UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CÉSAR PRESTO CAMPOS

Estudo da perviedade e do perfil sérico de marcadores inflamatórios com uso de *stents*
impregnados de carbono no território vascular periférico

RIBEIRÃO PRETO

2018

CÉSAR PRESTO CAMPOS

**Estudo da perviedade e do perfil sérico de marcadores inflamatórios com uso de *stents*
impregnados de carbono no território vascular periférico**

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

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Edwaldo Edner Joviliano

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

Campos, César Presto.

Estudo da perviedade e do perfil sérico de marcadores inflamatórios com uso de *stents* impregnados de carbono no território vascular periférico/ César Presto Campos; orientador Edwaldo Edner Joviliano -- Ribeirão Preto, 2018.

138 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. 4. *Stent*. 5. Carbono.

Nome: CAMPOS, César Presto

Título: Estudo da perviedade e do perfil sérico de marcadores inflamatórios com uso de *stents* impregnados de carbono no território vascular periférico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica 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: _____

Dedico este trabalho, com admiração e inestimável gratidão, à minha amada esposa, Mariela, e à minha querida filha, Leticia, por todo amor, compreensão e incansável apoio na realização de todas as etapas desta obra.

Dedico também aos meus pais, Carlos Arruda Campos e Aparecida I. Presto Campos, por terem me dado todas as condições de estudo possíveis, sem as quais não teria concretizado este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua proteção e por guiar minhas decisões.

Aos meus professores, Prof. Dr. Carlos Eli Piccinato, Prof. Dr. Edwaldo Edner Joviliano, Prof. Dr. Maurício Serra Ribeiro, Prof. Dr. Jesualdo Cherri e Prof. Dr. Takachi Moriya, pela orientação, ensinamentos e apoio, contribuindo, todos esses anos, não só para meu crescimento científico e intelectual, mas também para minha formação ética e moral perante os pacientes e colegas de profissão.

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

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 Dra. Laura Rocha e ao Dr. Thiago Guimarães, pela contribuição e auxílio na dissertação deste trabalho.

Aos residentes do HCRP, em especial ao Dr. Rafael, Dr. André, Dr. Fernando, Dra. Thaís Lye, Dra. Thaís Duailibi e Dra. Natália, pelo auxílio na coleta dos dados.

Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia e suas secretárias, em especial à Juliana, pela sua disponibilidade e dedicação.

Aos pacientes que consentiram em participar deste trabalho, sem os quais ele não poderia ter sido concretizado.

Às minhas irmãs, pelo apoio.

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

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA).

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

A Coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte.

Albert Einstein (1879 - 1955)

RESUMO

Campos C.P. **Estudo da perviedade e do perfil sérico de marcadores inflamatórios com uso de *stents* impregnados de carbono no território vascular periférico.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: Um dos fatores mais comuns de falha do procedimento das angioplastias vasculares periféricas é a estenose recorrente (reestenose). A inflamação vascular após angioplastia e implante de *stent* desempenha papel importante na proliferação de células do músculo liso vascular e posterior crescimento de neointima hipertrófica. Diversos estudos têm sugerido que a superfície dos *stents*, quando impregnada com determinadas moléculas, pode limitar a reestenose de forma eficaz. O carbono diamante, polímero de hidrocarboneto amorfo, pode ser usado para essa finalidade, reduzindo liberação de íons metálicos e a trombogenicidade. Diversos mediadores têm sido implicados na resposta inflamatória vascular, como o sistema calicreína-cinina (SCC), as citocinas, proteína C reativa (PCR) e o óxido nítrico (NO). Portanto, estudos clínicos específicos correlacionando o implante do *stent* aos níveis séricos destes possíveis marcadores podem contribuir no entendimento desse processo. **Objetivo:** Estudar a perviedade do dispositivo e a evolução clínica de doentes submetidos a angioplastia com *stents* impregnados de carbono no território vascular periférico, assim como o comportamento de mediadores séricos envolvidos nas fases mais precoces do processo inflamatório pós angioplastia. **População e Método:** Estudo prospectivo envolvendo 32 pacientes submetidos à angioplastia com *stent* no segmento ilíaco-fêmoro-poplíteo, selecionados no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do HCFMRP/USP. Foram tratadas lesões estenosantes ou oclusivas com angioplastia e colocação de *stents* de nitinol, com superfície impregnada de carbono (Carbostent®). Foram estudados os seguintes marcadores: SCC – com quantificação dos substratos (cininogênio de alto e baixo peso molecular – CAPM / CBPM) e das enzimas calicreína plasmática e tecidual, além da quantificação da cininase II; a determinação dos níveis de nitrito e nitratos para a avaliação de óxido nítrico; dosagem sérica de PCR e citocinas (IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alfa e TGF-beta). Também foi realizado a dosagem dos leucócitos. Amostras séricas foram coletadas antes, 24 horas e 6 meses após o implante do *stent*. Os pacientes foram seguidos por um ano, para avaliação da perviedade nesse período. **Resultados:** Dos 27 pacientes que completaram seis meses de estudo, houve apenas uma reestenose (3,7%) e nenhuma oclusão (96,3% de perviedade). No período de um ano, quatro pacientes perderam seguimento e todos os 23 doentes avaliados, mantiveram a perviedade dos *stents*, com exceção do paciente no qual houve reestenose no tempo seis meses. Houve redução significativa das concentrações das citocinas inflamatórias (IL-1 beta, IL-6, IL-8 e TNF- α) no tempo 24 horas e seis meses quando comparado com o pré-procedimento ($p<0,05$); exceto a IL-8 no tempo 24 horas. As citocinas anti-inflamatórias (IL10 e TGF-beta) comportaram-se de maneira antagônica, com elevação do TGF-beta no tempo 24 horas e elevação, tanto do TGF-beta quanto da IL-10, no tempo 6 meses versus pré-tratamento e 6 meses versus 24 horas ($P<0,05$). A PCR apresentou queda no tempo seis meses em relação ao tempo 24h ($p<0,05$). Os níveis de NO não se alteraram entre os tempos; os de leucócitos elevaram-se no tempo 24 horas e reduziram-se no tempo seis meses em relação ao tempo 24 horas ($p<0,05$). **Conclusão:** No presente estudo a taxa de reestenose precoce foi de 3,7% nos primeiros 6 meses e 5% em 12 meses de seguimento. O comportamento dos marcadores inflamatórios evidenciou sua correlação direta com o processo de angioplastia e implante de *carbostent*, em especial o SCC, as citocinas, PCR e os leucócitos. Contudo, não foi possível relacionar a variação dos seus níveis séricos com o processo de reestenose.

Palavras-chave: Reestenose. Angioplastia periférica. Hiperplasia intimal. *Stent*. Carbono.

ABSTRACT

Campos, CP. **Study of the patency and serum profile of inflammatory markers with the use of carbon impregnated stents in the peripheral vascular territory.** Thesis (PhD) - Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Background: One of the most common factors of failure of the peripheral vascular angioplasty procedure is recurrent stenosis (restenosis). Vascular inflammation following angioplasty and stent implantation plays an important role in vascular smooth muscle cell proliferation and subsequent hypertrophic neointimal growth. Several studies have suggested that the surface of stents, when impregnated with certain molecules, can limit restenosis effectively. Diamond carbon, amorphous hydrocarbon polymer, can be used for this purpose, reducing release of metal ions and thrombogenicity. Several mediators have been implicated in the vascular inflammatory response, such as the kallikrein-kinin system (SCC), cytokines, C-reactive protein (CRP) and nitric oxide (NO). Therefore, specific clinical studies correlating stent implantation with serum levels of these possible markers may contribute to the understanding of this process. **Objective:** To study the patency of the device and the clinical evolution of patients undergoing angioplasty with carbon-impregnated stents in the peripheral vascular territory, as well as the behavior of serum mediators involved in the earlier stages of the inflammatory process after angioplasty. **Population and Method:** Prospective study involving 32 patients submitted to angioplasty with stent in the iliac-femoro-popliteal segment, selected at the HCFMRP / USP Outpatient Vascular and Endovascular Outpatient Clinic. Stenosis or occlusive lesions were treated with angioplasty and placement of nitinol stents with a carbon impregnated surface (Carbostent®). The following markers were studied: SCC - with quantification of substrates (high and low molecular weight cininogens - HMWC / LMWC) and plasma and tissue kallikrein enzymes, besides quantification of kininase II; determination of nitrite and nitrate levels for the evaluation of nitric oxide; serum levels of CRP and cytokines (IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-a and TGF-b). Leucocytes were also dosed. Serum samples were collected before, 24 hours and 6 months after stent implantation. The patients were followed for one year to assess the patency in this period. **Results:** Of the 27 patients who completed six months of study, there was only one restenosis (3.7%) and no occlusion (96.3% of patency). In one year, four patients lost follow-up and all 23 patients evaluated, maintained stent patency, with the exception of the patient who had restenosis over time for six months. There was a significant reduction in the concentrations of inflammatory cytokines (IL-1 b, IL-6, IL-8 and TNF-a) in the time 24 hours and six months when compared with the pre-procedure ($p < 0.05$); except for IL-8 in the 24 hour time. Anti-inflammatory cytokines (IL10 and TGF-b) behaved in an antagonistic manner, with TGF-b elevation in the 24 hour time and elevation of both TGF-b and IL-10, at 6 months versus pre- treatment and 6 months versus 24 hours ($P < 0.05$). CRP showed a decrease in time six months in relation to time 24h ($p < 0.05$). NO levels did not change between the times; the leukocytes increased in time 24 hours and reduced in time six months in relation to time 24 hours ($p < 0.05$). **Conclusion:** In the present study, the rate of early restenosis was 3.7% in the first 6 months and 5% in 12 months of follow-up. The behavior of the inflammatory markers showed its direct correlation with the angioplasty and carbostent implantation process, especially SCC, cytokines, CRP and leukocytes. However, it was not possible to relate the variation of their serum levels to the restenosis process.

Key words: Restenosis. Peripheral angioplasty. Intimal hyperplasia. Stent. Carbon.

LISTA DE FIGURAS

Quadro I – Classificação de Fontaine e Rutherford	22
Quadro II – Classificação TASC II para território fêmoro-poplíteo	23
Quadro III – Classificação TASC II para território aorto-iliaco	24
Figura 1 – Cortes histológicos transversais de carótidas de ratos (A e C) e de artérias ilíacas externas de coelhos (B e D).....	26
Figura 2 - Microfotografias transversais de artérias ilíacas de cães pós <i>stent</i>	28
Figura 3 – Diagrama esquemático do sistema calicreína-cininas (SCC)	31
Figura 4 – Representação esquemática demonstrando o papel da ECA na fisiopatologia da hiperplasia intimal e ressaltando os efeitos no endotélio vascular e no músculo liso vascular	35
Figura 5 – Síntese de óxido nítrico na célula endotelial.....	36
Figura 6 – Organograma ilustrando a distribuição e perviedade dos pacientes por grupo experimental nos seis meses iniciais	61
Figura 7 – Organograma ilustrando a distribuição e perviedade dos pacientes por grupo experimental nos 12 meses iniciais	62
Figura 8 – Curva de Kaplan-Meier da sobrevida livre de reestenose/oclusão dos <i>stents</i> em função do tempo após a angioplastia e implante de <i>stent</i> com superfície impregnada de carbono: representação da perviedade do dispositivo	62
Figura 9 – Idade dos pacientes do estudo no momento da angioplastia (ATP) com <i>stent</i> impregnado de carbono(carbostent)	63
Figura 10 – Índice tornozelo-braquial (ITB) em pacientes antes, 24h e seis meses após angioplastia periférica transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	66
Figura 11 – Imagens angiográficas e Doppler do segmento fêmoro-poplíteo	67
Figura 12 – Imagens angiográficas e Doppler de segmento ilíaco do membro inferior direito.....	68
Figura 13 – Imagens angiográficas de do segmento fêmoro-poplíteo em membro inferior esquerdo.....	69

Figura 14 – Atividade da IL-1 β , medida em pg/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	71
Figura 15 – Atividade da IL-6, medida em pg/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	72
Figura 16 – Atividade da IL-8, medida em pg/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	72
Figura 17 – Atividade de TNF- α , medida em pg/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	73
Figura 18 – Atividade da IL-10, medida em pg/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	73
Figura 19 – Atividade da TGF- β , medida em pg/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	74
Figura 20 – Atividade do CAPM medida em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	77
Figura 21 – Atividade do CBPM medida em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	77
Figura 22 – Atividade da calicreína plasmática, medida em U/ml plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	79
Figura 23 – Atividade da calicreína tecidual, medida em μ M pNa/ mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	80
Figura 24 – Atividade da cininase II em μ M His-Leu U/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	82
Figura 25 – Atividade do óxido nítrico representado pela concentração de nitritos/nitratos medida em micromolar (μ M/ml), antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	83
Figura 26 – Atividade da PCR em mg/dl plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	85
Figura 27 – Atividade dos Leucócitos em mg/dl plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com <i>carbostent</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Os efeitos terapêuticos de óxido nítrico sobre a hiperplasia intimal	38
Tabela 2 – Idade dos pacientes expressa em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, no momento da angioplastia transluminal percutânea + <i>carbostent</i> ..	63
Tabela 3 – Características demográficas e clínicas	64
Tabela 4 – Classificação e agrupamento de acordo com o tipo de isquemia com base na classificação de Rutherford e TASC II.....	64
Tabela 5 – Relação entre o tipo de lesão inicial e o comprimento do <i>stent</i> utilizado.....	65
Tabela 6 – Índice tornozelo-braquial (ITB) expresso em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + <i>carbostent</i> (C)	65
Tabela 7 – Citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) em pg/ml plasma, expressas em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + <i>carbostent</i> (C).....	70
Tabela 8 – Citocinas (TNF- α , IL-10 e TGF- β) em pg/ml plasma, expressas em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + <i>carbostent</i> (C).....	71
Tabela 9 – Teste de comparações das médias das citocinas nos diferentes tempos – antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + <i>carbostent</i> (C)...	75
Tabela 10 – Cininogênio de alto peso molecular (CAPM) e de baixo peso molecular (CBPM), em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, expressos em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + <i>carbostent</i> (C)	76
Tabela 11 – Teste de comparações das médias dos cininogênios nos diferentes tempos – antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + <i>carbostent</i> (C)	78
Tabela 12 – Calicreína plasmática e calicreína tecidual, em U/ml plasma, expressas em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + <i>carbostent</i>	79
Tabela 13 – Teste de comparações das médias das calicreínas nos diferentes tempos – antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + <i>carbostent</i> (C)	80

Tabela 14 – Cininase II em μM His-Leu U/mL plasma, expressa em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* 81

Tabela 15 – Teste de comparações das médias da cininase II nos diferentes tempos – antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C)... 82

Tabela 16 – NO, representado pela concentração de nitritos/nitratos medida em micromolar (μM) expresso em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent*. 83

Tabela 17 – Teste de comparações das médias de NO nos diferentes tempos, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C) 84

Tabela 18 – PCR em mg/dl plasma, expressa em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea e implante de *carbostent* (C) 84

Tabela 19 – Teste de comparações das médias de PCR nos diferentes tempos, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C). 85

Tabela 20 – Leucócitos em mg/dl plasma, expressos em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea e implante de *carbostent* (C). 86

Tabela 21 – Teste de comparações das médias de leucócitos nos diferentes tempos, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C)... 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
Ang	Angiotensina
<i>anti-IgG</i>	<i>anti-Imunoglobulina G</i>
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 Cálcio
CAPM	Cininogênio de alto peso molecular
Cat	Categoria
CBPM	Cininogênio de baixo peso molecular
CML	Célula muscular lisa
CPM	Carboxipeptidase M
CPN	Carboxipeptidase N
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DP	Desvio padrão
ECA	Enzima conversora de angiotensina
<i>EDAS</i>	<i>Electrophoresis Documentation and Analysis System</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
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 Nítrico 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	<i>o</i> -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	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Aterosclerose	21
2.2 Angioplastia e uso de <i>stents</i>	22
2.3 <i>Stents</i> impregnados de carbono	27
2.4 Marcadores séricos	29
2.4.1 Sistema caliceína-cinina.....	29
2.4.2 Óxido nítrico (NO)	35
2.4.3 Citocinas	41
2.4.4 Proteína C reativa	44
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
4 POPULAÇÃO E MÉTODO	50
4.1 População	50
4.2 Método.....	51
4.2.1 Descrição do dispositivo.....	51
4.2.2 Realização do procedimento e liberação do dispositivo.....	51
4.2.3 Acompanhamento pós-operatório.....	52
4.2.4 Coleta do material.....	52
4.2.5 Análise laboratorial.....	53
4.2.5.1 Óxido nítrico (nitritos e nitratos).....	53
4.2.5.2 Citocinas	54
4.2.5.3 Cininogênios.....	55
4.2.5.4 Caliceína plasmática.....	56
4.2.5.5 Caliceína tecidual	57
4.2.5.6 Cininase II ou ECA (enzima conversora de angiotensina).....	58
4.2.5.7 Proteína C Reativa (PCR).....	58
4.2.5.8 Hemograma	59
4.3 Análise estatística	59

5 RESULTADOS	61
5.1 Caracterização da população	61
5.1.1 Dados clínicos	61
5.2 Dosagens dos marcadores inflamatórios	70
5.2.1 Citocinas	70
5.2.2 Sistema caliceínas-cininas	76
5.2.2.1 Cininogênios	76
5.2.2.2 Caliceínas	78
5.2.2.3 Cininase II	81
5.2.3 Nitritos e nitratos – NO	83
5.2.4 Proteína C Reativa (PCR)	84
5.2.5 Leucócitos	86
 6 DISCUSSÃO	 89
 7 CONCLUSÃO	 99
7.1 Conclusão geral	99
7.2 Conclusões específicas	99
 REFERÊNCIAS	 101
 ANEXOS	 129

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. Um dos fatores mais comuns de falha do procedimento é a estenose recorrente (reestenose) que ocorre numa parcela significativa dos pacientes: acima de 60% nos primeiros 12 meses (GALLINO et al., 1984; KREPEL et al., 1985; MACA et al., 1996; MINAR et al., 1998; CEJNA et al., 2001; EXNER et al., 2001; SCHILLINGER et al., 2001).

