesso em: 15 ago. 2014.

MARKETOU, M. et al. Cardioprotective effects of a selective B(2) receptor agonist of bradykinin post- acute myocardial infarct. **Am J Hypertens**, v. 23, p. 562-8, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20186129>. Acesso em: 25 ago. 2014.

MARKS, D. S. et al. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. **J Clin Invest**, v. 96, p. 2630-38, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675628>. Acesso em: 10 dez. 2014.

MARTINEZ, R.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J.; DIETHRICH, E. B. Stenting for abdominal aortic occlusive disease. Long-term results. **Tex Heart Inst J**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9068134>. Acesso em: 02 ago. 2014.

MATSI, P. J. et al. Femoropopliteal angioplasty in patients with claudication: primary and secondary patency in 140 limbs with 1-3-year follow-up. **Radiology**, v. 191, n. 3, p. 727-33, jun. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8184053>. Acesso em: 05 ago. 2014.

MAUVIEL, A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. **J Cell Biochem**, v. 53, p. 288-95, 1993. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcb.240530404/pdf>. Acesso em: 27 nov. 2014.

MCALLISTER, B. S. et al. The functional interaction of EGF and PDGF with bradykinin in the proliferation of human gingival fibroblasts. **J Periodontol,** v. 66, p. 429-37, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7562331>. Acesso em: 25 jul. 2015.

MCCALL, T. B. et al. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. **Biochem. J**, v. 261, n. 1, p. 293-96, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2549965>. Acesso em: 13 jan. 2015.

MCNAMARA, D. B. et al. L-Arginine inhibits balloon catheter- induced intimal hyperplasia. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 193, p. 291-96, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8503919>. Acesso em: 17 out. 2014.

MELLION, B. T. et al. Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation. **Mol. Pharmacol**, v. 23, n. 3, p. 653-64, 1983. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6135148>. Acesso em: 29 out. 2014.

MERVAALA, E. M. et al. Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. **Hypertension**, v. 33, p. 389-95, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9931135>. Acesso em: 25 fev. 2015.

MITRA, A. K.; DEL CORE, M. G.; AGRAWAL, D. K. Cells, cytokines and cellular

immunity in the pathogenesis of fibroproliferative vasculopathies. **Can J Physiol Pharmacol,** v. 83, p. 701-15, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16333372>. Acesso em: 28 jun. 2015.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, p. 2002-12, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504210>. Acesso em: 15 maio 2015.

MORAND-CONTANT, M.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B.; COUTURE, R. Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: Receptors and mechanisms. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 299, p. H1625-32, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833961>. Acesso em: 29 nov. 2014.

MOREAU, M. E. et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets**. J Pharmacol Sci**, v. 99, p. 6-38, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177542>. Acesso em: 06 mar. 2015.

MOUNTAIN, D. J. et al. Role of MT1-MMP in estrogen-mediated cellular processes of intimal hyperplasia. **Journal of Surgical Research**, v. 173, n. 2, p. 224-31, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21777927>. Acesso em: 02 fev. 2015.

NAGASAWA. A. et al. Important role of the angiotensin II pathway in producing matrix metalloproteinase-9 in human thoracic aortic aneurysms. **The Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 1, p. 472-7, jul. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23295196>. Acesso em: 03 jul. 2015.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v. 69, p. 562-73, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405877>. Acesso em: 15 jul. 2015.

NAPOLI, C. et al. Effects of nitric oxide-releasing aspirin versus aspirin on restenosis in hypercholesterolemic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 98, p. 2860-4, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226331>. Acesso em. 07 jun. 2015.

NAPOLI, C. et al. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 4 p. 265-79, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684613>. Acesso em: 19 fev. 2015.

NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. **Vascular Pharmacology,** v. 56, n. 5-6, p. 232-44, maio/jun. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22326338>. Acesso em: 25 jul. 2015.

NEWBY, A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardio- vasc Res**, v. 69, n. 3, p. 614-24, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16266693>. Acesso em: 04 maio 2015.

NORGREN L. et al. TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v.33(Suppl 1):S1–75, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140820>. Acesso em: 02 fev 2014.

NUTI, E.; TUCCINARDI, T.; ROSSELLO, A. Matrix metalloproteinase inhibitors: new challenges in the era of post broad-spectrum inhibitors. **Curr Pharm Des**, v. 13, n. 20, p. 2087-100, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627541>. Acesso em: 14 fev. 2015.

O'BRIEN, E. R, SCHWARTZ, S. M. Update of biology and clinical study of restenosis. **Trends Cardiovasc Med,** v. 4, p. 169-78, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21244883>. Acesso em 15 jun. 2015.

ORFORD, J. L. et al. The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis. **Am J Cardiol**, v. 86, n. 4B, p. 6H-11H, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021250>. Acesso em: 10 out. 2014.

OSGOOD, M. J. et al. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of intimal hyperplasia: therapeutic potential for prevention of vein graft failure?. **Ann Vasc Surg**, v. 26, n. 8, p. 1130-44, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445245>. Acesso em: 05 ago. 2014.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664-66, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3131684>. Acesso em: 27 ago. 2014.

PAPAPETROPOULOS, A. et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. **Am. J. Pathol**, v. 150, n. 5, p. 1835-44, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137106>. Acesso em: 16 nov. 2014.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 617-29, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286728>. Acesso em: 14 dez. 2014.

PATHAK, M. et al. Structure of plasma and tissue kallikreins. **Thromb Haemost**, v. 110, n. 3, p. 423-33, set. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23494059>. Acesso em: 25 maio 2015.

PENG, H. B.; SPIECKER, M.; LIAO, J. K. Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation. **J. Immunol**, v. 161, n. 4 p. 1970-76, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712068>. Acesso em: 03 jun. 2015.

POHL, U.; BUSSE, R. Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxant factor. **Am J Physiol**, v. 256, p. H1595-H1600, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2660596>. Acesso em: 19 jan. 2015.

POWELL, J. S. et al. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. **Science**, v. 245, p. 186-88, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2526370>. Acesso em: 29 jun. 2015.

RAFIEIAN-KOPAEI, M. et al. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. **Int J Prevent Med**, v. 5, n. 8, p. 927-46, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25489440>. Acesso em: 05 abr. 2015.

RAJAGOPALAN, S. et al. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foamcells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. **J Clin Invest**, v. 98, n. 11, p. 2572-9, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8958220>. Acesso em 13 jun. 2015.

RAKUGI, H. et al. Potencial importance of tissue angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition in preventing in neointimal hyperplasia. **Circulation,** v. 90, n. 1, p. 449-55, 1994 a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7517799>. Acesso em: 12 fev. 2015.