Novos designs de *stents* estão sendo constantemente desenvolvidos, não só para melhorar flexibilidade, resistência mecânica e perfil dos dispositivos, mas também para melhorar a biocompatibilidade de sua superfície, na tentativa de diminuir a resposta inflamatória e superar o problema de reestenose, atribuído ao remodelamento negativo e formação de neointima hipertrófica. Nesse contexto, foram desenvolvidos os *stents* impregnados de carbono, que promovem maior biocompatibilidade da superfície dos dispositivos com os tecidos, diminuindo a incidência de reestenose, segundo estudos *in vitro* e em modelos animais (K. GUTENSOHN et al., 2000; FEDEL et al., 2010; PRUNOTTO et al., 2005).

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* impregnados de carbono.

Com base no exposto acima, esta pesquisa clínica visa estudar o processo inflamatório subjacente à ATP com colocação de *stent* impregnado de carbono no território vascular periférico, através da dosagem de marcadores inflamatórios, representados pelos componentes do Sistema Calicreína-cininas (SCC), das citocinas e do óxido nítrico, além da quantificação sérica de leucócitos. 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.

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, conseqüentemente, 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 coronárias, 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 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	Úlceração 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 sobrevivência 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 ou sem colocação de *stents*. A escolha do tratamento intervencionista, endovascular ou cirurgia aberta, depende basicamente da extensão da doença no setor 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 de acordo com o território acometido (Quadro II e III).

2.2 Angioplastia e uso de *stents*

No território vascular periférico sabe-se que a taxa de perviabilidade após ATP está relacionada com a localização da lesão tratada. A ATP de artérias elásticas de maior calibre, como as carótidas internas e as ilíacas, está associada com menores taxas de reestenose se comparado com condutos musculares como o segmento fêmoro-poplíteo (BOSCH et al., 1997; TETTEROO et al., 1998; DORMANDY; RUTHERFORD, 2000; AHMADI et al., 2001; ADAR et al., 1989; JEANS et al., 1990; MATSI et al., 1994). Especula-se que estas 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 fêmoro-poplíteo foi associado a uma resposta inflamatória mais intensa quando comparado com o mesmo procedimento em artérias ilíacas e carótidas (SCHILLINGER et al., 2002).

Quadro II – Classificação TASC II para território fêmoro-poplíteo

Tipo da Lesão	— Descrição
A	<ul style="list-style-type: none"> – Estenose única < 10 cm de comprimento – Oclusão única - < 5 cm de comprimento
B	<ul style="list-style-type: none"> – Lesões múltiplas (estenoses ou oclusões) cada qual < 5cm – Estenose única ou oclusão < 15 cm não envolvendo a artéria poplíteica infra-genicular – Lesões múltiplas ou isoladas na ausência de vasos tibiais contínuos para melhorar o <i>inflow</i> para uma ponte distal – Oclusão intensamente calcificada < 5 cm em comprimento – Estenose poplíteica isolada
C	<ul style="list-style-type: none"> – Estenoses ou oclusões múltiplas totalizando > 15 cm de com ou sem calcificação – Estenoses ou oclusões recorrentes que necessitam tratamento após duas intervenções endovasculares
D	<ul style="list-style-type: none"> – Oclusão da AFC* ou AFS** (> 20 cm, envolvendo a artéria poplíteica) – Oclusão da artéria poplíteica e trifurcação dos vasos tibiais

* Artéria femoral comum

** Artéria femoral superficial

Fonte: adaptado de Norgren (2007).

Quadro III – Classificação TASC II para território aorto-iliaco

Tipo da Lesão	— Descrição
A	<ul style="list-style-type: none"> — Lesões focais < 3 cm de comprimento
B	<ul style="list-style-type: none"> — Estenose entre 3 e 10 cm de extensão. — Lesão bilateral < 5 cm. — Oclusão unilateral da artéria ilíaca comum.
C	<ul style="list-style-type: none"> — Estenose bilateral entre 5 e 10 cm. — Oclusão unilateral da artéria ilíaca externa. — Oclusão bilateral da artéria ilíaca comum.
D	<ul style="list-style-type: none"> — Estenose ilíaco-femoral > 10 cm. — Oclusão unilateral da artéria ilíaca comum e da artéria ilíaca externa unilateral. — Oclusão bilateral da artéria ilíaca externa.

Fonte: adaptado de Norgren (2007).

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 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 papel importante na proliferação de células do músculo liso vascular e posterior crescimento de neoíntima (KORNOWSKI et al., 1998; YUTANI et al., 1999). A proliferação vascular de células musculares lisas e a formação de 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 do vaso ao implante de *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 neointima 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 neointima e o estreitamento recorrente do lúmen do vaso 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 hiperplasia intimal (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 degradam 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).

A resposta à colocação do *stent* ocorre da seguinte forma: após cinco segundos de seu implante, a superfície de metal é coberta por uma aderente monocamada de proteínas. Após um minuto, a superfície interna é coberta com finas camadas de proteínas, predominantemente fibrinogênio (BAIER et al., 1969). Em seguida, os espaços entre as estruturas do metal são cobertos por trombos e a aderência de plaquetas e leucócitos é acentuada por um distúrbio do equilíbrio eletrostático (EMNEUS et al., 1965; PARSON et al., 1994).

A presença de miofibroblastos é comum em feridas em cicatrização e leva a uma contração da ferida. Um fenômeno semelhante pode ocorrer em vasos em cicatrização, o que leva a uma redução das dimensões lumenares, sem aumento adicional da neoíntima, e é conhecido com remodelamento negativo. Após angioplastia, ocorre a formação de trombo, desenvolvimento da HI, retração elástica e remodelamento negativo. Por outro lado, após colocação do *stent*, a retração elástica e o remodelamento negativo são eliminados (HOFFMAN et al., 1996); portanto, a formação do trombo e a HI são os principais contribuidores para o desenvolvimento de reestenose intra-*stent* (MORENO et al., 1999; VIRMANI et al., 1999).

Figura 1 – Cortes histológicos transversais de carótidas de ratos (A e C) e de artérias ilíacas externas de coelhos (B e D)

Fonte: adaptado de Iaccarino et al. (1999) e Van Belle et al. (1997).

Observa-se, na Figura 1, vaso não tratado de aparência histológica normal (A); vaso tratado com angioplastia por balão com presença de hiperplasia intimal significativa (C); vaso tratado com angioplastia por balão e colocação de *stent* com hiperplasia intimal limitada (B); e vaso tratado com angioplastia por balão com colocação de *stent* com hiperplasia intimal intensa (D).

2.3 *Stents* impregnados de carbono

Uma consideração importante na tentativa de redução da reestenose intra-*stent* tem sido o melhoramento da biocompatibilidade dos dispositivos. Novos modelos de *stents*, mudanças na composição dos materiais e modificações nas estruturas superficiais, tais como o revestimento da superfície dos *stents*, têm sido desenvolvidos. O carbono diamante, um inerte e denso polímero de hidrocarboneto amorfo, pode ser usado para revestir a superfície do *stent* a fim de reduzir, além do contato com biomaterial, a liberação de íons metálicos e a trombogenicidade.

A biocompatibilidade de um material foi demonstrada por testes *in vitro* e *in vivo*, envolvendo a interação do material com células biológicas. Observou-se que uma glicoproteína, a fibronectina, medeia e promove a disseminação e adesão de células em biomateriais (CULP et al., 1979). A interação do biomaterial com o sangue começa com a adsorção de proteínas plasmáticas em sua superfície. As primeiras proteínas que são adsorvidas na superfície do biomaterial são a albumina, a fibrina e a fibronectina que são, então, substituídas pelo fator XII e pelo Cininogênio de alto peso molecular. Todas essas proteínas determinam a reação celular de um biomaterial. É a proporção de albumina adsorvida e fibrinogênio que determina a hemocompatibilidade do biomaterial (HAUERT, 2003). Esta adsorção de proteínas acontece dentro de segundos/minutos após o contato de um corpo estranho com o sangue e pode influenciar nos eventos subsequentes, como a ativação plaquetária, leucocitária, sistema complemento e coagulação. A camada de carbono provoca uma rápida e forte adesão de moléculas de albumina, contribuindo para tornar a superfície mais inerte, e, conseqüentemente, observa-se menor resposta imunológica e inflamatória em relação aos outros materiais (GUTENSOHN et al., 2000; FEDEL et al., 2010).

Em modelos animais, há evidências que sustentam a hipótese de que os *stents* de nitinol impregnados de carbono possuem maior biocompatibilidade e produzem menor reação inflamatória, resultando em menores índices de reestenoses que nos *stents* não impregnados de carbono. Histologicamente, em suínos, observou-se re-endotelização precoce e

proliferação miointimal reduzida. (PRUNOTTO et al., 2005). Em análise histológica de ilíacas de cães, observou-se que a hiperplasia intimal é reduzida em *stents* de nitinol impregnados de carbono em relação aos *stents* convencionais de nitinol ou aos *stents* de nitinol recobertos de dupla camada de carbono+polietilenoglicol; estes últimos responsáveis por hiperplasia mais intensa (KIM et. al., 2011; Figura 2). Realizaram-se estudos clínicos em território coronário, com resultados controversos em relação à diminuição da incidência de reestenose. Recentemente, em estudo multicêntrico, mostraram-se baixas taxas de reestenose em *stents* coronários com superfície coberta com carbono (ANDO et al., 2016). No entanto, ainda não temos trabalhos prospectivos que demonstrem o comportamento desse material no território periférico, em especial no território ilíaco-fêmoro-poplíteo.

A literatura tem demonstrado, entre outros, o papel das citocinas e proteases no processo de inflamação vascular crônica, porém os 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*.

Figura 2 - Microfotografias transversais de artérias ilíacas de cães pós *stent*

Fonte: adaptado de J. H. Kim et al. (2011).

Os resultados microscópicos da Figura 2 mostram que a área de hiperplasia neointimal foi significativamente inferior no *stent* impregnado de carbono (b) em comparação ao *stent* de nitinol (a); e foi maior no polietilenoglicol + carbono (c) que no *stent* de nitinol (a). Uma imagem microscópica de alta potência (d) para o *stent* de polietilenoglicol mostra que uma grande parte da hiperplasia neointimal foi causada pelo excesso de produção de colágeno (setas) secretados pelos fibroblastos proliferados.

2.4 Marcadores séricos

2.4.1 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 fluidos biológicos pela ação enzimática das calicreínas sobre os cininogênios. Entre as cininas, a mais importante é o nonapeptídeo bradicinina (BK, Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹), 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, 1992).

A calicreína plasmática é sintetizada pelo fígado, encontra-se na circulação na forma inativa e é denominada de pré-calicreína ou fator de Fletcher. Ela 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, entre 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, 1992; 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, 1992). 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 3, a pré-caliceína e a pró-caliceína são ativadas em caliceína 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.

Figura 3 – Diagrama esquemático do sistema caliceína-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 atuam 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 componentes do SCC (BHOOLA; FIGUEROA; WORTHY, 1992). As cininas também podem estimular a síntese de DNA e a proliferação celular, podendo perpetuar a inflamação crônica (BHOOLA; ELSON; DIEPPE, 1992). Elas estimulam também a produção do fator de necrose tumoral (TNF) e da interleucina-1 (IL-1) pelos macrófagos que, entre 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 se verificou 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 (entre 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., 1994; 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., 1994).

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 quimiotática 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., 1994). 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). A 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 4 representa o papel da ECA no sistema das cininas e na produção de angiotensina II, contribuindo para a HI.

Figura 4 – Representação esquemática demonstrando o papel da ECA na fisiopatologia da hiperplasia intimal e ressaltando os efeitos no endotélio vascular e no músculo liso vascular

Fonte: adaptado de Osgood (2012).

2.4.2 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. Ele 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, NADPH e do cofator da NOS, tetra-hidrobiopterina (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 endotélio" (POHL; BUSSE, 1989; HUTCHESON; GRIFFITH, 1991).

Conforme ilustra a Figura 5, 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 dessa 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 5 – 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 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 NO	Stent liberador NO	0	Porco	Stent Coronária	Yoon, 2002
	Stent liberador NO	32	Coelho	Stent Aorta	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 à 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 lipossoma 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-nitrosohidrazino) em aortas de coelhos. A liberação 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 mm², nos controles, para 0,49 mm² nos tratados, o que resultou em uma redução de 24% de estreitamento dos vasos pós controle angiográfico.

2.4.3 Citocinas

O termo citocina foi primeiramente descrito na década de 70 e compreende um extenso número de glicoproteínas envolvidas na sinalização célula a célula. Elas são convencionalmente classificadas por pertencerem a uma de seis famílias: interleucinas (IL), a família do fator de necrose tumoral (TNF α e β), interferons (IFN), fatores de estimulação de colônia (CSF), fatores de crescimento (TGF β) e quimiocinas. (HENDERSON; HIGGS, 2000; VON DER THÜSEN et al., 2003). Mediadoras de inúmeras funções celulares, as citocinas são secretadas pelas células da imunidade natural e adquirida. Elas podem ser produzidas em respostas a diferentes microorganismos e outros antígenos (por exemplo, a proteína ou substratos exógenos e endógenos, ativação de moléculas de adesão e co-estimulatórias), além de estimular respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação.

As citocinas têm papel fundamental na resposta imune, estimulando o crescimento e a diferenciação de linfócitos (fase de ativação das respostas imunes adquiridas) e ativando diferentes células efetoras para a eliminação de componentes estimulantes não próprios (fase efetora da imunidade inata e adquirida).

Além disso, elas participam na hematopoese e podem atuar de forma importante na intervenção terapêutica, em que são alvos para antagonistas específicos em numerosas doenças imunológicas e inflamatórias. Mediante o exposto, pode-se concluir que essas proteínas podem ser capazes de estimular, proliferar, maturar, recrutar e induzir *feedback* negativo celular (ALEXANDER; HILTON, 2004; YASUKAWA; SASAKI; YOSHIMURA, 2000; GREENHALGH; ALEXANDER, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; KATAOKA et al., 2009; ATZENI; SARZI-PUTTINI, 2009).

A vida biológica das citocinas é relativamente reduzida, e sua potente ação visa a estimular os seus respectivos receptores de membrana nas células-alvo. Elas atuam em diversos tipos celulares e induzem efeitos diversos sobre as células-alvo, agindo separada ou concomitantemente, de forma sinérgica ou antagônica a outras citocinas (CAVAILLON et al., 2005; GALLIN et al., 1999; JANEWAY et al., 1999; OSBORN et al.; ABRAHAM et al., 2009; KATAOKA et al., 2009; ATZENI et al., SARZI-PUTTINI et al., 2009).

Cruciais para as respostas imunes inata e adaptativa, as citocinas são secretadas pelas células imunes de forma autócrina ou parácrina, nunca endócrina; sempre em resposta ao estímulo sistêmico induzido pela presença do patógeno. Elas podem ainda participar de algumas fases do desenvolvimento durante a embriogênese (RAINES et al., 2005; KATAOKA et al., 2009). São moléculas envolvidas em quase todos os processos biológicos importantes, desde a proliferação celular até o envolvimento no processo inflamatório, imunidade, migração, fibrose, reparação e angiogênese (VILEK; FELDMANN, 2004).

O TNF- α é o primeiro mediador inflamatório a ser produzido em resposta às infecções, sendo considerado mediador primário do sistema imune inato e crucial para induzir proteção local (ULLOA; TRACEY, 2005). Quantidades mínimas de TNF- α contribuem para a defesa do hospedeiro, e, quando a produção é excessiva e prolongada, o TNF- α torna-se deletério ao organismo (NETEA et al., 2003), causando desregulação da resposta imune e induzindo a ativação de outras citocinas bem como do sistema oxidativo celular, o que promove inflamação e lesão tecidual potencialmente letais (TRACEY, 2002; ULLOA; TRACEY, 2005).

A IL-1 possui função similar à função do TNF- α (CUNNEEN; CARTWRIGHT, 2004), pois induz a resposta inflamatória sistêmica em resposta a um agravo inicial (LOISA et al., 2003), agindo sinergicamente ao TNF- α nesse processo (DEL VECCHIO et al., 2004). A IL-6 é considerada importante marcador da resposta inflamatória sistêmica, pois, nas infecções, alcança rapidamente picos de concentração sérica, caracterizando-se como citocina “de alarme” da infecção (CASEY, 2000). A IL-6 é a principal indutora da síntese da proteína C-reativa (PCR) pelos hepatócitos, sendo ainda capaz de ativar células T e atrair neutrófilos aos sítios de infecção (CUNNEEN; CARTWRIGHT, 2004).

No papel de inibir as citocinas pró-inflamatórias está a IL-10, principal citocina contra-reguladora da resposta imune inata (OBERHOLZER et al., 2002). Ela atua como citocina anti-inflamatória e age por feedback negativo, ou seja, inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias (CASEY, 2000). Elevadas concentrações de IL-10 reduzem a produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 pelos monócitos, enquanto ativam (por feedback positivo) a produção de IL-1Ra, receptor antagonista da IL-1 (HOWARD; O'GARRA, 1992). A supressão de IL-10 resulta em aumento dos níveis séricos circulantes de TNF- α e IL-6, o que sugere que essa citocina possua grande poder anti-inflamatório (CUNNEEN; CARTWRIGHT, 2004). OBERHOLZER et al. (2002) sugeriram que a magnitude da resposta da IL-10 parece correlacionar-se com a gravidade do processo inflamatório e a concentração de citocinas pró-inflamatórias com a ativação do TNF- α . Existe, de fato, um mecanismo

homeostático que envolve a IL-10 e as citocinas pró-inflamatórias. Enquanto o TNF- α e outras citocinas estimulam a síntese de IL-10, na vigência de estímulo inflamatório, esta bloqueia a síntese de TNF- α de forma diretamente proporcional à resolução do processo inflamatório, levando à normalização dos níveis séricos das citocinas (BORISH; STEINKE, 2003) e restaurando a homeostase (BONE et al., 1997).

Estudos *in vivo* têm demonstrado que as diversas citocinas interagem em nível de endotélio das formas mais distintas, ocasionando ou protegendo das patologias vasculares. Estas apresentam vários sítios de formação, receptores específicos e células alvo (RAINES et al., 2005). Particularmente, TNF α , IL-1 β , IL-4 e IL-10 levam a um aumento na expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais, promovendo o recrutamento e a infiltração leucocitária, que por sua vez ocasionam a lesão aterosclerótica (RAINES et al., 2005; AHN et al., 2004; GOTSH et al., 1994).

A função das moléculas de adesão endotelial também pode ser alterada pelas citocinas (CXCL1, GRO, KC, IL-15, MIF), ocasionando um depósito de leucócitos na túnica íntima vascular e levando a uma sequência de interações com o endotélio e à doença aterosclerótica (RAINES 2005; HUO 2001).

A apoptose das células endoteliais tem a capacidade de expor a membrana basal subjacente, levando à trombose e à promoção da resposta inflamatória. Ainda, a IL-11 potencializa a sobrevivência da célula endotelial, inibindo a resposta inflamatória (RAINES 2005; KIRKILES-SMITH, 2004).

Células endoteliais ativadas por citocinas (CCL2, MCP-1, IL-18) contribuem para a apresentação de antígenos e para a ativação de células imunes através da estimulação do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) (RAINES, 2005; POBER, 1983). Outras citocinas como IL-2, IL-8, IL-15 e IL-18 permitem a proliferação e migração de células endoteliais e a angiogênese, inibindo a neovascularização da placa, o que pode ser suficiente para reduzir o acúmulo de macrófagos e a progressão da placa em lesões ateroscleróticas avançadas (PARK, 2001; SIMONINI, 2000; RAINES, 2005).

O relaxamento vascular dependente de endotélio pode ser regulado através de citocinas que induzem (IL-10) ou suprimem (INF-gama) os níveis de óxido nítrico, de forma a potencializar ou inibir a resposta inflamatória (RAINES, 2005).

As citocinas podem também alterar a expressão dos genes do músculo liso e a função celular *in vivo* devido à capacidade de promover a migração e proliferação de células da musculatura lisa (CCL, MCP-1, CCL11, MIF, TGF- β), por inibir o acúmulo de músculo liso (IL-10, IL-18), por interferir na síntese e remodelação da matriz extracelular (INF gama, IL-1,

IL-18), por serem agentes anti-inflamatórios, expressarem moléculas de adesão (IL-10, TGF- β) e por promoverem a apresentação de antígenos das células musculares lisas (IL-18, TGF- β , IFN gama) (RAINES, 2005).

As citocinas podem, assim, apresentar-se como mediadores importantes para o início de reações inflamatórias, estimulando a síntese de prostaglandinas ou induzindo a secreção hormonal pelo eixo hipotalâmico pituitário adrenal (Ex: IL-6, IL-8). Entretanto, existem citocinas que apresentam efeito tanto pró quanto antiaterogênico, levando a um aumento na produção de matriz extracelular no primeiro caso, modulando reações imunes por inibir a resposta inflamatória, e diminuindo a produção de radicais livres no segundo, como a TGF- β (RAINES, 2005).

Quando comparada apenas à angiografia, a angioplastia foi responsável por importante aumento das citocinas IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α , evidenciando o impacto desta na parede vascular e em sua resposta inflamatória (PALMAR et al., 2009).

Pacientes submetidos à angioplastia coronariana têm mostrado relação entre o aumento dos níveis séricos de IL-6, IL-8 e TNF- α e o grupo reestenose (CAIXETA, 2007; SZKODZINSKI, 2009; KAZMIERCZAK, 2014). Ainda referente à abordagem coronariana, foi identificada uma maior tendência à reestenose em pacientes com alterações no gene responsável pela IL-8 (VOGIATZI, 2010). No território periférico, foi identificado aumento dos valores de PCR, IL-6 e TNF- α nos grupos reestenose de pacientes submetidos à angioplastia carotídea (XIAZY, 2012).

Modelos animais, com deficiência genética para o receptor do antagonista da IL-1 ou mediante administração de seu antagonista específico, mostraram claro aumento da hiperplasia intimal e reestenose quando comparado ao grupo controle (ISODA, 2003; MORTON, 2005; ISODA, 2014).

Em busca de formas de prevenção da reestenose intra-*stent*, modelos animais, através da administração de IL-10 recombinante ou de formas de bloqueio ao TGF- β , têm se mostrado eficientes (FELDMAN, 2000; KINGSTON, 2001; CHEN, 2009).

A administração de pedinisona em pacientes submetidos à angioplastia coronariana foi correlacionada a uma menor liberação de TNF- α concomitantemente à menor taxa de reestenose (PESARINI, 2010).

2.4.4 Proteína C reativa

A atividade da doença aterosclerótica periférica, coronariana e das artérias cerebrais extracranianas tem, nos marcadores inflamatórios de fase aguda (Ex: proteína C reativa –

PCR), a possibilidade de quantificação indireta do processo inflamatório parietal mediado pelas citocinas. Dessa forma, valores elevados de PCR no peri-operatório podem indicar atividade aumentada da doença e suscetibilidade aumentada ao remodelamento vascular hipertrófico, além de formação excessiva da neoíntima após ATP.

Altos níveis de PCR ($\geq 2,0$ mg / L) antes do implante de *stent* coronário em doentes com IAM estão associados com maior risco de trombose de *stent*. Esses dados sugerem que os níveis de PCR pré-procedimento é um preditor de trombose de *stent* (JEONG, et al., 2012).

Um estudo com *stents* não revestidos e revestidos por dacron mostrou aumento de citocinas (interleucinas 1beta e 6) no primeiro dia pós-operatório bem como aumento da PCR e fibrinogênio no sétimo dia, contudo sem correlações clínicas imediatas (HAYOZ D et al., 1997).

Pelo exposto, estudos experimentais e clínicos evidenciaram tratar-se a reestenose de um processo mediado pela inflamação vascular. Com isso, vários investigadores estão desenvolvendo programas clínicos, usando terapias anti-inflamatórias sistêmicas (bifosfonados lipossomais encapsulados, a prednisona, o bloqueio da anti CD18 ou anti CCR2 e receptores ativados da proliferação de lipossomos e ativador da rosiglitazona) ou locais com o uso de *stents* contendo agentes esteróides como a metilprednisolona (300mg), que, em modelo animal, demonstrou redução na proliferação neointimal quando comparado a *stents* recobertos com polímeros (COSTA et al., 2005).

Em longo prazo, estudos em busca de preditores pró e anti-inflamatórios podem ajudar a identificar doentes sob risco de reestenose após angioplastia transluminal periférica com *stent*. Isso representaria um avanço no sentido de dar subsídios à seleção dos casos suscetíveis a reestenose e, por consequência, identificar aqueles que se beneficiariam de seguimento pós-operatório mais criterioso, com possibilidades de estabelecer medidas precoces para evitá-la.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a evolução clínica, a perviedade do dispositivo e o processo inflamatório relacionado à angioplastia transluminal percutânea com *stent* impregnado de carbono em pacientes portadores de DAOP do segmento ilíaco-fêmoro-poplíteo.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a evolução clínica com base nos sintomas, sinais e ITB (índice tornozelo-braquial) após a ATP + *stent* durante os 12 meses iniciais após o tratamento;
2. Avaliar a incidência de reestenose em pacientes tratados com ATP, com colocação de *stent* impregnado de carbono no segmento ilíaco-fêmoro-poplíteo, durante o período de 12 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* impregnado de carbono;
4. Dosagem sérica das citocinas (IL1 β , IL6, IL8, IL10, TNF α e TGF β) antes do procedimento, 24h e seis meses após a ATP com colocação de *stent* impregnado de carbono;
5. Dosagem sérica da proteína C reativa (PCR) antes do procedimento, 24h e seis meses após a ATP com colocação de *stent* impregnado de carbono;
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, caliceína plasmática e tecidual) antes do procedimento, 24h e seis meses após a ATP com colocação de *stent* impregnado de carbono;

7. Estabelecer análise das variações dos mediadores citados, nos diferentes tempos, em relação ao controle pré-tratamento, correlacionando as eventuais alterações com a ATP e colocação de *stent* impregnado de carbono.

POPULAÇÃO E MÉTODO

4 POPULAÇÃO E MÉTODO

4.1 População

Foram incluídos no presente estudo 32 pacientes, todos atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) no período de agosto de 2013 a novembro de 2014, independentemente de grupo étnico, idade e sexo, com diagnóstico de DAOP e que apresentavam indicação de ATP do segmento ilíaco-fêmoro-poplíteo. Foram ratadas lesões estenosantes ou oclusivas de 5 a 15 cm de extensão com cateter balão de angioplastia e colocação de *stents* de nitinol (liga de níquel e titânio), impregnados de camada superficial de carbono (*Carbostent*). Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP de acordo com o nº 6785.

Critério de inclusão: doentes com claudicação limitante, dor de repouso e/ou ulceração isquêmica – categoria de Rutherford 3, 4 e 5 (Rutherford, 2005), com evidência angiográfica de doença ilíaco-fêmoro-poplíteia na ausência de qualquer doença proximal significativa. Foram incluídos apenas doentes que preencheram os critérios *Trans-Atlantic Inter-Society Consensus – TASC II* (NORGREN et al., 2007) para intervenção endovascular (A, B e C). Participaram somente os doentes que autorizaram a inclusão no estudo por meio de termo de consentimento livre esclarecido (Anexo A).

Crítérios de exclusão: foram excluídos doentes com comorbidades subjacentes (psicose medicamentosa, meningites, afecções por vírus neurotrópicos, neurocisticercose, esclerose múltipla, hanseníase ativa, tumor cerebral ou intraespinal, neurosífilis, asma, rinite alérgica, lúpus); doentes com lesões tróficas muito extensas e/ou infectadas ou utilizando medicamentos com possibilidade de interferir no resultado dos marcadores inflamatórios; doentes sem condições clínicas ou laboratoriais para realização do procedimento invasivo proposto; doentes que passaram previamente por angioplastia com *stent* ou com trombose do *stent* com necessidade de trombólise intra-arterial; doentes 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 doentes 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 doentes, 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

Carbostent (EasyFlype – Maquet), dispositivo autoexpansível de nitinol (liga de níquel e titânio), projetado em forma de células híbridas, promovendo flexibilidade e sustentação da parede do vaso. Ele possui cobertura superficial de carbono, que supostamente lhe confere maior biocompatibilidade com os tecidos, segundo estudos *in vitro* e em modelos animais.

Na presente pesquisa, no território femoral, foram utilizadas medidas que variaram de 40 a 150 mm de comprimento e de 6 a 7 mm de diâmetro; e no território ilíaco, com comprimentos de 40 a 80 e diâmetros de 7 a 9 mm. Sempre foi utilizado um único dispositivo, independentemente do vaso tratado.

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 Clínicas de Ribeirão Preto. Clopidogrel 300mg foi administrado como dose de ataque antes do procedimento naqueles doentes que não faziam seu uso rotineiro e, como manutenção, 75 mg/dia por seis meses. Todos os doentes estavam em uso de Ácido Acetilsalicílico na dosagem de, no mínimo, 100 mg por dia. Os procedimentos foram realizados com anestesia local e via de acesso femoral por equipe treinada em cirurgia endovascular. Administrou-se heparina não fracionada (5.000 unidades) no intra-operatório, logo após a colocação do introdutor. Foram realizadas

angiografias antes e após o término do procedimento; essas imagens foram armazenadas para posterior avaliação. 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*, com diâmetro de acordo com o diâmetro nativo do vaso. Após a colocação do *stent*, realizou-se a dilatação intra-*stent* somente nos casos de estenose residual (estenose > 30%).