RAKUGI, H. et al. Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury. Possible role in restenosis. **J Clin Invest**, v. 93, p. 339-46, 1994 b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8282805>. Acesso em: 12 nov. 2014.

REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol Rev**, v. 32, p.1-46, 1980. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7015371>. Acesso em: 14 jun. 2015.

RENKIEWICZ, R. et al. Broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor marimastat-induced musculoskeletal side effects in rats. **Arthritis Rheum**, v. 48, p. 1742-49, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12794843>. Acesso em: 11 maio. 2015.

RIBEIRO, M. S. et al**.** Characterization of the kallikrein-kinin system, metalloproteinases, and their tissue inhibitors in the in-stent restenosis after peripheral percutaneous angioplasty. **Ann Vasc Surg**, v. 28. n. 4, p. 1005-15, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24440188>. Acesso em: 09 mar. 2015.

RITCHIE, R. H. et al. Bradykinin blocks angiotensin II-induced hypertrophy in the presence of endothelial cells. **Hypertension**, v. 31, p. 39-44, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9449388>. Acesso em: 30 maio 2014.

ROCHA, L. A. et al. Endovascular approach for peripheral arterial injuries. **Ann Vasc Surg**, v. 27, n. 5, p. 587-93, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23809928>. Acesso em: 17 abr. 2015.

ROSS, R. et al. Platelet-dependent serum factor that stimulates proliferation of arterial smooth-muscle cells in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 71, p. 1207-10, 1974. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4208546>. Acesso em: 14 dez.

2014.

ROSS, R.; RAINES, E. W.; BOWENPOPE, D. F. The biology of platelet-derived growth-factor. **Cell**, v. 46, p. 155-69, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3013421>. Acesso em: 18 fev. 2015.

ROSS, R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. **Am Heart J**, v. 138, p. S419-20, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10539839>. Acesso em: 02 mar. 2015.

ROSS R. George Lyman Duff Mamorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. **Arteriosclerosis**, v. 1, n. 5, p. 293-311, 1981. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6287982>. Acesso em: 13 abr. 2015.

ROTHSCHILD, A. M.; BODEN, G.; COLMAN, R. W. Kininogen changes in human plasma following a test meal or insulin administration. **Immunopharmacology**. v. 33, n. 1-3, p. 354-8, jun. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 8856185>. Acesso em: 13 abr. 2014.

RUEF, J.; HOFMANN, M.; HAASE, J. Endovascular interventions in iliac and infrainguinal occlusive artery disease. **J Interv Cardiol**, v. 17, n. 6, p. 427-35, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546296>. Acesso em: 26 nov. 2014.

RUTHERFORD, R. **Vascular Surgery**. USA: Elsevier Saunders, 2005.

SAAMELI, K.; ESKES, T. K. Bradykinin and cardiovascular system: estimation of half-life. **Am J Physiol**, v. 203, p. 261-65, 1962. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14495729>. Acesso em: 01 jun. 2015.

SADOSHIMA, J. et al. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. **Cell**, v. 75, p. 977-84, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252633>. Acesso em: 28 maio 2015.

SARKAR, R. et al. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. **Circ. Res**, v. 78, p. 225-30, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8575065>. Acesso em: 01 jun. 2015.

SAXON, R. R. et al. Long-term results of ePTFE stent-graft versus angioplasty in the femoropopliteal artery: single center experience from a prospective, randomized trial. **Vasc Interv Radiol**, v. 14, p. 303-11, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12631634>. Acesso em: 15 set. 2014.

SAXON, R. R. et al. Long-term patency and clinical outcome of the Viabahn stent-graft for femoropopliteal artery obstructions. **J Vasc Interv Radiol**, v. 18, p.1341-1349, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 18003983 >. Acesso em: 15 set. 2014.

SAXON, R. R. et al. Randomized, multicenter study comparing expanded polytetrafluoroethylene covered endoprosthesis placement with percutaneous transluminal angioplasty in the treatment of superficial femoral artery occlusive disease. **J Vasc Interv Radiol,** v. 19, p. 823-32, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18503895>. Acesso em: 04 jul. 2015.

SCHIEFFER, B. et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. **Circulation**, v. 101, p. 1372–8, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736279>. Acesso em: 18 abr. 2015.

SCHILLINGER, M. et al. Vascular inflammation and percutaneous transluminal angioplasty of the femoropopliteal artery: association with restenosis. **Radiology**, v. 225, n. 1, p. 21-6, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354979>. Acesso em: 23 jan. 2015.

SCHILLINGER, M. et al. Sustained benefit at 2 years of primary femoropopliteal stenting compared with balloon angioplasty with optional stenting. **Circulation**, v. 115, n. 21, p. 2745-9, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502568>. Acesso em: 10 jul. 2015.

SCHILLINGER, M. et al. Balloon angioplasty versus implantation of nitinol stents in the superficial femoral artery. **N Engl J Med**, v. 354, n. 18, p. 1879-88, 2006. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa051303>. Acesso em: 11 jul. 2015.

SCHMAIER, A. H.; ROJKAER, R.; SHARIAT-MADAR, Z. Activation of the plasma kallikrein / kinin system on cells: a revised hypothesis. **Thromb Haemost**, v. 82, p. 226-33, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605708>. Acesso em 12 nov. 2014.

SCHONBECK, U. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture?. **Circ Res**, v. 81, p. 448-54, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285647>. Acesso em: 05 dez. 2015.

SCHWARZACHER, S. P. et al. Local intramural delivery of L-arginine enhances nitric oxide generation and inhibits lesion formation after balloon angioplasty. **Circulation**, v. 95, p. 1863-9, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9107174>. Acesso em: 22 jun. 2015.

SHARMA, J. N. et al. Blood pressure regulation by the kallikrein-kinin system. **Gen Pharmacol**, v. 27, p. 55-63, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742494>. Acesso em 27 set. 2014.

SHEARS 2nd, L. L. et al. Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs in vivo. **J. Am. Coll. Surg**, v. 187, n. 3, p. 295-306, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9740187>. Acesso em: 29 maio 2015.

SIASOS, G. et al. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix

metalloproteinases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1132-48, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22519444>. Acesso em 14 jun. 2015.

SILVA, M. R.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am J Physiol**, v. 156, p. 261-73, 1949. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18127230>. Acesso em: 30 ago. 2014.

SIRONI, L. et al. Effect of valsartan on angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor-1 biosynthesis in arterial smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 37, p. 961-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244025>. Acesso em: 11 fev. 2015.

SIWIK, D. A.; PAGANO, P. J.; COLUCCI, W. S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 280, p. C53-60, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121376>. Acesso em: 09 jul. 2015.