4.2.3 Acompanhamento pós-operatório

Todos os doentes foram acompanhados no mesmo ambulatório, com retornos agendados para 30 dias, três meses, seis meses e 12 meses (sendo que o paciente teve livre acesso ao ambulatório quando necessário). Nas consultas de retorno, eles foram submetidos a exame físico, realizado por um dos integrantes da equipe, cirurgião vascular capacitado, avaliando a evolução dos sintomas de claudicação, dor de repouso e cicatrização das lesões tróficas. Os doentes foram submetidos ao cálculo do ITB (durante consulta ambulatorial), além de realizarem exame de controle com Ultrasson Doppler após seis meses do tratamento. Aqueles cujo exame ultrassonográfico evidenciasse alteração correspondendo a estenose > 50%, segundo critérios do Colégio Brasileiro de Radiologia (CBR), foram levados para nova arteriografia, e as imagens foram comparadas às anteriores na procura de recorrência da estenose/oclusão (reestenose). As reestenoses, quando presentes, foram mensuradas através 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. Considerou-se reestenose significativa quando igual ou superior que 50%. No tempo doze meses, foi considerado pérvio o *stent* em que ao menos um dos dois fatores estava presente: pulso palpável distal ao *stent*; Doppler sem evidências de estenose > 50%.

4.2.4 Coleta do material

Durante a internação do doente, 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®:

- 1- 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 caliceínas e cininogênios;
- 2- Tubo com Heparina de Sódio, para a análise do NO e atividade da cininase II;
- 3- Tubo com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para dosagem de hemograma.
- 4- Tubo sem anticoagulantes, para a dosagem de PCR e citocinas.

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 foi utilizado o sobrenadante. Todas as etapas foram realizadas a 4°C. A determinação do NO foi realizada por quimioluminescência NO/ozônio (DWEIK et al., 1998). A concentração de nitrato foi medida utilizando-se 5 ul da amostra plasmática, que 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-se gás nitrogênio, para a câmara de quimioluminescência do Sievers NOAnalyzer® (Sievers 280i NOA, Sievers, Boulder, CO, EUA). A detecção do NO decorre de sua reação com o ozônio, emitindo luz vermelha ($\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2$; $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_2 + h\nu$). 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-se 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 Citocinas

As dosagens de citocinas foram determinadas, utilizando-se métodos imunoenzimáticos padronizados conforme descrito por Dellalibera-Joviliano et al. (2003) com algumas modificações (Cunha et al., 1991; Cunha et al., 1992; Cunha et al., 1993). Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc). Todos os protocolos das citocinas mencionadas nos objetivos seguiram de forma similar àqueles observados nas quantificações de IL-1 β , utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para as sensibilizações.

IL-1 β : a dosagem de IL-1 β foi realizada, utilizando-se como primeiro ligante o anticorpo monoclonal anti-IL-1 β humano (Pharmingen, EUA), sendo adicionados, a cada poço, 50 μ L de uma solução na concentração de 3 μ g/mL. As placas foram incubadas a 4° C durante 12 horas. Após a ligação do primeiro anticorpo, as placas foram novamente incubadas por uma hora à temperatura ambiente, com solução bloqueadora, contendo albumina bovina a 1% (Merck, Alemanha). As placas foram então lavadas quatro vezes em tampão PBS-Tween. A seguir, foram adicionados 80 μ L da citocina padrão e das amostras de plasma dos pacientes, e as placas incubadas a 4° C overnight. A citocina padrão, IL-1 β recombinante humano (Pharmingen, EUA), foi diluída em tampão bloqueador-Tween e utilizada numa concentração inicial de 2000 pg/mL. Ela foi, então, diluída logaritmicamente em base 2, até atingir 1,9 pg/mL e, no último poço da primeira linha, foi feita o blank, possibilitando assim a realização de uma curva padrão. As amostras de plasma analisadas foram tratadas antes do descongelamento com o coquetel inibidor de enzimas, com o intuito de inibir a degradação das citocinas durante o descongelamento. Após o descongelamento, 100 μ L do plasma foram adicionados aos poços e as placas incubadas novamente overnight. Na manhã seguinte, foi adicionado o segundo anticorpo anti-IL-1 β humano (Pharmingen, EUA) biotilado, no volume de 100 μ L/poço de uma solução na concentração de 1 μ g/mL, sendo as placas incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Foi então adicionada à solução contendo o conjugado avidina-peroxidase (SAV-HRP, Pharmigen), no volume de 100 μ L/poço e na diluição de 1/5000. A avidina se liga à biotina presente no anticorpo anticitocina biotilado. Após período de incubação de uma hora, foi adicionado o-fenildiamino dihidroclorido, OPD (Sigma, EUA), 100 μ L/poço de uma solução na concentração de 10 mg/mL, contendo H₂O₂. Esse substrato, ao sofrer a ação da enzima peroxidase, gera uma cor amarela. A reação foi bloqueada pela adição de uma solução de H₂SO₄ 1M, 100 μ L/poço, após ser observado nítido aparecimento da cor. A densidade óptica das placas foi determinada em espectrofotômetro a

490 nm, e a concentração de IL-1 nas amostras de plasma analisadas será determinada a partir da curva padrão. Os resultados serão expressos em pg/mL pela comparação da densidade ótica (DO) obtida com as da curva padrão. Enfatiza-se que as dosagens das demais citocinas estudadas foram realizadas utilizando-se protocolo semelhante ao acima descrito, exceto no que se refere à natureza dos anticorpos de captura, detecção e a citocina padrão.

As soluções utilizadas para as dosagens das diversas citocinas incluem: Coquetel inativador de enzimas: 1) 100 mM ácido amino capróico (13,1 g); 2) 10 mM Na₂ EDTA (3,72 g); 3) 5 mM benzamidina HCl-H₂O (0,78 g); 4) 0,2 mM fenilmetilsulforil fluoride (PMSF) (0,035 g). Dissolveu-se (1) ao (3) em 99 mL de H₂O destilada. Acrescentou-se o PMSF, previamente dissolvido em 1 mL de isopropanol, no momento de utilização desse coquetel, pois ele perde rapidamente sua atividade (cerca de 100 min. a partir da diluição). Solução de ligação: 0,1 M Na₂HPO₄; ajustou-se o pH para 9,0 com HCl (utilizada para diluir o anticorpo de captura).

4.2.5.3 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; ROTHSCILD; 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 xg, 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 μ L 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 μ L de cada amostra e realizada incubação por uma hora à temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados, a cada poço, 50 μ L de bradiginina 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 μ L 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 bradiginina por ml de plasma.

4.2.5.4 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 μ L dessas amostras foram incubadas com 50 μ L de ácido clorídrico 0,16N por quinze minutos. Em seguida, foi acrescentado a cada amostra 50 μ L 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 μ L de NaOH 0,16N. Após, 50 μ L dessas amostras foram diluídas oito vezes em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,9, contendo PEG 0,1%. Para a ativação da calicreína, 30 μ L das amostras, preparadas como descrito acima, foram colocadas, em duplicatas, em poços de uma placa de poliestireno, previamente preenchidos com 20 μ L do tampão Tris-HCl e 50 μ L 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 10 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.

4.2.5.5 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 espectrofotometricamente, 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 0,1 mg/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 espectrofotômetro (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 e 50 nmol de paranitroanilina, sendo os resultados expressos em µM pNa/mL plasma.

4.2.5.6 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 37°C 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 0,2 mL 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 uma, 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:

$$[\text{Atividade de ECA}] = ([\text{leitura}] - y) / \text{slope}.$$

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 descrita

4.2.5.7 Proteína C Reativa (PCR)

Foi utilizado o método imunoturbidimétrico com látex. A proteína C reativa reage com o anticorpo específico, formando imunocomplexos insolúveis. A turbidez produzida pelos

imunocomplexos é proporcional à concentração de PCR na amostra e pode ser lida com espectrofotômetro.

4.2.5.8 Hemograma

Foi utilizado o equipamento Horiba Diagnostics ABX pentra DX 120. O princípio corresponde à contagem automática de células em equipamento que utiliza um sistema sequencial hidrodinâmico e combina as metodologias de impedância, citometria de fluxo e citoquímica.

4.3 Análise estatística

Foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para verificar normalidade dos dados que provinham de distribuição normal, e foi realizado o teste ANOVA para medidas repetidas. Esse teste tem um pressuposto que é a esfericidade, por isso, quando o teste de Mauchly foi significativo, foi realizada ANOVA para medidas repetidas com a correção de Greenhouse-Geisser e post-hoc de Tuckey. Para os dados não paramétricos, foi realizado o teste de Friedman, com post-hoc de Simes-Hochberg. A hipótese de nulidade foi rejeitada quando a possibilidade de ocorrência casual das diferenças observadas não excedia 5% ($p < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa *R Core Team* (2017) e os gráficos através do programa *Knime analytics plataform*. Foi utilizado também, o software IBM® SPSS® versão 20.0.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população

5.1.1 Dados clínicos

Dos 32 doentes recrutados no estudo, cinco foram retirados devido a critérios de exclusão (dois óbitos por IAM e AVC, respectivamente; uma amputação suprapatelar por gangrena úmida, quando na ocasião foi constatado perviedade do *stent*; uma hanseníase ativa; uma oclusão proximal ao *stent*, com o mesmo mantendo-se pervio por colaterais. Um total de 27 pacientes completaram seis meses de estudo (16 em território femoral e 11 em território ilíaco); houve apenas uma reestenose (3,7%), e, em 26 doentes (96,3%), o *stent* manteve-se pervio. Os dispositivos utilizados foram únicos, e não ocorreram fraturas da estrutura dos *stents* durante o tempo de seguimento. Considerando os territórios separadamente, tem-se 93,7% de perviedade no território femoral e 100% no território ilíaco. No período de 12 meses, quatro pacientes perderam seguimento e 23 foram submetidos à avaliação de perviedade. Destes, todos mantiveram a perviedade dos *stents*, com exceção do mesmo paciente no qual houve reestenose no tempo seis meses. A distribuição nos tempos seis meses e 12 meses está representada esquematicamente na Figura 6 e na Figura 7, respectivamente.

Figura 6 – Organograma ilustrando a distribuição e perviedade dos pacientes por grupo experimental nos seis meses iniciais

Figura 7 – Organograma ilustrando a distribuição e perviedade dos pacientes por grupo experimental nos 12 meses iniciais

A Figura 8 representa a perviedade dos *stents*, através da análise de sobrevida livre de reestenose/oclusão em função do tempo de 12 meses de seguimento após o procedimento.

Figura 8 – Curva de Kaplan-Meier da sobrevida livre de reestenose/oclusão dos *stents* em função do tempo após a angioplastia e implante de *stent* com superfície impregnada de carbono: representação da perviedade do dispositivo

Os pacientes do estudo foram analisados quanto a suas características demográficas e fatores de risco cardiovascular. A média de idade dos doentes foi de 65,2 anos; a idade máxima de 85 anos, mínima de 47 anos (Tabela 2 e Figura 9), sendo a maioria do sexo feminino (74%). A Tabela 3 mostra que os fatores de risco estavam presentes na seguinte proporção: hipertensão (89%), diabetes melitus (33%), dislipidemia (33%) e tabagismo (55%). Os principais grupos de anti-hipertensivos utilizados foram descritos: inibidor da ECA, bloqueador do receptor de angiotensina, beta-bloqueador e diurético; além do uso de estatina. Na Tabela 3, também foi analisado o tipo de isquemia de membros inferiores, com respeito à presença de isquemia crítica (11% dor em repouso e 37% lesão trófica) ou claudicação intermitente (52%).

Tabela 2 – Idade dos pacientes expressa em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, no momento da angioplastia transluminal percutânea + *carbostent*

Medidas	Idade
Min	47
Max	85
Média	65,2
Mediana	65
* CV	14,47%

* CV = Coeficiente de variação

Figura 9 – Idade dos pacientes do estudo no momento da angioplastia (ATP) com *stent* impregnado de carbono(carbostent)

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo.

Tabela 3 – Características demográficas e clínicas

	Total n = 27	% n = 27
Variável		
Sexo (feminino)	20	74
Hipertensão	24	89
Diabetes	9	33
Dislipidemia	9	33
Tabagismo	15	55
Inibidor da ECA	8	29
BRA*	8	29
Beta-bloqueador	9	33
Diurético	5	18
Estatina	9	33
Isquemia crítica *	13	48

*BRA = bloqueadores dos receptores de angiotensina

* isquemia crítica = dor em repouso e/ou lesão trófica

Os doentes foram enquadrados segundo a classificação de Rutherford para isquemia de membros inferiores, e as características das lesões foram separadas conforme a classificação TASC II (Tabela 4).

Tabela 4 – Classificação e agrupamento de acordo com o tipo de isquemia com base na classificação de Rutherford e TASC II

	Total n = 27	% n=27
Categoria de Rutherford		
3	14	52%
4	3	11%
5	10	37%
Classificação TASCII		
A	10	37%
B	14	52%
C	3	11%

A Tabela 5 mostra a característica da lesão inicial (oclusão ou estenose) e o comprimento do *stent* utilizado.

Tabela 5 – Relação entre o tipo de lesão inicial e o comprimento do *stent* utilizado

	Total n = 27	% n=27
Tipo de lesão inicial		
Estenose	10	37%
Oclusão	17	63%
Comprimento <i>stent</i>		
40-60 mm	16	59%
61-100 mm	6	22%
101-150 mm	5	19%

O sucesso técnico do procedimento é demonstrado pela elevação da média dos valores do índice tornozelo braquial (ITB) nos diferentes tempos. Foram observadas as seguintes médias nos períodos pré-procedimento, 24 horas e seis meses pós procedimento: 0,53; 0,89; 0,8, como demonstrado na Tabela 6 e Figura 10.

Tabela 6 – Índice tornozelo-braquial (ITB) expresso em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbstent* (C)

	ITB		
Medidas	A	B	C
Min	0,25	0,60	0,30
Max	0,82	1,10	1
Média	0,53	0,89	0,80
Mediana	0,50	0,90	0,90
* CV	27,26%	14,38%	21,10%

* CV = Coeficiente de variação

Figura 10 – Índice tornozelo-braquial (ITB) em pacientes antes, 24h e seis meses após angioplastia periférica transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo.

Clinicamente, foram observadas melhora da claudicação e cicatrização das lesões tróficas dos doentes submetidos à angioplastia e implante de *carbostent*. Houve 100% de salvamento de membro dos doentes do estudo, mesmo no caso em que houve reestenose, cuja manifestação clínica inicial era claudicação limitante, e, após a constatação da reestenose, foi optado por nova angioplastia nesse segmento; neste mesmo doente houve retorno do sintoma de claudicação devido à oclusão do *stent* constatada três meses após a segunda intervenção. O doente em questão foi submetido à ponte fêmoro-poplítea nove meses após a primeira abordagem. Dos pacientes excluídos do estudo, apenas um evoluiu para perda do membro devido à infecção (gangrena úmida, com constatação da perviedade do *carbostent*, dois meses após a intervenção).

Para exemplificar, abaixo são apresentados alguns casos do estudo. No caso da Figura 11, tratada foi a artéria femoral superficial esquerda, que se encontrava ocluída. Foi observado o sucesso imediato da ATP/*carbostent*, e na ultrassonografia Doppler de seis meses a ausência de reestenose.

Figura 11 – Imagens angiográficas e Doppler do segmento fêmoro-poplíteo

Legenda: **A**, angiografia pré-procedimento mostrando falha de enchimento em artéria femoral superficial esquerda compatível com oclusão da mesma. **B**, *carbostent* posicionado no nível do segmento ocluído. **C**, angiografia pós ATP/*carbostent* imediata, mostrando o sucesso terapêutico. **D**, doppler controle de seis meses, sem evidência de reestenose significativa.

Na Figura 12, um paciente com uma estenose crítica da artéria ilíaca comum direita que foi tratado satisfatoriamente com ATP/*carbostent*, e, da mesma forma que no caso anterior, não ocorreu reestenose significativa em seis meses.

Figura 12 – Imagens angiográficas e Doppler de segmento ilíaco do membro inferior direito

Legenda: **A**, angiografia pré-procedimento mostrando falha de enchimento em artéria ilíaca comum direita compatível com estenose >70%. **B**, *carbostent* posicionado no nível da estenose. **C**, angiografia pós ATP/*carbostent* imediata, mostrando o sucesso terapêutico. **D**, Doppler controle de seis meses sem evidência de reestenose significativa.

Já o terceiro caso (Figura 13), observamos a angiografia, controle do único caso do estudo em que houve reestenose devido à hiperplasia intimal.