SOUTHGATE, K. M. et al. Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries. **Circ Res**, v. 79, n. 6, p. 1177-87, dez. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943956>. Acesso 16 jun. 2015.

STORGER, S.; HAASE, J. Polytetrafluoroethylene-covered stents: indications, advantages, and limitations**. J Interv Cardiol,** v. 12, p. 451-6, 1999. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1540-8183.1999.tb00674.x/abstract>. Acesso em 21 jul. 2015.

SULLIVAN, T. M. et al. Percutaneous transluminal angioplasty and primary stenting of the iliac arteries in 288 patients. **J Vasc Surg**, v. 25, n. 5, p. 829-39, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9152310>. Acesso em: 26 jun. 2015.

TAKAGISHI, T. et al. Effect of angiotensin II and thromboxane A2 on the production of matrix metalloproteinase by human aortic smooth muscle cells. **Biochem Mol Biol Int**, v. 35, p. 265-73, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7663380>. Acesso em: 14 jun. 2015.

TARABOLETTI, G. et al. Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of metalloproteinases. **Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 293-98, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535861>. Acesso em: 07 jul. 2015.

TETTEROO, E. et al. Randomised comparison of primary *stent* placement versus primary angioplasty followed by selective *stent* placement in patients with iliacarteryocclusive disease. Dutch Iliac *Stent* Trial Study Group. **Lancet**, v. 351, n. 9110, p. 1153-9, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643685>. Acesso em: 27 jun. 2015.

TIFFANY, C. W.; BURCH, R. M. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and

interleukin-1 release from macrophages. **FEBS Lett**, v. 247, n. 2, p. 189-92, abr. 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2541011>. Acesso em: 17 jul. 2015.

TIMMERMANS, P. B. et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacol Rev**, 1v. 45, p. 205-51, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8372104>. Acesso em: 29 jun. 2015.

TSUCHIDA, S. et al. Potent antihypertrophic effect of the bradykinin B2 receptor system on the renal vasculature. **Kidney Int,** v. 56, p. 509-16, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10432390>. Acesso em: 12 mar. 2015.

TUMMALA, P. E. et al. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. **Circulation**, v. 100, p. 1223-9, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484544>. Acesso 29 nov. 2014.

TYAGI, S. C. et al. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. **Mol Cell Biochem**, v. 155, n. 1, p. 13-21, fev. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717434>. Acesso em: 23 abr. 2015.

TZENG, E. et al. Adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer inhibits hepatocyte apoptosis. **Surgery**, v. 124, n. 2, p. 278-83, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9706149>. Acesso em: 21 set. 2014.

VAN DEN STEEN, P. E. et al. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 6, p. 375-536, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540195>. Acesso em: 26 maio 2015.

VAN DER LAAN, W. H. et al. Cartilage degradation and invasion by rheumatoid synovial fibroblasts is inhibited by gene transfer of TIMP-1 and TIMP-3. **Gene Ther**, v. 10, p. 234-42, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571631>. Acesso em: 15 mar 2015.

VARENNE, O. et al. Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs. **Circulation**, v. 98, p. 919-26, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738648>. Acesso em: 06 jul. 2015.

VAUGHAN, D. E.; LAZOS, S. A.; TONG, K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. **J Clin Invest**, v. 95, p. 995-1001, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7884001>. Acesso em: 16 jul. 2015.

VERBEUREN, T. J. et al. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. II. Influence of treatment with dipyridamole on endothelium-dependent and endothelium-independent responses in isolated aortas of control and hypercholesterolemic

rabbits. **Circ. Res**, v. 59, p. 496-504, 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3802425>. Acesso em: 19 maio 2015.

VERMA, S.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide-eluting polyurethanes–vascular grafts of the future? **N Engl J Med**, v. 353, p. 730-1, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107627>. Acesso em: 17 set. 2014.

VIRMANI, R.; FARB, A. Pathology of in-stent restenosis. **Curr Opin Lipidol**, v. 10, n. 6, p. 499-506, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10680043>. Acesso em: 13 fev. 2015.

VISWANATHAN, M. et al. Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II AT1 receptors in neointima of rat aorta. **J Clin Invest**, v. 90, p. 1707-12, 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1331171>. Acesso em 29 jun. 2015.

VON DER LEYEN, H. E. et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 92, p. 1137-41, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532305>. Acesso em: 14 abr. 2015.

WANG, K. et al. Local adenoviral-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer inhibits neointimal formation in the porcine coronary stented model. **Mol Ther**, v. 7, p. 597-603, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12718902>. Acesso em: 13 jul. 2015.

WASSENAAR, A. e al. CD40 engagement modulates the production of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts**. Clin Exp Immunol**, v. 115, p. 161-67, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9933437>. Acesso em: 30 jan. 2015.

WASSMANN, S.; NICKENIG, G. Pathophysiological regulation of the AT1-receptor and implications for vascular disease. **J Hypertens Suppl**, v. 24, p. S15-21, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601568>. Acesso em: 12 jul. 2015.

WERNER, C. et al. RAS blockade with ARB and ACE inhibitors: current perspective on rationale and patient selection. **Clin Res Cardiol**, v. 97, p. 418-31, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18454336>. Acesso em: 13 abr. 2015.

WHATLING, C.; MCPHEAT, W.; HURT-CAMEJO, E. Matrix management: assigning different roles for MMP-2 and MMP-9 in vascular remodeling. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 1, p. 10-1, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707036>. Acesso em: 02 dez. 2014.

WIDLANSKY, M. E. et al. The clinical implications of endothelial dysfunction. **J Am Coll Cardiol**, v. 42, p. 1149-60, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522472>. Acesso em: 11 jun. 2015.

WIERNAS, T. K. et al. Effects of bradykinin on signal transduction, cell proliferation, and cytokine, prostaglandin E_2 and collagenase-1 release from human corneal epithelial cells. **Br J Pharmacol**, v. 123, p. 1127-37, 1998. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9559896>. Acesso em: 27 maio 2015.

WITTE, M. B. et al. Metalloproteinase inhibitors and wound healing: a novel enhancer of wound strength. **Surgery**, v. 124, p. 464-70, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9706172>. Acesso em: 15 jun. 2015.

WOHRLE, J. et al. No effect of highly dosed nitric oxide donor molsidomine on the angiographic restenosis rate after percutaneous coronary angioplasty: a randomized, placebo controlled, double-blind trial. **Can J Cardiol**, v. 19, p. 495-500, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717484>. Acesso em: 13 ago. 2014.

YAN, Z. Q. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. **Circ. Res**, v. 79, n. 1 p. 38-44, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8925566>. Acesso em: 22 out. 2014.

YANG, H. Y.; NEFF, N. H. Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. **J Neurochem**. v. 19, n. 10, p. 2443-50, out. 1972. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 4348982>. Acesso em: 22 out. 2014.

YAU, L.; PINSK, M.; ZAHRADKA, P. Inhibition of RNA synthesis by bradykinin involves both the B_1 and B_2 receptor subtypes. **Arch Biochem Biophys,** n. 328, p. 115-21, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638919>. Acesso em: 25 jan. 2015.

YAU, L. et al. Bradykinin receptor antagonists attenuate neointimal proliferation postangioplasty. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 4, p. H1648-56, out. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557555>. Acesso em: 02 jul. 2015.

YOON, J. et al. Local delivery of nitric oxide from an eluting stent to inhibit neointimal thickening in a porcine coronary injury model. **Yonsei Med J**, v. 43, p. 242-51, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11971219>. Acesso em: 06 jun. 2015.

YUTANI, C. et al. Histologic evidence of foreign body granulation tissue and de novo lesions in patients with coronary stent restenosis. **Cardiology**, v. 92, n. 3, p. 171-7, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10754347>. Acesso em: 21 mar. 2015.

ZEMLIANSKAIA, O. A. et al. Matrix metalloproteinases, C-reactive protein, and markers of thrombinemia in patients with stable angina and restenoses after percutaneous coronary interventions. **Kardiologiia**, v. 44, p. 4-12, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15602433>. Acesso em: 24 abr. 2015.

ZICHE, M. et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. **J. Clin. Invest**, v. 94, n. 5, p. 2036-44, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC294636/>. Acesso em: 10 maio 2015.

ZOURIDAKIS, E. et al. Markers of inflammation and rapid coronary artery disease progression in patients with stable angina pectoris. **Circulation**, v. 110, p. 1747-53, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381646>. Acesso em: 13 jun. 2015.

ANEXOS

ANEXO A

Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo estudo)

Título do estudo: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS COMPONENTES DO SISTEMA DAS CININAS, ÓXIDO NÍTRICO E METALOPROTEINASES COMO MARCADORES NA REESTENOSE PRECOCE DE *STENTS* REVESTIDOS PÓS ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÂNEA PERIFÉRICA.

Nome do investigador principal: Laura de Andrade da Rocha

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP.

Introdução:

Você esta sendo convidado para participar de um estudo de pesquisa clínica que envolve a realização de exames complementares de imagem e a doação de pequenas amostras de sangue.

Este documento descreve o estudo para o qual você esta sendo convidado a participar e o que o estudo envolverá. Leia este documento com cuidado e não hesite em fazer qualquer pergunta a qualquer momento. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não.

Se decidir participar, você receberá uma cópia assinada deste documento para guardar. Ainda, se decidir participar, você pode mudar de idéia em qualquer momento e se retirar do estudo sem dar explicações. Isso não irá afetar o padrão de assistência médica que recebe.

Natureza e objetivo do estudo:

Este estudo de pesquisa clínica esta sendo conduzido por seu médico para avaliar alguns componentes sanguíneos como marcadores na reestenose de *stents* revestidos pós angioplastia percutânea transluminal periférica.

Você está sendo convidado a participar neste estudo de pesquisa clínica porque é portador de doença arterial obstrutiva de membros inferiores (que tem como sigla DAOP) que corresponde a uma doença ocasionada pela arteriosclerose (deposito de gordura nos vasos sanguíneos) o que resulta no entupimento parcial ou total desses vasos, fazendo com que menos oxigênio chegue até a extremidade da perna, podendo ocasionar dor ou feridas que tem dificuldade de cicatrização.

A angioplastia com colocação de *stent* revestidos corresponde a um procedimento no qual é realizada uma punção da artéria do membro inferior acometido pela DAOP com a finalidade de restabelecer uma circulação adequada. Para isso, utiliza-se um balão de angioplastia (para dilatar o vaso) seguido da colocação de *stent* (material que irá manter a perviedade do vaso, impedindo que ele volte a entupir).

Duração do estudo:

A sua participação como voluntário deverá ter a duração máxima de 6 meses.

Procedimentos do estudo:

Marco 0: Você deverá comparecer para internação 1 dia antes do procedimento quando será colhido sangue. Nova amostra de sangue será colhida 24h após a cirurgia.

Marco 6 meses: Você comparecerá novamente após seis meses do procedimento para colher nova amostra sanguínea e ser submetido a seguimento também por exame de imagem (arteriografia e/ou US Doppler arterial).

Riscos e benefícios:

A coleta de sangue se dará nos três momento citados com volume de 20 mililitros em cada coleta. Não haverá risco de contaminação pois os materiais evolvidos na coleta são de uso único e descartáveis. Os riscos da coleta se limitam à lesão local provocada pela agulha de punção comum a qualquer coleta de sangue a exames laboratoriais de rotina.

A realização de arteriografia e US Doppler arterial com 6 meses após a cirurgia serão realizados exclusivamente para o presente estudo mas poderão estabelecer dados importante ao se comparar os dois métodos e talvez possibilitar a utilização do US como método de estudo padrão-ouro ao invés da arteriografia.

A arteriografia consiste no mesmo exame realizado de rotina para todos os pacientes que irão ser submetidos a cirurgia correspondendo a uma punção arterial e realização de imagem, o que poderá ocasionar um pouco de desconforto no momento da anestesia local e da injeção do contraste.

Não se sabe se os dados obtidos com a coleta de sangue irão ajudar a descobrir meios (medicações, etc.) para melhorar ou prevenir a reestenose dos *stent*s revestidos.

É possível que a sociedade possa se beneficiar deste estudo. Existe uma possibilidade de que as informações obtidas neste estudo possam ajudar no desenvolvimento futuro de um novo tratamento para pacientes que sofrem da mesma condição que você.

Custos, não remuneração e compensação:

O estudo não requererá nenhum custo para o paciente quanto a material utilizado. Sua participação neste estudo não será remunerada.

Confidencialidade:

A garantia de sigilo dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras, será assegurada.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária; você não é obrigado a participar. Seu tratamento e relacionamento com seu médico não serão afetados pela sua decisão de participar ou não deste estudo. Caso você se recuse a participar deste estudo, você não será penalizado de nenhuma forma e sua decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual você tem direito.

Outras informações importantes:

O investigador principal deste estudo médico é o Dra. Laura de Andrade da Rocha, que pode ser encontrada no seguinte endereço: Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP – Av. Bandeirantes, 3900 – 9º andar – Departamento de Cirurgia e Anatomia – Campus Universitário – Monte Alegre – CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto/SP e telefone (horário comercial) 16 3602 2593.