Figura 13 – Imagens angiográficas de do segmento fêmoro-popliteo em membro inferior esquerdo

Legenda: **A**, angiografia controle de seis meses mostrando imagem de contrastação filiforme junto à borda proximal do *stent*, com redução acentuada do lúmen, correspondendo a reestenose maior que 70%. **B**, posicionamento do *carbostent*. **C**, ampliação da imagem descrita em B para melhor visualização da lesão.

5.2 Dosagens dos marcadores inflamatórios

5.2.1 Citocinas

Houve redução estatisticamente significativa das concentrações das citocinas inflamatórias (IL-1- β , IL-6, IL-8 e TNF- α) no tempo 24 horas e seis meses quando comparado com o pré-procedimento, com exceção da IL-8 no tempo 24 horas, quando ocorreu apenas uma tendência a redução em relação ao pré-tratamento, sem significado estatístico. As concentrações das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF-beta) comportaram-se de maneira antagônica às citocinas inflamatórias: TGF-beta apresentou elevação no tempo 24 horas em relação ao pré-tratamento, enquanto a IL-10 apenas tendência a elevação. Ambas apresentaram elevação estatisticamente significativa no tempo seis meses *versus* pré-tratamento e seis meses *versus* 24 horas ($P < 0,05$). As tabelas 7 e 8 mostram os valores das citocinas nos diferentes tempos, expressos em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação. Esse coeficiente avalia a dispersão dos dados em torno da média. Quanto menor o seu valor, mais homogêneo são seus dados. Ele varia de 0 a 100%.

Tabela 7 – Citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) em pg/ml plasma, expressas em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carabostent* (C)

Medidas	IL-1 β			IL-6			IL-8		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Min	420	390	300	1.120	1.090	580	250	210	140
Max	490	480	420	1.790	1.500	952	487	412	290
Média	456,5	414,8	383,8	1.513,9	1.281,9	763,5	349	348	178,2
Mediana	456	410	390	1.500	1.300	745,0	350	345	160
* CV	4,08%	4,25%	7,64%	9,79%	8,44%	13,88%	13,97%	15,63%	19,65%

* CV = Coeficiente de variação

Tabela 8 – Citocinas (TNF- α , IL-10 e TGF- β) em pg/ml plasma, expressas em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C).

Medidas	TNF- α			IL-10			TGF- β		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Min	120	110	30	32	40	79	29	40	35
Max	180	145	70	90	85	156	79	90	100
Média	152,3	125	51,9	63,1	62,7	118,2	47,6	58	72,3
Mediana	150	130	51,0	65	60	120	46	50	72,3
* CV	10,30%	8,59%	19,74%	25,63%	16,26%	16,87%	26,74%	26,45%	20,07%

* CV = Coeficiente de variação

As figuras de 14 a 17 mostram o comportamento das citocinas inflamatórias (IL1- β , IL-6, IL-8 e TNF- α).

Figura 14 – Atividade da IL-1 β , medida em pg/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # P < 0,05, antes *versus* seis meses. ## P < 0,05, 24h *versus* seis meses. ### P < 0,05 antes *versus* 24h.

Figura 15 – Atividade da IL-6, medida em pg/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # P < 0,05, antes *versus* seis meses. ## P < 0,05, 24h *versus* seis meses. ### P < 0,05 antes *versus* 24h.

Figura 16 – Atividade da IL-8, medida em pg/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # P < 0,05, antes *versus* seis meses. ## P < 0,05, 24h *versus* seis meses. ### P < 0,05 antes *versus* 24h.

Figura 17 – Atividade de TNF- α , medida em pg/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # P <0,05, antes versus 6 meses. ## P <0,05, 24 hs versus 6 meses. ### P <0,05 antes versus 24 h.

As figuras de 18 e 19 mostram o comportamento das citocinas anti-inflamatórias (IL10 e TGF-beta).

Figura 18 – Atividade da IL-10, medida em pg/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # P <0,05, antes versus seis meses. ## P <0,05, 24h versus seis meses. ### P <0,05 antes versus 24h.

Figura 19 – Atividade da TGF- β , medida em pg/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # $P < 0,05$, antes *versus* seis meses. ## $P < 0,05$, 24h *versus* seis meses. ### $P < 0,05$ antes *versus* 24h.

A Tabela 9 mostra os testes de comparações das médias utilizados para a estatística das citocinas e seus respectivos p-valores.

Tabela 9 – Teste de comparações das médias das citocinas nos diferentes tempos – antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C)

Variável	Tempos	p-valor comparações	p-valor Teste	Teste utilizado	Post-hoc
IL 1 Beta	A - B	0.00054***			
	A - C	1.89 ⁻¹¹ ***	2.65 ⁻¹¹ ***	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	0.00524**			
IL 6	A - B	1.65 ⁻⁹ ***		ANOVA	
	A - C	0***	5.22 ⁻³⁶ ***	para medidas repetidas	Tuckey
	B - C	0***			
IL 8	A - B	0.89175			
	A - C	7.24 ⁻⁸ ***	1.08 ⁻⁹ ***	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	1.04 ⁻⁷ ***			
TNT Alfa	A - B	0.00972**			
	A - C	3.04 ⁻¹¹ ***	3.63 ⁻¹¹ ***	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	0.00004***			
IL 10	A - B	0.58621			
	A - C	3.22 ⁻⁷ ***	7.72 ⁻¹⁰ ***	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	2.19 ⁻⁸ ***			
TGF Beta	A - B	0.02474*			
	A - C	0.00002***	0.00002***	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	0.02474*			

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

5.2.2 Sistema calicreínas-cininas

5.2.2.1 Cininogênios

Constatou-se que a atividade do cininogênio de alto peso molecular (CAPM) e de baixo peso molecular (CBPM) diminuiu significativamente no decorrer do tempo, com exceção da análise do CAPM entre os tempos 24h e seis meses, em que houve apenas tendência à diminuição, sem significado estatístico.

A Tabela 10 apresenta o comportamento das concentrações do CAPM e CBPM em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, expressos em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea e implante de *carbostent*. Esse coeficiente avalia a dispersão dos dados em torno da média. Quanto menor o seu valor, mais homogêneo são seus dados. Ele varia de 0 a 100%.

Tabela 10 – Cininogênio de alto peso molecular (CAPM) e de baixo peso molecular (CBPM), em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, expressos em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C)

Medidas	CAPM			CBPM		
	A	B	C	A	B	C
Min	1,2	0,8	0,6	2,0	1,3	0,8
Max	1,8	1,8	1,5	2,5	2,5	1,4
Média	1,4	1,2	1,0	2,3	2,0	1,1
Mediana	1,4	1,2	1,0	2,3	2,0	1,1
* CV	12,97%	21,11%	24,55%	8,62%	12,03%	13,57%

* CV = Coeficiente de variação

As figuras 20 e 21 mostram o comportamento do cininogênio de alto peso molecular (CAPM) e de baixo peso molecular (CBPM).

Figura 20 – Atividade do CAPM medida em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # $P < 0,05$, antes *versus* seis meses. ## $P < 0,05$, 24h *versus* seis meses. ### $P < 0,05$ antes *versus* 24h.

Figura 21 – Atividade do CBPM medida em mcg equivalentes (Eq) de bradicinina (BK)/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # $P < 0,05$, antes *versus* seis meses. ## $P < 0,05$, 24h *versus* seis meses. ### $P < 0,05$ antes *versus* 24h.

A Tabela 11 mostra os testes de comparações das médias utilizados para a estatística dos cininogênios e seus respectivos p-valores.

Tabela 11 – Teste de comparações das médias dos cininogênios nos diferentes tempos – antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C)

Variável	Tempos	p-valor comparações	p-valor Teste	Teste utilizado	Post-hoc
CAPM	A - B	0.00218**			
	A - C	1.00 ⁻⁶ ***	1.07 ⁻⁶ ***	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	0.06619			
CBPM	A - B	0.00426**			
	A - C	1.17 ⁻¹¹ ***	1.70 ⁻¹¹ ***	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	0.00008***			

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

5.2.2.2 Caliceínas

A análise das caliceínas também mostra concordância com os níveis decrescentes dos seus substratos, o CAPM e CBPM. Observa-se que houve redução significativa na atividade da caliceína tecidual no decorrer do tempo, com exceção da análise entre os tempos 24h e seis meses, tanto da caliceína plasmática quanto da caliceína tecidual.

A Tabela 12 apresenta o comportamento das concentrações da caliceína plasmática e caliceína tecidual, em U/ml e μM pNa/ mL plasma, respectivamente, expressos em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea e implante de *carbostent*. Esse coeficiente avalia a dispersão dos dados em torno da média. Quanto menor o seu valor, mais homogêneo são seus dados. Ele varia de 0 a 100%.

Tabela 12 – Caliceína plasmática e caliceína tecidual, em U/ml plasma, expressas em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent*

Medidas	CAL PLASMÁTICA			CAL TECIDUAL		
	A	B	C	A	B	C
Min	2,0	1,8	1,6	1,4	1,3	1,3
Max	3,1	2,5	2,0	2,9	2,0	1,9
Média	2,5	2,0	1,8	1,8	1,6	1,6
Mediana	2,4	1,9	1,8	1,7	1,5	1,6
* CV	11,99%	8,52%	6,44%	21,20%	12,48%	11,51%

* CV = Coeficiente de variação

As figuras 22 e 23 mostram o comportamento dos níveis séricos de caliceína plasmática e tecidual.

Figura 22 – Atividade da caliceína plasmática, medida em U/ml plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # $P < 0,05$, antes *versus* seis meses. ## $P < 0,05$, 24h *versus* seis meses. ### $P < 0,05$ antes *versus* 24h.

Figura 23 – Atividade da caliceína tecidual, medida em $\mu\text{M pNa/mL plasma}$, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # $P < 0,05$, antes *versus* seis meses. ## $P < 0,05$, 24h *versus* seis meses. ### $P < 0,05$ antes *versus* 24h.

A Tabela 13 mostra os testes de comparações das médias utilizados para a estatística das caliceínas e seus respectivos p-valores.

Tabela 13 – Teste de comparações das médias das caliceínas nos diferentes tempos – antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C)

Variável	Tempos	p-valor comparações	p-valor Teste	Teste utilizado	Post-hoc
CAL PLASMÁTICA	A - B	0.00001***			
	A - C	4.19^{-9} ***	5.74^{-10} ***	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	0.13441			
CAL TECIDUAL	A - B	0.00120**			
	A - C	0.03448*	0.00101**	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	0.24739			

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

5.2.2.3 Cininase II

Houve aumento significativo da atividade enzimática da cininase II tanto no tempo 24 horas quanto no tempo seis meses, em relação ao controle pré-tratamento. Não houve alteração com significado estatístico entre o tempo 24h e o tempo seis meses.

A Tabela 14 apresenta o comportamento das concentrações da cininase II em μM His-Leu U/mL plasma, expressas em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea e implante de *carbostent*. Esse coeficiente avalia a dispersão dos dados em torno da média. Quanto menor o seu valor, mais homogêneo são seus dados. Ele varia de 0 a 100%.

Tabela 14 – Cininase II em μM His-Leu U/mL plasma, expressa em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent*

Medidas	CININASE II		
	A	B	C
Min	0,8	1,2	1,2
Max	1,5	2,2	2,0
Média	1,1	1,6	1,6
Mediana	1,1	1,6	1,6
* CV	18,89%	18,17%	17,58%

* CV = Coeficiente de variação

A Figura 24 mostra o comportamento das concentrações de cininase II nos diferentes tempos.

Figura 24 – Atividade da cininase II em μM His-Leu U/mL plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # $P < 0,05$, antes *versus* seis meses. ## $P < 0,05$, 24h *versus* seis meses. ### $P < 0,05$ antes *versus* 24 h.

A Tabela 15 mostra os testes de comparações das médias utilizados para a estatística da cininase II e seus respectivos p-valores.

Tabela 15 – Teste de comparações das médias da cininase II nos diferentes tempos – antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C)

Variável	Tempos	p-valor comparações	p-valor Teste	Teste utilizado	Post-hoc
CININASE II	A - B	7.43^{-9} ***	7.19^{-11} ***	ANOVA para medidas repetidas	Tuckey
	A - C	1.44^{-9} ***			
	B - C	0.92833			

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

5.2.3 Nitritos e nitratos – NO

Não houve diferença entre os tempos na atividade do NO com base na dosagem de nitritos e nitratos. A tabela 16 mostra os valores do NO, com base na dosagem de nitritos e nitratos nos diferentes tempos, expressos em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação. Esse coeficiente avalia a dispersão dos dados em torno da média. Quanto menor o seu valor, mais homogêneo são seus dados. Ele varia de 0 a 100%.

Tabela 16 – NO, representado pela concentração de nitritos/nitratos medida em micromolar (μM) expresso em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent*.

Medidas	NO		
	A	B	C
Min	24,6	21,5	22,9
Max	170,0	93,9	164,3
Média	68,9	55,0	61,3
Mediana	64,3	55,1	55,0
* CV	51,90%	37,96%	47,60%

* CV = Coeficiente de variação

A Figura 25 mostra o comportamento das concentrações de NO nos diferentes tempos.

Figura 25 – Atividade do óxido nítrico representado pela concentração de nitritos/nitratos medida em micromolar ($\mu\text{M/ml}$), antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo.

A Tabela 17 mostra os testes de comparações das médias utilizados para a estatística do NO e seus respectivos p-valores.

Tabela 17 – Teste de comparações das médias de NO nos diferentes tempos, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C)

Variável	Tempos	p-valor comparações	p-valor Teste	Teste utilizado	Post-hoc
NO	A - B	0.34713	0.25401	Friedman	Simes-Hochberg
	A - C	0.89175			
	B - C	0.34713			

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

5.2.4 Proteína C Reativa (PCR)

Houve uma tendência a elevação da PCR, sem significado estatístico, no tempo 24h, em relação ao controle pré-tratamento, e uma redução significativa de seus níveis em seis meses, quando comparado com o tempo 24h (p<0,01).

A Tabela 18 apresenta o comportamento das concentrações da PCR, em mg/dl plasma, expressas em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea e implante de *carbostent*. Esse coeficiente avalia a dispersão dos dados em torno da média. Quanto menor o seu valor, mais homogêneo são seus dados. Ele varia de 0 a 100%.

Tabela 18 – PCR em mg/dl plasma, expressa em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea e implante de *carbostent* (C)

Medidas	PCR		
	A	B	C
Min	0,1	0,1	0,1
Max	7,7	6,4	8,0
Média	1,3	2,0	1,1
Mediana	0,7	0,9	0,4
* CV	123,88%	103,88%	159,31%

* CV = Coeficiente de variação

A Figura 26 mostra o comportamento das concentrações de PCR nos diferentes tempos.

Figura 26 – Atividade da PCR em mg/dl plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*.

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # $P < 0,05$, antes *versus* seis meses. ## $P < 0,05$, 24h *versus* seis meses. ### $P < 0,05$ antes *versus* 24h.

A Tabela 19 mostra os testes de comparações das médias utilizados para a estatística da PCR e seus respectivos p-valores.

Tabela 19 – Teste de comparações das médias de PCR nos diferentes tempos, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C).

Variável	Tempos	p-valor comparações	p-valor Teste	Teste utilizado	Post-hoc
PCR	A - B	0.13238			
	A - C	0.15304	0.00446**	Friedman	Simes-Hochberg
	B - C	0.00327**			

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

5.2.5 Leucócitos

A atividade dos leucócitos mostrou elevação estatisticamente significativa no tempo 24 horas, em relação ao controle pré-tratamento ($p < 0,05$), seguida de queda, estatisticamente significativa, no tempo seis meses, comparado com o tempo 24h ($p < 0,01$). Não houve alteração significativa entre os tempos seis meses e pré-tratamento.

A Tabela 20 apresenta o comportamento das concentrações dos leucócitos, em mg/dl plasma, expressas em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação antes, 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea e implante de *carbostent*. Esse coeficiente avalia a dispersão dos dados em torno da média. Quanto menor o seu valor, mais homogêneo são seus dados. Ele varia de 0 a 100%.

Tabela 20 – Leucócitos em mg/dl plasma, expressos em média, mediana, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea e implante de *carbostent* (C)

Medidas	LEUC		
	A	B	C
Min	3,3	3,9	3,9
Max	13,1	14,2	11,4
Média	7,6	9,2	7,2
Mediana	7,2	9,3	7,4
* CV	27,41%	29,78%	27,83%

* CV = Coeficiente de variação

A Figura 27 mostra o comportamento das concentrações de Leucócitos nos diferentes tempos.

Figura 27 – Atividade dos Leucócitos em mg/dl plasma, antes, em 24 horas e seis meses após angioplastia transluminal percutânea com *carbostent*

Legenda: O gráfico de caixa (*Box plot*) indica a mediana, a faixa de valores entre os percentis 25 e 75 e a faixa entre os valores mínimo e máximo. # $P < 0,05$, antes *versus* seis meses. ## $P < 0,05$, 24h *versus* seis meses. ### $P < 0,05$ antes *versus* 24h.

A Tabela 21 mostra os testes de comparações das médias utilizados para a estatística dos leucócitos e seus respectivos p-valores.

Tabela 21 – Teste de comparações das médias de leucócitos nos diferentes tempos, antes (A), 24 horas (B) e seis meses após angioplastia transluminal percutânea + *carbostent* (C)

Variável	Tempos	p-valor comparações	p-valor Teste	Teste utilizado	Post-hoc
LEUC	A - B	0.02128*	9.92 ⁻⁵ ***	ANOVA para Medidas Repetidas	Tuckey
	A - C	0.84198			
	B - C	0.00429**			

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A reestenose decorrente da hiperplasia intimal permanece como um problema complexo, contribuindo para significativas morbidade e mortalidade, além de dispendioso custo após procedimentos de revascularização. Apesar dos diversos estudos que vêm sendo desenvolvidos, os fatores que contribuem para a reestenose intra-*stent*, principalmente no território periférico, ainda não foram totalmente elucidados (JOVILIANO et al., 2011; LOWE et al., 2002). Novos modelos de *stents*, mudanças na estrutura e composição dos materiais, tais como o revestimento de suas superfícies, têm sido desenvolvidos, porém a reestenose tem permanecido como a maior limitação para a utilidade clínica do procedimento em questão.

Sabe-se que a inflamação vascular desempenha papel importante na proliferação de células do músculo liso vascular e posterior crescimento de neoíntima hipertrófica (hiperplasia intimal), no entanto questiona-se se a composição dos dispositivos e de sua superfície poderia influenciar no processo inflamatório e, conseqüentemente, nas taxas de perviedade dos vasos tratados. Até o presente momento, poucos trabalhos clínicos demonstram o comportamento dos mediadores inflamatórios diante do procedimento de angioplastia com implante de *stent* no território vascular periférico; nenhum deles, com *carbostent*, dispositivo com superfície impregnada de carbono. Na literatura, não temos dados sobre a perviedade desse material em território periférico, somente em território coronário.

Esta pesquisa clínica estudou a perviedade e o processo inflamatório subjacente à ATP com colocação de *stent* impregnado de carbono no território vascular periférico, mediante avaliação dos sistemas das citocinas, cininas, NO e PCR, além da análise dos níveis séricos de leucócitos. Esses sistemas apresentam diversos e complexos papéis em inúmeras condições fisiopatológicas de diversas doenças. A compreensão da atividade inflamatória envolvida no implante do *carbostent* poderá fornecer subsídios importantes para a busca de alternativas terapêuticas e melhoramento dos dispositivos.

Nos últimos anos, desenvolveram-se estudos sobre os *stents* com superfície impregnada de carbono e seu efeito na ativação plaquetária, trombogenicidade e liberação de íons metálicos. A liberação de metais como Ni, Cr, Mo e Mn foi confirmada, *in-vitro*, a partir de *stents* convencionais em contato com plasma humano por quatro dias, mas nenhuma liberação de íons metálicos foi observada para *stents* com superfície impregnada de carbono (GUTENSOHN et al., 2000; FEDEL et al., 2010). A maior biocompatibilidade desse material foi constatada, histologicamente, em modelos animais, com a demonstração de que *stents*

impregnados de carbono produzem re-endotelização precoce e proliferação miointimal reduzida (PRUNOTTO, et al., 2005; KIM, et al., 2011).

De 2000 a 2007, motivados por resultados *in-vitro* e em modelos animais, foram publicados inúmeros estudos a respeito da perviedade dos *stents* impregnados de carbono no território coronário, todos com resultados controversos em relação à perviedade do dispositivo. Nesse período, foi demonstrado não haver diferença estatística entre a perviedade dos *stents* impregnados de carbono e os *stents* convencionais nesse território (HAASE et al., 2003; SICK et al., 2004).

Recentemente, em 2017, foi publicado um estudo japonês, conduzido por 19 centros no país, envolvendo 99 pacientes submetidos à angioplastia e implante de *stents* com superfície impregnada de carbono em território coronário. Avaliou-se a taxa de falha no tratamento do vaso, além da taxa de reestenose do vaso tratado após nove meses de seguimento. Demonstrou-se taxa de reestenose de 10,5% e taxa de falha no tratamento do vaso de 11,2%, valores inferiores aos observados em estudos prévios com dispositivos convencionais no mesmo território (15,7% e 19,6%, respectivamente). Nenhuma trombose intra-*stent* foi observada. Esses resultados sugerem concordância com a hipótese de que a superfície impregnada de carbono promove maior biocompatibilidade, menor reação inflamatória e trombogenicidade (ANDO et al., 2017), porém novas pesquisas são necessárias para tornar esta hipótese uma afirmação.

Diante das evidências e controvérsias em relação ao uso de *stents* com superfície impregnada de carbono, esta pesquisa clínica teve por finalidade demonstrar o comportamento do dispositivo no território ilíaco-fêmoro-poplíteo, com base no estudo da perviedade e da quantificação sérica de mediadores inflamatórios, descrevendo, também, as características clínicas e demográficas da população estudada.

No presente estudo houve predominância do sexo feminino, e os principais fatores de risco foram: hipertensão arterial, diabetes melito, dislipidemia e tabagismo, com prevalência esperada para doentes com DAOP dos membros inferiores. As principais medicações em uso estão relacionadas com as patologias e fatores de riscos citados acima, destacando-se os diuréticos, betabloqueadores, inibidores da ECA e os bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA). Os efeitos da angiotensina II no estímulo hipertrófico e proliferativo sobre as células musculares lisas e, por conseguinte, na contribuição à hiperplasia intimal estão bem estabelecidos (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 dados encontrados são compatíveis com os resultados dos últimos trabalhos nesta linha de pesquisa

(ARAÚJO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2014; ROCHA et al., 2015). Nestes, encontra-se população semelhante quanto às características clínicas e lesões tratadas: tamanho do *stent* utilizado, presença de oclusão ou estenose e quanto ao número de artérias périas em perna (deságue). Os dados clínicos e demográficos desta pesquisa diferem-se dos estudos citados por dois aspectos: nesta, há maior número de doentes do sexo feminino e apresentando-se clinicamente com claudicação limitante, ao passo que, nos trabalhos anteriores, o sexo masculino prevalece e a apresentação clínica é isquemia crítica em sua maioria.

Os resultados da presente pesquisa mostraram taxas de reestenose muito inferiores a estudos prévios com outros *stents*: Araújo et al. e Ribeiro et al., estudando *stents* de nitinol sem revestimento, encontraram taxas de reestenose de 38,5% em seis meses de seguimento; Rocha et al., estudando *stents* revestidos de politetrafluoretileno (PTFE), taxa de 14,8% de reestenose; enquanto os resultados desta pesquisa mostraram 3,7% de reestenose em seis meses e 5% em 12 meses de seguimento após angioplastia com implante de *stent* com superfície impregnada de carbono. Há estudos relatando taxa de reestenose que pode atingir até 60% no primeiro ano do procedimento, com *stents* não recobertos (SCHILLINGER et al., 2001).

Observou-se elevação expressiva do índice tornozelo braquial (ITB) 24 horas após o procedimento, mantendo-se a média elevada após seis meses, demonstrando o sucesso técnico atingido e a manutenção da perviedade dos *stents* impregnados de carbono.

Este estudo mostrou resultados animadores quanto à perviedade dos *stents* com superfície impregnada de carbono implantados no território periférico, porém trata-se apenas de resultados preliminares de estudo com braço único e casuística considerada pequena para que sejam tomadas conclusões em relação ao comportamento do dispositivo nessa localização. Já sabemos que as diferentes artérias, localizadas em diferentes territórios, respondem de maneiras diferentes em relação ao processo inflamatório e à formação de hiperplasia intimal (AHMADI et al., 2001; ADAR et al., 1989; JEANS et al., 1990; MATSI et al., 1994; GALLINO et al., 1984), assim, torna-se de extrema importância, além de se conhecer o comportamento do dispositivo nos diferentes territórios, entender o processo inflamatório envolvido na angioplastia e implante de *stent* impregnado de carbono.

A atividade inflamatória vascular antes da intervenção e a extensão da resposta inflamatória à angioplastia e colocação do *stent* parecem influenciar os resultados pós-angioplastia (JOHNSTON KW, 1992; BUFFON et al., 1999). Os pacientes incluídos no presente estudo já apresentavam um processo inflamatório crônico caracterizado pela presença de um processo aterosclerótico intenso e enfatizado pela própria isquemia e pelas

comorbidades que intensificam esse processo inflamatório (hipertensão arterial sistêmica, diabetes, tabagismo, etc.), fato este claramente evidenciado com a queda de todos os valores das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) e aumento das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) após o implante dos *stents*.

Os efeitos deletérios das citocinas pró-inflamatórias, particularmente das interleucinas imunomodulatórias na fisiopatologia vascular e desenvolvimento de intensa inflamação, têm se tornado intenso material de estudo (CUNEO; AUTIERI, 2009). Evidências circunstanciais relacionam citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a esses processos (WARNER; LIBBY, 1989; CLAUSEL et al., 1995). Particularmente, o TNF- α induz um aumento substancial na expressão da molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) por células musculares lisas humanas *in vitro* (LIBBY, 1997; COUFFINHAL et al., 1993), bem como seus níveis elevados têm sido localizados em áreas de injúria arterial (COUFFINHAL et al., 1993; JOVINGE et al., 1997; TANAKA, 1996) e em artérias com intensa atividade aterosclerótica (RUS; NICULESCO; VLAICU, 1991). A interleucina 6 (IL-6) representa um elemento-chave na cascata inflamatória vascular após angioplastia com balão, estando diretamente envolvida na regulação da resposta de fase aguda. O polimorfismo funcional no promotor do gene da IL-6 foi demonstrado como modulador da expressão da citocina na resposta à injúria vascular (BRULL et al., 2001). Assim, esse polimorfismo produtor de IL-6 estava associado ao risco de reestenose observada um ano após ATP do segmento fêmoro-poplíteo numa extensa série de pacientes (EXNER et al., 2004), indicando um potencial envolvimento de genes pró-inflamatórios no processo reestenótico. Foi observado que os níveis de IL-6, IL-8 e TNF- α apresentavam-se elevados seis horas após *stent* coronariano (Caixeta, 2007). Contudo, Caixeta et al. não observaram nenhuma correlação entre a concentração sérica de IL-6 e reestenose após seis meses, mas houve significativa elevação após 24h do implante do *stent*. Em nosso estudo, a atividade da IL-6 e das demais citocinas inflamatórias apresentaram queda estatisticamente significativa nos tempos 24h e seis meses pós procedimento, contrariando os resultados existentes na literatura. Este dado indica a complexidade da resposta inflamatória envolvida no processo de angioplastia e implante de *stents* e a necessidade de novos trabalhos na tentativa de elucidar o comportamento dos mediadores inflamatórios.

Níveis elevados de PCR indicam risco cardiovascular aumentado em indivíduos saudáveis, bem como em pacientes sintomáticos com doença aterosclerótica (SCHILLINGER; MINAR, 2005). O estudo dos níveis séricos de PCR pode indicar a intensidade do processo inflamatório da doença e, conseqüentemente, o grau de sua atividade.

Seus valores elevados no pré-procedimento podem representar uma maior atividade da doença e, assim, uma maior susceptibilidade ao remodelamento vascular hipertrófico e formação excessiva da neointima após lesão da média e da íntima. Schillinger et al. (2005) observaram que níveis séricos elevados de PCR no pré-procedimento e sua manutenção durante os primeiros dias após a angioplastia estavam associados à reestenose do segmento fêmoro-poplíteo (SCHILLINGER et al., 2005). Os níveis de PCR pré-procedimento têm sido reportados como um fator de risco independente para reestenose após angioplastia coronariana e periférica (JOVILIANO et al., 2011).

Neste estudo, foi constatado que os níveis de PCR pré-procedimento encontravam-se em valores inferiores aos resultados obtidos nessa mesma linha de pesquisa (ARAÚJO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2014; ROCHA et al., 2015). Isso pode ter ocorrido devido a diferenças nas características clínicas da população estudada (predomínio de pacientes com claudicação ao invés de isquemia crítica). A isquemia crítica, com dor em repouso ou lesão trófica ativa, poderia representar uma situação de estímulo constante ao processo inflamatório, mantendo os níveis elevados de PCR antes do procedimento. Os valores baixos de PCR no pré-procedimento poderiam ter contribuído com as baixas taxas de reestenose encontradas no presente estudo, em concordância com os dados apresentados por Joviliano et al. (2011).

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.

Observou-se redução nas concentrações, tanto do CAPM quanto do CBPM, ao longo do tempo. A dosagem das calicreínas plasmática e tecidual acompanhou a queda observada na quantificação dos cininogênios. As cininas são geradas por clivagem proteolítica dos cininogênios pelas calicreínas. Portanto, pode-se inferir que a produção de cininas apresenta crescimento após a angioplastia com implante de *stent*. 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; ZAHRAKKA, 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, nos diferentes dispositivos e territórios, na tentativa de demonstrar se terapias direcionadas para esse sistema serão efetivas.

Houve aumento significativo da atividade da cininase II (enzima responsável pela clivagem e inativação da BK) no decorrer dos seis meses pós procedimento. 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.

Na presente linha de pesquisa, Rocha et al. (2015) reproduziu resultados semelhantes em relação ao comportamento do SCC frente ao procedimento de ATP + implante de *stent* revestidos de politetrafluoretileno (PTFE), além de demonstrar que, no grupo com reestenose, houve redução do CAPM após 24 horas do procedimento e menores níveis de CBPM em todos os tempos.

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.

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, entre 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-se 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.

No presente estudo, notam-se níveis iniciais de nitritos e nitratos expressivamente superiores aos estudos anteriores nesta linha de pesquisa, apresentados por Rocha et al. e Ribeiro et al. Diante dos efeitos protetores do óxido nítrico, além de marcador de disfunção endotelial, talvez isso explique as baixas taxas de reestenose encontradas, diante de um

endotélio com menores danos iniciais. Não houve alterações séricas nos níveis de nitrito e nitrato entre os tempos do procedimento.

Por fim, em relação à concentração de leucócitos, houve um aumento estatisticamente relevante nas primeiras 24 horas como era de se esperar, provavelmente devido à resposta inflamatória ao trauma, retornando aos níveis basais, semelhante aos níveis pré-procedimento, no tempo de seis meses.

Apresentando uma análise abrangente e crítica sobre os resultados desta pesquisa, temos, inicialmente, a informação das excelentes taxas de perviedade primária do *stent* com superfície impregnada de carbono. Porém, uma avaliação comparativa detalhada dos dados clínicos, demográficos e laboratoriais entre os estudos da mesma linha de pesquisa abre espaço para diferentes interpretações e questionamentos dos resultados: primeiro, partindo-se da informação de que a característica clínica apresentada na maioria dos casos dos estudos anteriores foi isquemia crítica, questiona-se se isso representaria a causa de processo inflamatório e dano endotelial prévios mais intensos, demonstrado pelos mais altos níveis de PCR e baixos níveis de NO dos estudos anteriores em relação à presente pesquisa; segundo, se o menor estado inflamatório pré-procedimento desta pesquisa teria influência nas baixas taxas de reestenose encontradas. Caso esta hipótese seja verdadeira, isso poderia sugerir que os pacientes submetidos à angioplastia com implante de *stent* em estágios clínicos iniciais da doença aterosclerótica teria prognóstico melhor em relação a perviedade a médio prazo. Isso poderia influenciar na decisão sobre o melhor momento para se intervir em pacientes com DAOP dos membros inferiores, sugerindo a intervenção antes que a doença se apresente como isquemia crítica, evidenciada clinicamente pela dor de repouso ou lesão trófica.