1. Eu li ou leram para mim o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo. Recebi todas as explicações sobre a natureza, objetivo, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo, assim como sobre as minhas responsabilidades. As minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente.
2. Concordo em participar do estudo. Concordo em cooperar totalmente com o médico e entrar em contato com ele/ela quando necessário para esclarecimento de dúvidas ou dos próximos passos do estudo.
3. Informei ao médico do estudo sobre todas as minhas doenças e medicações que venho usando, além de informar sobre todas as minhas consultas médicas recentes.
4. Informei também ao medico do estudo sobre qualquer participação minha em outros estudos clínicos no último ano.
5. Entendo que minha participação no estudo é voluntária e que posso me recusar a participar ou posso sair do estudo a qualquer momento. Caso eu me recuse a participar deste estudo, não serei penalizado de nenhuma forma e minha decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual eu tenha direito.
6. Ao assinar este documento autorizo a revisão de meus registros.
7. Receberei uma copia assinada deste consentimento.

Nome do paciente: _____
(a ser preenchido pelo paciente)

Assinatura do paciente:_____ Data:_____
(ou nome e assinatura do representante legal., se aplicável)

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha:_____ Data: _____
(se aplicável)

Investigador / subinvestigador ou pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Confirmo que expliquei pessoalmente a natureza, propósito, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo ao paciente acima mencionado.

Investigador: Dra. Laura de Andrade da Rocha CRM-147.720

Assinatura: _____ Data: _____

Subinvestigador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

ANEXO B

Análise estatística realizada pelo estaticista Marco Aurélio Silva.

Análise entre grupos Sem x Com reestenose	Antes	24 Horas	6 Meses
NO	mann	mann	teste t
MMP2	teste t	teste t	teste t
MMP9	teste t	teste t	teste t
TIMP1	mann	teste t	teste t
TIMP2	mann	mann	mann
CBPM	teste t	mann	teste t
CAPM	mann	mann	mann
CALI_TECID	mann	mann	mann
CALI_PLASM	teste t	mann	teste t
CININASE II	teste t	teste t	teste t

Teste de Shapiro-Wilk para verificar normalidade dos dados.
Teste t para amostras independentes para variáveis com normalidade.
Teste de Mann-Whitney para variáveis com não normalidade.

Análise intra grupos Antes x 24 horas x 6 meses	Sem reestenose	Com reestenose
NO	wilcoxon	teste t
MMP2	teste t	teste t
MMP9	teste t	teste t
TIMP1	teste t	teste t
TIMP2	wilcoxon	teste t
CBPM	teste t	teste t
CAPM	wilcoxon	teste t
CALI_TECID	wilcoxon	teste t
CALI_PLASM	teste t	teste t
CININASE2	teste t	teste t

Teste de Shapiro-Wilk para verificar normalidade dos dados.
Teste t pareado para amostras dependentes para variáveis com normalidade.
Teste de Wilcoxon pareado para amostras dependentes para variáveis com não normalidade.

ANEXO B

	Sem Reestenose			Com Reestenose		
	antes x 24h	**antes x 6m**	**24h x 6m**	**antes x 24h**	**antes x 6m**	**24h x 6m**
NO	0,330	0,855	0,761	0,483	0,176	0,737
MMP2	0,258	0,047 *	0,063	0,619	0,059	0,299
MMP9	0,057	0,497	0,207	0,298	0,334	0,310
TIMP1	0,924	0,023 *	0,019 *	0,353	0,150	0,246
TIMP2	0,426	0,066	0,140	0,318	0,367	0,392
CBPM	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***	0,041 *	0,018 *	0,035 *
CAPM	0,001 ***	0,000 ***	0,000 ***	0,138	0,041 *	0,002 **
CALI_TECID	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***	0,002 **	0,008 **	0,030 *
CALI_PLASM	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***	0,049 *	0,021 *	0,141
CININASE II	0,000 ***	0,000 ***	0,000 ***	0,003 **	0,015 *	0,252

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

	Sem Reestenose versus Com Reestenose		
	Antes	**24 horas**	**6 meses**
NO	0,733	0,495	0,685
MMP2	0,929	0,819	0,581
MMP9	0,377	0,396	0,669
TIMP1	0,453	0,900	0,627
TIMP2	0,152	0,891	0,041 *
CBPM	0,014 *	0,009 **	0,021 *
CAPM	0,426	0,024 *	0,102
CALI_TECID	0,108	0,053	0,214
CALI_PLASM	0,387	0,347	0,483
CININASE II	0,411	0,312	0,506

* p<0,05; ** p<0,01

ANEXO C

VALORES INDIVIDUAIS DO CININOGÊNIO DE ALTO PESO MOLECULAR (CAPM) E BAIXO PESO MOLECULAR (CBPM) DE TODOS OS PACIENTES DO ESTUDO NOS TEMPOS ANTES, 24 HORAS E 6 MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA. UNIDADE: µg equivalentes (Eq) de bradicinina (Bc) / mL plasma.

	AMOSTRAS	**A (Tempo- Antes)**		**B (Tempo – pós 24 horas)**		**C (Tempo- pós 6 meses)**	
		CBPM	**CAPM**	**CBPM**	**CAPM**	**CBPM**	**CAPM**
1	1059298F	1,7	1,2	1,6	1,1	1	0,9
2	0560851B	1,4	1,4	1,3	1,2	0,9	0,8
3	1060796G	1,39	1,1	1,3	0,9	1,02	0,6
4	1007996I	1,9	1,39	1,5	1,2	1,1	0,9
5	1046846I	2,05	1,75	2,1	1,5	2,3	1,6
6	0470208B	2,31	2,01	2	1,8		
7	1057120E	2,65	1,3	2	1,1	1,3	0,9
8	1095953B	2,2	1,3	2	1,2	1,4	0,7
9	1100582E	2,1	1,3	2	1	1,2	0,6
10	0482917K	2,4	1,1	2,1	0,9		
11	0335052G	1,95	1,8	1,8	1,6	1,2	0.9
12	0176126D	2,1	1,8	2	1,6	1.3	1
13	1084235J	2,5	1,2	2,2	1	0,9	0,8
14	0484499F	2,9	1,5	2,3	1,2	2,4	1,3
15	0959120F	2,8	1,5	2,5	1,2	2,7	1,4
16	1136884I	1,9	1,8	1,8	1,5	1,1	1,1
17	1146603C	2,15	0,9	2	0.8	1,3	0,6
18	1010396K	2,5	1,65	2,1	1,4	1,4	1,3
19	1155346J	1,95	1,3	1,8	1,2	1,3	1
20	1144884B	2,8	1,3	2,1	1,1	1	0,8
21	0520872H	2,1	1,1	1,9	1	1,1	0,8
22	1011433H	2	1,8	1,8	1	0,8	0,7
23	1169163K	2,3	1,8	2	1,5	1,12	1,5
24	0605689H	2,2	1,2	2	1		
25	1163328G	2,5	1,5	2,1	1,2	1,5	0,8
26	1164700K	2	1,5	1,9	1,2	2,1	1,4
27	0312927B	2	1,8	1,8	1,4	1,2	1
28	1172100F	2,5	1,6	2,2	1,3		
29	0503256I	2	1,45	1,9	1,2	1,6	1
30	0573416D	2,1	1,23	2	1	1,1	0,7
31	0460805I	2,4	1,4	2,2	1,1		
32	453248G	2,2	1,3	2	1,1	1,2	0,8
33	1188861K	2,4	1,5	2	1,4		
34	1204382H	2,5	1,6	2,2	1,2	1,5	0,9
35	1205898G	2,5	1,3	2,2	1,2	1,4	0,8
36	0620979A	2,4	1,4	2,1	1,2	1,3	0,9
37	0037062D	2,5	1,5	2,2	1,3	1,2	1
38	1209305D	2,2	1,2	2	1,3	1	0,9