A principal limitação deste estudo foi o pequeno número de pacientes que certamente refletiu sobre altos desvios-padrão e coeficientes de variabilidade. Associa-se a esse fato, a alta taxa de perviedade primária, que contribuiu para impossibilitar a formação de um grupo de doentes com reestenose. Houve também a falta de um grupo de pacientes que se submeteram a ATP e colocação de *stents* convencionais, sem cobertura de carbono. Assim, não pudemos comparar a perviedade e atividade inflamatória nos dois tipos de *stents* em um único estudo. Prescindiu-se ainda, neste estudo, de um grupo controle de pacientes com DAOP submetidos apenas à arteriografia, pois Ribeiro et al. (2014) e Araújo et al., em trabalhos realizados anteriormente, 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, antes e/ou depois da

intervenção, 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* impregnados de carbono. O presente estudo demonstrou a alta taxa de perviedade primária a médio prazo e a repercussão do trauma da angioplastia com implante de *stents* impregnados de carbono no território vascular periférico, através da dosagem de diversos possíveis marcadores. O número limitado de pacientes e a complexidade inerente do processo inflamatório justificam o planejamento de novos estudos para aprofundar os dados a respeito dessa importante condição clínica.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

7.1 Conclusão geral

Concluimos que, em curto e médio prazos, os indivíduos tratados com *stents* impregnados de carbono apresentaram boa evolução clínica e baixas taxas de reestenose no tratamento da doença arterial obstrutiva periférica no segmento ilíaco-fêmoro-poplíteo. A perviedade primária foi de 96,3% em seis meses de seguimento e 95% no período de 12 meses.

Foi possível demonstrar o envolvimento dos sistemas das citocinas, calicreína-cinina e PCR na resposta inflamatória provocada pela colocação dos *stents* impregnados de carbono.

7.2 Conclusões específicas

- A elevação da média do índice tornozelo braquial de 0,5 (pré-tratamento) para 0,9 (24h) e 0,8 após seis meses do procedimento evidenciou adequada correlação com a evolução clínica dos pacientes, sucesso técnico e perviedade dos *stents* impregnados de carbono;
- A incidência de reestenose em pacientes tratados com ATP e colocação de *stents* impregnados de carbono no segmento ilíaco-fêmoro-poplíteo foi de 3,7% nos seis meses iniciais e de 5% em 12 meses de seguimento;
- Os níveis séricos de nitrito/nitrato não se alteraram nos tempos avaliados na presente pesquisa (antes do procedimento, 24h e seis meses após a ATP com colocação de *stents* impregnados de carbono);
- Houve uma correlação direta entre o implante do *stents* impregnados de carbono e alterações no sistema das citocinas, com diminuição dos níveis das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α) e elevação das anti-inflamatórias (IL-10 e TGF β) ao longo do tempo;
- Os níveis de proteína C reativa e de leucócitos também foram influenciados pelo implante de *stents* impregnados de carbono. Houve elevação dos níveis de ambos no tempo 24 horas em relação ao pré-tratamento, com significado estatístico apenas com os leucócitos. No tempo de seis meses, em ambos os marcadores, houve uma queda estatisticamente significativa em relação ao tempo 24h.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAR, R.; CRITCHFIELD, G. C.; EDDY, D. M. A confidence profile analysis of the results of femoropopliteal percutaneous transluminal angioplasty in the treatment of lower-extremity ischemia. **Journal of Vascular Surgery**, v. 10, p. 57-67, 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2526233>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

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: 2 marc. 2014.

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: 9 dez. 2013.

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: 15 dez. 2013.

AHN, S. Y. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces fractalkine expression preferentially in arterial endothelial cells and mithramycin A suppresses TNF-alpha-induced fractalkine expression. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1663-1672, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15111313>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

AIROLDI F. et al. Comparison of diamond like carbon coated stents versus uncoated stainless steel stents in coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v. 93, p. 474-477, 2004.

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>>. Acesso em: 5 out. 2015.

ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. **Annual Review Immunology**, v. 22, p. 503-29, 2009. Review. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032587>>. Acesso em: 22 fev. 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: 10 jun. 2015.

ANDO, K. et al. Prospective multi-center registry to evaluate efficacy and safety of the newly developed diamond-like carbon-coated cobalt–chromium coronary stent system. **Cardiovasc Interv and Ther**, v. 32, p. 225–232, 2017.

ANTONIUCCHI, D. et al. Clinical and Angiographic Outcome After Coronary Arterial Stenting With the Carbstent. **Am J Cardiol**, v.85, p. 821–825, 2000.

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: 12 ago. 2016.

ATZENI, F.; SARZI-PUTTINI, P. Anti-cytokine antibodies for rheumatic diseases. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 10, n. 11, p. 1204-11, Nov. 2009. Review. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876788>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

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: 30 jan. 2014.

BARTORELLI, A.L.; TRABATTONI, D.; MONTORSI, P. Aspirin alone anti-platelet regimen after intracoronary placement of the Carbo-stent: The ANTARES study. **Catheter Cardiovasc Interv**, v. 55, p. 150–156, 2002.

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 nov. 2016.

BELCH, J. J. et al. The white blood cell adhesion molecule E-selectin predicts restenosis in patients with intermittent claudication undergoing percutaneous transluminal angioplasty. **Circulation**, v. 95, n. 8, p. 2027-31, apr. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133511>>. Acesso em: 27 set. 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: 13 abr. 2016.

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: 18 nov. 2014.

BITO, K. et al. 2017. In vitro basic fibroblast growth factor (bFGF) delivery using an antithrombogenic 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer coated with a micropatterned diamond-like carbon (DLC) film. **J Biomed Mater Res Part A**, v.105, p. 3384-3391, 2017.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, n. 1, p. 235-243, 1997.

BORING, L. et al. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. **Nature**, v. 394, n. 6696, p. 894-897, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732872>>. Acesso 2 fev. 2015.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S460-475, 2003.

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

BRULL, D. J. et al. Interleukin-6 gene -174G>C and -572G>C promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 9, p. 1457-63, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557672>>. Acesso em: 27 maio 2014.

BUFFON, A. et al. Preprocedural serum levels of creactive protein predict early complications and late restenosis after coronary angioplasty. **J Am Coll Cardiol**, v. 34, n. 5, p. 1512-21, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551701>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

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 ago. 2016.

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: 23 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: 19 fev. 2016.

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: 25 maio 2017.

CASEY, L. C. Immunologic Response to Infection and its Role in Septic Shock. **Critical Care Clinics**, v. 16, n. 2, p. 193-213, 2000.

CASTELLINO, M. et al. Chemico-physical characterisation and in vivo biocompatibility assessment of DLC-coated coronary stents. **Anal Bioanal Chem**, v. 405 p. 321–329, 2013.

CAIXETA, A. M. et al. Enhanced inflammatory response to coronary stenting marks the development of clinically relevant restenosis. **Catheterization Cardiovascular Interventions**, v. 69, n. 4 p. 500-7, mar. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17285569>>. Acesso 2 set. 2015.

CASTRO, J. R.; PEREIRA, A. H.; PASA, M. B. Morphometric Analysis of the Intimal Reaction after Stent Implantation in iliac arteries submitted to angioplasty in pigs. **Acta Cir Bras**, v. 21, n.3, p. 139-142, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502006000300004>. Acesso em 26 set. 2015.

CAVAILLON, J. M. Molecular mediators: Cytokines. In: MEYERS, R. A. (Org.). **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**. 2 ed. Alemanha: Wiley-VCH Verlag, 2005, v. 8, p. 431-460. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600906.mcb.200400134/full>>. Acesso em 14 jan. 2014.

CEJNA, M. et al. PTA versus Palmaz stent placement in femoropopliteal artery obstructions: a multicenter prospective randomized study. **J Vasc Interv Radiol**, v. 12, n. 1, p. 23-31, jan. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11200349>>. Acesso 29 jun. 2017.

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: 19 set. 2016.

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: 29 abr. 2016.

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: 31 out. 2014.

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, 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 3 dez. 2014.

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 24 mar. 2015.

CIPOLLONE, F. et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. **Circulation**, v. 104, n. 8, p. 921-7, Aug. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514380>>. Acesso em: 11 fev. 2016.

CLAUSELL, N. et al. Expression of tumour necrosis factor alpha and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. **Br Heart J**, v. 73, n. 6, p. 534-539, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC483915/>>. Acesso em: 4 nov. 2014.

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 21 out. 2014.

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 10 jun. 2017.

CONTE, M. S. At al. SOCIETY FOR VASCULAR SURGERY LOWER EXTREMITY GUIDELINES WRITING GROUP. Society for Vascular Surgery practice guidelines for atherosclerotic occlusive disease of the lower extremities: management of asymptomatic disease and claudication. **Journal Vascular Surgery**, v. 61, n. 3, Supplement, 2S-41S, mar. 2015. Epub, 28 jan. 2015. Disponível em: <[http://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214\(14\)02284-8/abstract](http://www.jvascsurg.org/article/S0741-5214(14)02284-8/abstract)>. Acesso em: 1 dez. 2016.

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: 16 nov. 2015.

CULP LA, MURRAY B.A.; ROLLINS B.J. Fibronectin and proteoglycans as determinantes of cell substratum adhesion. **J Supramol Struct**, v. 11, p. 401-427, 1979.

CUNNEEN, J.; CARTWRIGHT, M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. **AACN Clinical Issues**, v. 15, n. 1, p. 18-44, 2004.

CUNEO, A. A.; AUTIERI, M. V. Expression of Anti-inflammatory Interleukins: The Other Side of the Vascular Response to Injury. **Current Vascular Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 1- 10, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19601851>>. Acesso em: 11. Jul. 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: 19 maio 2016.

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: 9 nov. 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: 26 jan. 2017.

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: 7 set. 2015.

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: 14 fev. 2014.

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: 17 mar. 2017.

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: 25 out. 2016.

DEL VECCHIO, A. et al. The role of molecular genetics in the pathogenesis and diagnosis of neonatal sepsis. **Clinics in Perinatology**, v. 31, n. 1, p. 53-67, 2004. Acesso em: 4 nov. 2014.

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: 10 out. 2016.

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: 24 nov. 2015.

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: 29 jan. 2017.

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: 2 out. 2016.

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: 27 out. 2016.

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: 15 mar. 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: 13 set. 2016.

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: 16 dez. 2014.

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: 20 nov. 2015.

EXNER, M. et al. Interleukin-6 promoter genotype and restenosis after femoropopliteal balloon angioplasty: initial observations. **Radiology**, v. 231, n. 3, p. 839-44, June 2004. Disponível em: <<http://pubs.rsna.org/doi/full/10.1148/radiol.2312030707>>. Acesso em: 7 jul. 2015.

FARB, A. et al. Pathology of acute and chronic coronary *stenting* in humans. **Circulation**, v. 99, p. 44-52, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9884378>>. Acesso em: 19 fev. 2015.

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: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684331>>. Acesso em: 5 jun. 2015.

FEDEL, M. et al. Carbon Coatings for Cardiovascular Applications: Physico-Chemical Properties and Blood Compatibility. **Journal of biomaterials applications**, v. 25, p. 57-74, 2010. Disponível em: <<http://www.sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

FELDMAN, L. J. et al. Interleukin-10 inhibits intimal hyperplasia after angioplasty or stent implantation in hypercholesterolemic rabbits. **Circulation**, v. 101, n. 8, p. 908-16, fev. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694531>>. Acesso em: 13 jan. 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: 15 fev 2016.

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: 18 nov. 2014.

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: 2 abr. 2015.

GALLONI, M. et al. Carbon-coated Stents Implanted in Porcine Iliac and Renal Arteries: Histologic and Histomorphometric Study. **J Vasc Interv Radiol**, v. 14, p. 1053–1061, 2003.

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: 14 mar. 2014.

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: 3 jun. 2017.

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: 15 set. 2015.

GRAHAM, I. et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). **Eur Heart J**, v. 28, n. 19, p. 2375–2414, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726041>>. Acesso em: 12 out. 2016.

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.

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 out. 2016.

GU, L. et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. **Mol Cell**, v. 2, n. 2, p. 275–281, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9734366>>. Acesso em: 11 jan. 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: 17 set. 2016.

GUTENSOHN, K. et al. In Vitro Analyses of Diamond-like Carbon Coated Stents: Reduction of Metal Ion Release, Platelet Activation, and Thrombogenicity. **Thrombosis Research**, v. 99, p. 577–585, 2000.

HAASE, J. et al. Comparison of stainless steel stents coated with turbostratic carbon and uncoated stents for percutaneous coronary interventions. **J Invasive Cardiol**, v.15, p. 562–565, 2003.

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: 30 jan. 2015.

HANSSON, G. K. et al. Inate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 91, n. 4, p. 281–291, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193460>>. Acesso em: 14 fev. 2016.

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: 22 mar. 2015.

HAUERT, R. A review of modified DLC coatings for biological applications. **Diamond Relat Mater**, v.12 p. 583–589, 2003.

HAYOZ, D. et al. Acute inflammatory reaction associated with endoluminal bypass grafts. **Journal of Endovascular Surgery**, v. 4, n. 4, p. 354-60, Nov. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9418198>>. Acesso em: 8 ago. 2016.

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: 16 dez. 2013.

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: 13 set. 2014.

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: 1 out. 2014.

HOWARD, M.; O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. **Immunology Today**, v. 13, n. 6, p. 198-200, 1992.

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: 10 jan. 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: 23 fev. 2014.

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: 12 nov. 2016.

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: 15 mar. 2014.

ISODA, K. et al. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. **Circulation**, v. 108, n. 5, p. 516-8, Aug. 2003. Epub, 21 July 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874179>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

ISODA, K. et al. Interleukin-1 receptor antagonist originating from bone marrow-derived cells and non-bone marrow-derived cells helps to suppress arterial inflammation and reduce neointimal formation after injury. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 21, n. 11, p. 1208-18, 2014. Epub, 16 sept. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25223697>>. Acesso em: 21 abr. 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: 11 ago. 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: 25 nov. 2015.

JANEWAY, C. A. **Immunobiology**: The immune system in Health and Disease. 4th ed. New York: Garland, 1999

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: 6 set. 2014.

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: 29 jun. 2016.

JOVINGE, S. et al. Tumor necrosis factor- α activates smooth muscle cell in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 17, n. 3, p. 490-497, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9102167>>. Acesso em: 7 jul. 2015.

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: 18 maio 2016.

KAKOKI, M.; SMITHIES, O. The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney. **Kidney Int**, v. 75, p. 1019-30, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190676>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

KANG, W. C. et al. Comparison of inflammatory markers and angiographic outcomes after implantation of sirolimus and paclitaxel-eluting stents. **Heart**, v. 95, n. 12, p. 970-5, June 2009. Epub, 4 sept. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772180>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

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: 22 fev. 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: 30 nov. 2016.

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. Acesso em: 14 fev. 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: 17 jun. 2017.

KAZMIERCZAK, E. et al. Prognostic usefulness of IL-6 and VEGF for the occurrence of changes in coronary arteries of patients with stable angina and implanted stents. **European Review for Medical Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 15, p. 2169-75, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25070823>>. Acesso em: 31 jul. 2016.

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: 21 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: 12 fev. 2015.

KIM, J.H. et al. Comparison of diamond-like carbon-coated nitinol stents with or without polyethylene glycol grafting and uncoated nitinol stents in a canine iliac artery model. **Br J Radiol**, v. 84(999), p. 210–215, 2011.

KIM, J.H. et al. Mechanical stability of the diamond-like carbon film on nitinol vascular stents under cyclic loading. **Thin Solid Films**, v. 517, p. 1146–1150, 2008.

KIM, Y.H. et al. Randomized comparison of carbon ion–implanted stent versus bare metal stent in coronary artery disease: The Asian Pacific Multicenter Arthos Stent Study (PASS) trial. **Am Heart J**, v. 149, p. 336-41, 2005.

KLEIN, C.L. et al. The role of metal corrosion in inflammatory processes: induction of adhesion molecules by heavy metal ions. **J Pathophysiol**, v. 5, p. 798–807, 1994.