Pacientes excluídos do estudo Pacientes que evoluíram com trombose do *stent*

ANEXO D

VALORES INDIVIDUAIS DA CALICREÍNA PLASMÁTICA (CAL P) E TECIDUAL (CAL T) DE TODOS OS PACIENTES DO ESTUDO NOS TEMPOS ANTES, 24 HORAS E 6 MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA COM *STENT* REVESTIDO. UNIDADE: µM pNa/ mL plasma (CAL T); U/mL plasma (CAL P)

	AMOSTRAS	**A (Tempo- Antes)**		**B (Tempo – pós 24 horas)**		**C (Tempo- pós 6 meses)**	
		PLASMÁTICA	**TECIDUAL**	**PLASMÁTICA**	**TECIDUAL**	**PLASMÁTICA**	**TECIDUAL**
1	1059298F	2.40	2.05	2	1.9	1.8	1.7
2	0560851B	2.10	2.21	1.9	2	1.7	1.8
3	1060796G	1.95	2.05	1.5	1,8	1.5	1.7
4	1007996I	2.30	2.29	2.1	2	1.8	1.6
5	1046846I	2.50	1.61	2	1.5	2.4	1.9
6	0470208B	2.50	2.23	2,3	2		
7	1057120E	3.05	1.87	2,5	1.6	2	1.5
8	1095953B	2.70	1.53	2,1	1.4	1.8	1.4
9	1100582E	2.30	1.53	1.9	1.4	1.7	1.3
10	0482917K	2.80	2.16	1.9	2		
11	0335052G	2.30	1.69	1.8	1.5	1.7	1.4
12	0176126D	2.50	1.87	1.9	1.6	1.6	1.5
13	1084235J	2.50	1.68	1.9	1.4	1.8	1.4
14	0484499F	3.15	1.78	1.9	1.4	2.4	1.6
15	0959120F	2.90	1.90	2.1	1.5	2.4	1.7
16	1136884I	2.50	1,7	1.9	1.5	1.7	1.4
17	1146603C	2.40	2,9	2.1	2	2	1.8
18	1010396K	2.70	2,3	2.1	2	1.8	1.7
19	1155346J	3.05	1,8	2.5	1.6	2	1.4
20	1144884B	2.90	1,9	2.2	1.5	1.8	1.4
21	0520872H	2.30	1,7	1.8	1.5	1.7	1.3
22	1011433H	2.90	2	1.9	1.8	1.8	1.5
23	1169163K	2.20	1,5	1.8	1.4	1.6	1.4
24	0605689H	2.40	2	1.9	1.4		
25	1163328G	2.10	1,7	1.7	1.5	1.5	1.4
26	1164700K	1.95	1,4	1.5	1	2	1.5
27	0312927B	2.30	1,42	1.8	1.2	1.6	1
28	1172100F	2.50	2	2	1.5		
29	0503256I	2.60	1,55	1.9	1.3	1.7	1.3
30	0573416D	2.50	1,71	1.8	1.5	1.5	1.4
31	0460805I	3.05	1,69	1.9	1.4		
32	453248G	2.70	2,01	2	1.5	1.7	1.5
33	1188861K	2.30	1,89	1.9	1.5		
34	1204382H	2.90	1,8	1.9	1.5	1.9	1.4
35	1205898G	2.20	1,9	1.8	1.4	1.7	1.4
36	0620979A	2.40	1,7	2	1.5	1.9	1.3
37	0037062D	2.10	2	1.8	1.5	1;7	1.2
38	1209305D	2.30	1,5	2	1.6	1.9	1.3

Pacientes excluídos do estudo Pacientes que evoluíram com trombose do *stent*

ANEXO E

VALORES INDIVIDUAIS DA CININASE II DE TODOS OS PACIENTES NOS TEMPOS ANTES, 24 HORAS E 6 MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA COM *STENT* REVESTIDO. UNIDADE: nmoles His-Leu/ml/min

	AMOSTRAS	**A (Tempo- Antes)**	**B (Tempo – pós 24 horas)**	**C (Tempo- pós 6 meses)**
1	1059298F	1,6	1,8	2
2	0560851B	1,2	1,7	1,9
3	1060796G	1,4	1,9	2,2
4	1007996I	1	1,4	1,5
5	1046846I	1	1,3	0,9
6	0470208B	1,2	1,4	
7	1057120E	1,2	1,5	1,6
8	1095953B	1,1	1,4	1,7
9	1100582E	1,2	1,5	1,7
10	0482917K	1	1,3	
11	0335052G	1,6	2,1	2,2
12	0176126D	1,1	1,5	1,7
13	1084235J	1,2	1,65	1,8
14	0484499F	1,3	1,2	1
15	0959120F	1	1,3	0,8
16	1136884I	0,9	1,25	1,3
17	1146603C	0,9	1,3	1,5
18	1010396K	0,8	1,01	1,2
19	1155346J	1,2	1,6	1,7
20	1144884B	1	1,25	1,3
21	0520872H	1,1	1,4	1,4
22	1011433H	1,5	2	2
23	1169163K	1,4	1,9	2
24	0605689H	0,8	1	
25	1163328G	0,9	1,05	1,2
26	1164700K	1,3	1,89	1,2
27	0312927B	1	1,15	1
28	1172100F	1	1,2	
29	0503256I	1,3	1,9	2
30	0573416D	1,4	1,8	2
31	0460805I	1,2	1,5	
32	453248G	1,3	2	2,1
33	1188861K	1,3	1,8	
34	1204382H	1	1,4	1,6
35	1205898G	1	1,3	1,5
36	0620979A	1,2	1,4	1,6
37	0037062D	1,1	1,5	1,6
38	1209305D	1,1	1,4	1,8

Pacientes excluídos do estudo Pacientes que evoluíram com trombose do *stent*

ANEXO F

VALORES INDIVIDUAIS DOS NITRITOS E NITRATOS DE TODOS OS PACIENTES NOS TEMPOS ANTES, 24 HORAS E 6 MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA COM *STENT* REVESTIDO. UNIDADE: micromolar (µM).

	AMOSTRAS	**A (Tempo- Antes)**	**B (Tempo – pós 24 horas)**	**C (Tempo- pós 6 meses)**
1	1059298F	41.25	42.94	15.25
2	0560851B	25.50	33.09	34.69
3	1060796G	34.46	34.75	30.98
4	1007996I	23.14	24.05	31.01
5	1046846I	19.30	16.05	14.79
6	0470208B			
7	1057120E	12.65	16.07	45.14
8	1095953B	32.94	27.01	43.72
9	1100582E	17.38	11.48	25.35
10	0482917K			
11	0335052G	19.60	19.62	23.39
12	0176126D	24.20	17.89	23.56
13	1084235J	21.46	44.22	35.83
14	0484499F	18.20	23.46	27.79
15	0959120F	38.02	50.92	47.04
16	1136884I	24.81	15.20	28.67
17	1146603C	16.09	34.78	27.93
18	1010396K	33.53	26.70	24.21
19	1155346J	16.81	17.55	17.72
20	1144884B	33.35	62.54	25.14
21	0520872H	19.87	16.49	28.69
22	1011433H	15.20	30.61	22.21
23	1169163K	15.94	9.46	14.33
24	0605689H			
25	1163328G	20.38	22.05	12.80
26	1164700K	24.51	7.39	19.42
27	0312927B	51.99	82.42	26.69
28	1172100F			
29	0503256I	18.13	16.40	9.99
30	0573416D	16.17	10.49	44.69
31	0460805I			
32	453248G	20.94	13.34	11.04
33	1188861K			
34	1204382H	120.89	79.89	41.95
35	1205898G	23.15	14.05	20.86
36	0620979A	9.56	15.66	11.92
37	0037062D	37.30	27.09	48.75
38	1209305D	48.75	24.07	10.37

Pacientes excluídos do estudo Pacientes que evoluíram com trombose do *stent*

ANEXO G

VALORES INDIVIDUAIS DAS METALOPROTEINASES 2 (MMP-2) E 9 (MMP-9) DE TODOS OS PACIENTES NOS TEMPOS ANTES, 24 HORAS E 6 MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA COM *STENT* REVESTIDO. UNIDADE: Unidades Arbitrárias

	AMOSTRAS	**A (Tempo- Antes)**		**B (Tempo – pós 24 horas)**		**C (Tempo- pós 6 meses)**	
		MMP-2	**MMP-9**	**MMP-2**	**MMP-9**	**MMP-2**	**MMP-9**
1	1059298F	0,19514	1,18766	0,19514	1,69172	0,21328	1,49683
2	0560851B	0,27756	1,52333	0,34995	1,62592	0,41141	1,52885
3	1060796G	0,38881	1,67312	0,30643	2,03883	0,37774	1,34556
4	1007996I	0,41757	1,47920	0,33605	1,55667	0,27847	1,46924
5	1046846I	0,97874	1,47638	1,22317	1,63557	0,97972	2,08425
6	0470208B	0,31952	1,50020	0,25170	1,47203		
7	1057120E	1,68556	1,37516	1,67865	1,43984	1,51319	1,04239
8	1095953B	1,49158	1,25939	1,44521	1,46580	1,16465	1,63293
9	1100582E	1,17162	1,79457	1,34584	1,73498	1,04348	1,66317
10	0482917K	1,09573	1,69882	1,81755	1,52563		
11	0335052G	4,21847	0,84170	4,56933	0,82668	4,49205	0,85971
12	0176126D	3,22115	0,95684	4,43452	1,11669	6,06372	0,85688
13	1084235J	4,61321	0,85869	4,79538	0,86355	4,96196	0,80039
14	0484499F	4,05370	0,77628	5,84148	0,66690	3,76349	0,61609
15	0959120F	2,64204	0,70679	2,26204	0,89985	2,00029	0,87932
16	1136884I	3,23894	0,83542	3,01966	1,09797	4,15413	1,03149
17	1146603C	2,66132	0,58265	2,72737	0,72363	2,36728	1,03149
18	1010396K	3,09981	0,99484	3,38405	0,95911	3,13544	1,00409
19	1155346J	3,46135	0,58722	3,84231	0,51394	4,34140	0,40527
20	1144884B	3,46243	0,49616	3,27819	0,53529	4,28201	0,47834
21	0520872H	4,01161	0,47154	4,12089	0,49730	3,79080	0,47002
22	1011433H	3,63344	0,47623	3,58731	0,44851	3,48400	0,45187
23	1169163K	2,05593	0,29882	1,88183	0,33072	2,68982	0,63706
24	0605689H	4,01085	0,70755	4,78009	0,75963		
25	1163328G	3,25311	0,36776	3,01511	0,31305	3,45718	0,28772
26	1164700K	3,34582	0,27824	3,51190	0,25563	3,39588	0,25254
27	0312927B	2,81485	0,17649	2,43461	0,23097	2,49219	0,23768
28	1172100F	2,87516	0,80861	2,67412	0,77692		
29	0503256I	2,12585	0,33456	2,29543	0,41508	2,02796	0,28462
30	0573416D	2,09115	0,34108	1,46702	0,30619	1,58931	0,22465
31	0460805I	1,72135	0,34174	1,33494	0,13524		
32	453248G	1,55851	0,24620	1,50620	0,16333	2,13655	0,22574
33	1188861K	2,14847	0,11887	2,55957	0,13651		
34	1204382H	1,39204	0,46909	1,42826	0,28879	1,48695	0,41720
35	1205898G	0,56541	0,53901	0,92149	1,05839	0,94872	1,18603
36	0620979A	0,72497	1,78531	0,77287	1,86016	0,68240	1,46201
37	0037062D	0,27151	0,90487	0,77154	0,72543	0,61264	0,68167
38	1209305D	0,77026	0,89831	0,97578	1,36098	1,21524	1,12177

Pacientes excluídos do estudo Pacientes que evoluíram com trombose do *stent*

ANEXO H

VALORES INDIVIDUAIS DOS INIBIDORES DAS METALOPROTEINASES 1 (TIMP-1) E 2 (TIMP-2) DE TODOS OS PACIENTES NOS TEMPOS ANTES, 24 HORAS E 6 MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA COM *STENT* REVESTIDO. UNIDADE: ng/ml

	AMOSTRAS	A (Tempo- Antes)		B (Tempo – pós 24 horas)		C (Tempo- pós 6 meses)	
		TIMP-1	TIMP-2	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-1	TIMP-2
1	1059298F	4,721	4,301	4,237	3,983	4,602	4,622
2	0560851B	4,641	4,283	4,653	4,301	4,506	3,946
3	1060796G	4,484	3,43	4,091	3,525	4,327	3,416
4	1007996I	4,253	3,159	3,471	9,236	2,437	2,993
5	1046846I	4,727	7,307	3,471	6,686	4,773	6,923
6	0470208B	0,83	3,025	3,415	3,405		
7	1057120E	4,512	6,72	4,484	6,338	0,04	6,555
8	1095953B	4,439	6,821	3,97	6,213	4,247	6,252
9	1100582E	4,172	6,415	3,451	12,811	2,22	6,204
10	0482917K	3,29	3,73	3,215	3,31		
11	0335052G	5,047	7,439	4,877	7,376	4,871	7,625
12	0176126D	4,647	6,816	4,658	7,742	4,373	6,657
13	1084235J	4,373	6,72	3,949	6,584	4,123	6,425
14	0484499F	4,698	6,146	3,353	6,845	2,212	6,329
15	0959120F	2,4	3,185	2,91	2,905	3,405	2,889
16	1136884I	1,765	3,75	2,965	3,415	2,465	4,285
17	1146603C	3,685	3,13	4,565	3,04	2,94	3,57
18	1010396K	3,225	3,14	3,06	3,42	3,03	4,26
19	1155346J	1,785	3,54	1,735	2,825	1,8	3,385
20	1144884B	5,16	3,19	3,2	3,225	3,105	3,76
21	0520872H	4,48	2,89	3,11	3,385	2,975	3,2
22	1011433H	3,165	2,135	3,83	2,405	3,13	2,695
23	1169163K	1,92	2,605	2,39	2,575	1,77	2,815
24	0605689H	2,86	3,27	2,815	3,01		
25	1163328G	3,59	3,4	3,225	3,865	3,165	4,215
26	1164700K	2,07	3,07	2,63	4,065	3,36	3,115
27	0312927B	4,065	3,485	5,61	2,855	3,04	2,795
28	1172100F	2,6	3,49	2,71	3,995		
29	0503256I	0,303	3,265	1,465	3,67	1,4	3,165
30	0573416D	2,08	2,565	2,77	3,755	2,2	2,72
31	0460805I	3,93	2,205	5,575	3,105		
32	453248G	2,13	3,42	2,725	3,185	2,93	4,62
33	1188861K	1,83	2,765	1,91	2,895		
34	1204382H	5,285	2,84	4,985	3,235	3,32	6,035
35	1205898G	3,225	3,17	1,98	4,045	1,46	3,055
36	0620979A	3,115	2,59	3,105	2,87	2,97	4,24
37	0037062D	2,72	3,335	2,63	2,97	3,265	3,03
38	1209305D	4,055	2,825	5,575	3,35	3,365	4,48

Pacientes excluídos do estudo Pacientes que evoluíram com trombose do *stent*

ANEXO I

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

UPC HCFMRP - USP

www.hcrp.fmrp.usp.br

HC USP - RIBEIRÃO assistência - ensino - pesquisa

PROJETO DE PESQUISA

Ribeirão Preto, 09 de outubro 20 12.

Sistema UPC nº 6005

Ilustríssima Senhora
Dr.ª Marcia Guimarães Villanova
MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Senhora Coordenadora,
Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS COMPONENTES DO SISTEMA DAS CININAS, ÓXIDO NÍTRICO E METALOPROTEINASES COMO MARCADORES NA RESTENOSE DOS STENTS REVESTIDOS PÓS ANGIOPLASTIA PERCUTÂNEA TRANSLUMINAL CORONÁRIA

juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.
O projeto acima mencionado será desenvolvido no (a) DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

Informo também que o pesquisador responsável e o orientador possuem currículo Lattes.
O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi APROVADO.

Equipe Técnica UPC
André Oliveira
Auxiliar de Trabalho Científico
Matrícula 5148

Atenciosamente,

Laura de Andrade da Rocha
Pesquisador Principal ou Aluno (nome completo e assinatura)

Edmond de Edmar Javidan
Pesquisador Principal ou Orientador (nome completo e assinatura)

De acordo:

Chefe de Departamento (assinatura e carimbo)
Prof. Dr. ORLANDO DE CASTRO E SILVA JR.
Professor Titular
Chefe do Departamento de Cirurgia e Anatomia

Chefe do Ambulatório/ Laboratório (assinatura e carimbo)
Prof. Dr. Paulo Roberto B. Evora
Cirurgia Cardiovascular e Torácica

Obs.: Caso algum chefe possua vinculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.
Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

ANEXO J

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS COMPONENTES DO SISTEMA DAS CININAS, ÓXIDO NÍTRICO E METALOPROTEINASES COMO MARCADORES NA REESTENOSE DE STENTS REVESTIDOS PÓS ANGIOPLASTIA PERCUTÂNEA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA

Pesquisador: LAURA DE ANDRADE DA ROCHA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 10765813.2.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 300.238

Data da Relatoria: 22/05/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se estudo transversal, prospectivo, em uma única instituição, para avaliação dos componentes do sistema das cininas
(cininogênios, calicreínas e cininase II), NO e metaloproteinases no sangue de pacientes com reestenose de stents revestidos e indivíduos normais, e associar tais parâmetros a possíveis métodos que auxiliem no diagnóstico clínico.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é melhor entender aspectos relacionados à atividade inflamtória que medeia e é causa da re-estenose de artérias de pacientes submetidos à colocação de "stent" para tratamento de doença arterial obstrutiva crônica.Proceder-se-a análise dos componentes do sistema das cininas (cininogênios, calicreínas e cininase II), NO e metaloproteinases no sangue de pacientes com reestenose de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

stents revestidos e indivíduos normais, e associar tais parâmetros a possíveis métodos que auxiliem no diagnóstico clínico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
já descritos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Já avaliados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
A nova versão do termo de consentimento livre e esclarecido atende as solicitações formuladas na análise da última versão enviada a este comitê de Ética. Atende as normas d 196/96 da CNS.

Recomendações:
Já feitas e atendidas

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Projeto de pesquisa aprovado, assim como o TCLE com Data da modificação : 21/05/2013.

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:
Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

RIBEIRAO PRETO, 11 de Junho de 2013

Assinador por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br