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: 16 out. 2016.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1675786>>. Acesso em: 23 mar. 2014.

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: 6 nov. 2016.

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: 11 jan. 2017.

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: 27 out. 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: 4 maio 2016.

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: 19 set. 2015.

LEE, B. S et al. Surface grafting of blood compatible zwitterionic polyethylene glycol on diamond-like carbon-coated stent. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 22, p. 507-514, 2011.

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: 22 jul. 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: 15 jun. 2015.

LI, H. et al. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. **Arterioscler Thromb**, v. 13, n. 2, p. 197-204, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678986>>. Acesso em: 14 mar. 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: 15 maio 2015.

LI, J. Inflammatory response, drug-eluting stent and restenosis. **Chinese Medical Journal**, v. 121, n. 6, p. 566-572, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18364149/>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

LI, J. J. et al. Is inflammation a contributor for in-stent restenosis? **Med Hypotheses**, v. 68, n. 5, p. 945-951, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045418>>. Acesso em: 7 fev. 2016.

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 abr. 2016.

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: 1 mar 2017.

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: 2 dez. 2014.

LOISA, P. et al. Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 47, n. 3, p. 319-325, 2003.

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: 22 ago. 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: 24 nov. 2017.

MACA, T. et al. Elevated lipoprotein(a) and increased incidence of restenosis after femoropopliteal PTA. Rationale for the higher risk of recurrence in females. **Atherosclerosis**, v. 127, n. 1, p. 27-34, nov. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006801>>. Acesso em: 29 out. 2016.

MACH, F. et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. **J Clin Invest**, v. 104, p. 1041-1050, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10525042>>. Acesso em: 10 out. 2014.

MAEGAWA, S. et al. Time course analysis of antithrombogenic properties of fluorinated diamond-like carbon coating determined via accelerated aging tests: Quality control for medical device commercialization. **Diamond & Related Materials**, v. 70, p. 33–38, 2016.

MAFFEI F. H. A. Aterosclerose Obliterante Periférica: epidemiologia, fisiopatologia, 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 2 fev. 2016.

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: 30 nov. 2014.

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 nov. 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: 4 out. 2016.

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: 26 jun. 2015.

MARTINEZ, R.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J.; DIETRICH, 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: 21 fev. 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: 14 mar. 2014.

MAURO, M. A. The battle of intimal hyperplasia in the war against femoropopliteal disease. **Radiology**, v. 231, p. 299-301, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15128980>>. Acesso em: 8 jul. 2016.

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. Acesso em: 22 jul. 2016.

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 12 dez. 2014.

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: 2 fev. 2017.

MCGUIGAN, A.P. SEFTON, M.V. The influence of biomaterials on endothelial cell thrombogenicity. **Biomaterials**, v. 28, p. 2547-2571, 2007.

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: 31 ago. 2016.

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: 1 mar. 2015.

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: 16 nov. 2017.

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: 17 out. 2017.

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: 24 maio 2017.

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: 17 set. 2016.

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: 18 ago. 2015.

MORTON, A. C. et al. Interleukin-1 receptor antagonist alters the response to vessel wall injury in a porcine coronary artery model. **Cardiovascular Research**, v. 68, n. 3, p. 493-501. Epub, 15 Aug. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099441>>. Acesso em: 19 set. 2017.

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: 12 jun. 2014.

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: 15 jul. 2017.

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: 10 mar. 2014.

NETEA, M. G. et al. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trends in Immunology**, v. 24, n. 5, p. 254-258, 2003. Acesso em: 2 fev. 2017.

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: 27 jul. 2016.

OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C.; MOLDAWER, L. L. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 1 Suppl, p. S58-63, 2002.

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: 13 jan. 2014.

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: 9 nov. 2016.

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: 16 maio 2015.

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: 12 fev. 2016.

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 ago. 2017.

PARMAR, J. H.; ASLAM, M.; STANDFIELD, N. J. Percutaneous transluminal angioplasty of lower limb arteries causes a systemic inflammatory response. **Annals of Vascular Surgery**, v. 23, n. 5, p. 569-76, Sept./Oct. 2009. Epub, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467836>>. Acesso em: 19 nov. 2016.

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: 21 abr. 2016.

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: 8 set. 2017.

PESARINI, G. et al. Cytokines release inhibition from activated monocytes, and reduction of in-stent neointimal growth in humans. **Atherosclerosis**, v. 211, n. 1, p. 242-8, July 2010. Epub, 10 Feb. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206356>>. Acesso em: 29 out. 2016.

POBER, J. et al. Lymphocytes recognize human vascular endothelial and dermal fibroblast Ia antigens induced by recombinant immune interferon. **Nature**, v. 305, p. 726-729, 1983. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6415484>>. Acesso em: 13 jul. 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: 11 fev. 2017.

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: 2 nov. 2016.

PRUNOTTO, M. et al. Nitinol Carbofilm coated stents for peripheral applications: Study in the porcine model. *Journal of materials science: materials in medicine*, v. 16 p. 1231 – 1238, 2005. Acesso em: 25 jan. 2014.

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: 1 set. 2017.

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 dez. 2013.

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: 30 jan. 2015.

RAHEL, B.M. et al. Preprocedural serum levels of acute-phase reactants and prognosis after percutaneous coronary intervention. **Cardiovasc Res**, v. 60, p. 136-40, 2003.

RAINES, E.W; Ferri, N. Thematic Review Series: The Immune System and Atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. **J. Lipid. Res.**, v. 46, p. 1081–1092, 2005.

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: 6 jun. 2017.

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: 2 out. 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: 2 jul. 2014.

ROCHA, L. A. et al. The role of the kallikrein-kinin system, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in the early restenosis of covered stents in the femoropopliteal arterial segment. **J Vasc Surg**, v. 65 p. 119-27, 2017.

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: 20 dez. 2013.

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: 27 jan. 2014.

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: 23 jul. 2016.

ROSS R. George Lyman Duff Memorial 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 out. 2016.

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: 12 nov. 2014.

ROY, R. K.; LEE, K. R. Biomedical Applications of Diamond-Like Carbon Coatings: A Review. **Wiley Periodicals**, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, v. 83B, p. 72-84, 2007.

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: 21 dez. 2017.

RUS, H. G.; NICULESCU, F.; VLAICU, R. Tumor necrosis factor-alpha in human arterial wall with atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 89, p. 247-254, 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1793452>>. Acesso em: 11 jun. 2016.

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

RUYGROK, P.; SERRUYS, P. Intracoronary stenting. From concept to custom. **Circulation**, v. 94 p. 882-90, 1996.

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>>.

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: 4 fev. 2016.

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: 14 jul. 2016.

SCHAEFER, O. et al. Endovascular treatment of superficial femoral artery occlusive disease with stents coated with diamond-like carbon. **Clin Radiol**. v. 59, p. 1128–1131, 2004.

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 25 jan. 2016.

SCHILLINGER, M. et al. Endovascular revascularization below the knee: 6-month results and predictive value of C-reactive protein level. **Radiology**, v. 227, p. 419-425, 2003.

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: 27 jul. 2014.

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: 17 abr. 2016.

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: 16 jul. 2017.

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: 17 jul. 2014.

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: 2 mar. 2017.

SERRANO JUNIOR, C. V. et al. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 29, n. 6, p. 1276-83, May 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137224>>. Acesso em: 23 set. 2016.

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: 9 out. 2016.

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: 3 fev. 2017.

SICK, P.B et al. Comparison of Early and Late Results of a Carbofilm-Coated Stent Versus a Pure High-Grade Stainless Steel Stent : The Carbostent-Trial. **Am. J. Cardiol**, v. 93, p. 1351-1356, 2004. Acesso em: 25 jan. 2017.

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: 5 dez. 2016.

SIMONINI, A. et al. IL-8 is an angiogenic factor in human coronary atherectomy tissue. **Circulation**, v. 101, p. 1519-1526, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747344>>. Acesso em: 15 fev. 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: 10 nov. 2016.

SU, Y. Et al. Bioinspired surface functionalization of metallic biomaterials. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 77, p. 90-105, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.08.035>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

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: 13 jul. 2015.

SZKODZINSKI, J. et al. The role of interleukine-6 and transforming growth factor- β 1 in predicting restenosis within stented infarct-related artery. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 493-500, 2009. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/039463200902200226>>. Acesso em: 7 fev. 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: 28 ago 2016.

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: 13 nov 2014.

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: 14 maio 2016.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

TSAKIRIS, D. A. et al. Circulating cell adhesion molecules and endothelial markers before and after transluminal angioplasty in peripheral arterial occlusive disease. **Atherosclerosis**, v. 142 n. 1, p. 193-200, Jan. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920521>>. Acesso em: 15 jan. 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 jun. 2017.

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 em: 29 mar. 2017.

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: 16 jun. 2016.

ULLOA, L.; TRACEY, K. J. The "cytokine profile": a code for sepsis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 56-63, 2005.

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: 8 jul. 2016.

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: 27 nov. 2014.

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: 18 fev. 2016.

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: 9 maio 2016.

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: 17 ago. 2017.

VISCONTI, G. et al. The CID Chrono™ cobalt–chromium alloy carbofilm-coated coronary stent system. **International Journal of Cardiology**, v. 149, p. 199–204, 2011.

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: 30 mar. 2016.

VOGIATZI, K. et al. Interleukin 8 gene polymorphisms and susceptibility to restenosis after percutaneous coronary intervention. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 29, n. 1, p. 134-40, Jan. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19404719>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

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: 1 out. 2015.

VON DER THÜSEN, J. H. et al. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 133-166, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615956>>. Acesso em: 3 ago. 2017.

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: 29 jan. 2015.

WARNER, S. J.; LIBBY, P. Human vascular smooth cells: target for and source of tumor necrosis factor. **J Immunol**, v. 142, p. 100-109, 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2783319>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

WEBER, C.; SCHÖBER, A.; ZERNECKE, A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 24, p. 1997-2008, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15319268>>. Acesso em: 17 nov. 2016.

WELT, F.G.; ROGERS, C. Inflammation and restenosis in the stent era. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, n. 11, p. 1769-1776, Nov. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426203>>. Acesso em: 19 jan. 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: 20 out. 2015.

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: 19 jul. 2015.

WIERNAS, T. K. et al. Effects of bradykinin on signal transduction, cell proliferation, and cytokine, prostaglandin E2 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: 30 dez. 2013.

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: 7 jan. 2014.

WORTHWARD S, SALTHOUSE T. The tissue response to implants and its evaluation by light microscopy. In: VON RECUM, A. (editor). **Handbook of biomaterials evaluation: scientific, technical and clinical testing of implant materials**. New York: Macmillan Publ. Co.; p. 367-78, 1986.

XIA, Z. Y. et al. Impact of carotid artery stenting on plasma interleukin-6, tumor necrosis factor- α and C-reactive protein. **International Angiology**, v. 31, n. 1, p. 28-32, Feb. 2012. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/221828894>> Impact of carotid artery stenting on plasma interleukin-6 tumor necrosis factor-a and C-reactive protein>. Acesso em: 5 mar. 2016.

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: 19 jul. 2015.

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.; ZAHRAKKA, P. Inhibition of RNA synthesis by bradykinin involves both the B1 and B2 receptor subtypes. **Arch Biochem Biophys**, n. 328, p. 115-21, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8638919>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

YASUKAWA, H.; SASAKI, A.; YOSHIMURA, A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 143-64, 2000. Review. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837055>>. Acesso em: 9 jan. 2014.

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: 29 nov. 2016.

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: 2 set. 2016.

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: 3 out. 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: 27 jan. 2016.

ZHOU, X. C. et al. Inflammation inhibitory effects of sirolimus and paclitaxel-eluting stents on interleukin-1 β -induced coronary artery in-stent restenosis in pigs. **Chinese Medical Journal (Engl)**, v. 123, n. 17, p. 2405-9, Sept. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034557>>. Acesso em: 23 out. 2016.

ZIAKAS, A. et al. Kinetics and prognostic value of inflammatory-sensitive protein, IL-6, and white blood cell levels in patients undergoing coronary stent implantation. **Med Sci Monit**, v. 15, n. 4, CR177-184, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333202>>. Acesso em: 13 fev. 2014.

ZIATS, N.; MILLER, K.; ANDERSON, J. In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. **Biomaterials**, v. 9, p. 5–13, 1988.

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: 18 jul. 2014.

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: 26 out. 2016.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A

Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo estudo)

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

Título do estudo: Caracterização do perfil dos componentes do sistema das cininas, óxido nítrico e metaloproteinases, das citocinas IL-6, IL-8, TNF- α e TGF- β associados ao marcador inflamatório de fase aguda (PCR) no processo de reestenose de *stents impregnados por carbono* pós angioplastia percutânea transluminal periférica.

Marcadores em investigação: Citocinas, cininas, metaloproteinases, óxido nítrico marcador inflamatório de fase aguda (PCR) e hemograma.

Nome do investigador principal: César Presto Campos

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

Introdução:

Você está 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 está 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 está sendo conduzido por seu médico para avaliar alguns componentes sanguíneos como marcadores na re-estenose (reestreitamento do vaso) de *stents impregnados por carbono* 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 (depósito

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 impregnado por carbono* 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 ¹balão de angioplastia (para dilatar o vaso) seguido da colocação de *stent impregnado por carbono* (material que irá manter a perviedade do vaso,² impedindo que ele volte a entupir). Este é um procedimento que já é estabelecido e liberado pelos órgãos competentes e em casos selecionados (como o seu) pode ser realizado em substituição da cirurgia convencional(ponte com a veia safena), com menores taxas de complicações e mortalidade. Ao participar desse trabalho você estará contribuindo para entender melhor a doença e para a verificação de possíveis tratamentos ou adequações dos *stents* .

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, quando será colhido cerca de 15ml sangue (cerca de 1 colher de sopa).Este sangue será enviado ao laboratório e dosado alguns elementos que podem estar relacionados ao reentupimento do vaso em que foi colocado o stent (reestenose) Caso a cirurgia seja realizada no mesmo dia da internação, o sangue será colhido imediatamente antes da cirurgia. Nova amostra de sangue será colhida 24h após o procedimento (mesma quantidade). O número de dias de internação depende da gravidade da doença previamente ao procedimento e do sucesso do procedimento. Em geral os pacientes têm alta 24horas apos 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). 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. Este exame é realizado de rotina como controle da cirurgia, independente do estudo.

Riscos e benefícios:

Os riscos são inerentes ao procedimento cirúrgico, que corresponde a angioplastia com colocação de stent, como alergia e insuficiência renal pelo uso do contraste, sangramento no ponto de punção, reoclusão do vaso e trombose de outros vasos. Como é realizado com anestesia local, o risco de infarto e óbito é menor do que a cirurgia convencional descrita anteriormente, embora ainda exista. O desconforto da angioplastia corresponde à dor ocasionada pela anestesia local. O stent utilizado já está liberado pelos órgãos competentes como opção de tratamento e, Independentemente do estudo, você já possui indicação cirúrgica pela própria doença, por isso já seria submetido ao procedimento. Não há riscos de contaminação, pois os materiais utilizados serão descartáveis. O desconforto consiste na dor ocasionada pela punção venosa para coleta de 15ml de sangue (cerca de 1 colher de sopa) , com provável equimose(mancha roxa) no local, que desaparece em cerca de 20-30 dias. O exame controle 6 meses após a cirurgia também é um procedimento padrão descrito na literatura e realizado de rotina nos pacientes do HC submetidos a angioplastia e serve para verificar se o stent não está ocluindo novamente e, conseqüentemente , determinar se vai ser necessário novo procedimento antes que oclua totalmente. Corresponde 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, que também pode causar alergia e contribuir para insuficiência renal.

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 stents. 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. Não há benefício direto para o participante da pesquisa

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 e não serão ressarcidas quaisquer despesas decorrentes da participação na pesquisa. Caso ocorra danos comprovadamente decorrentes da pesquisa, o participante terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país.

Confidencialidade: Para a realização da pesquisa em questão, serão utilizados dados do prontuário referente a comorbidades (doenças prévias), medicações em uso, assim como dados da ficha operatória, imagens da cirurgia e arteriografia. 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 César Presto Campos, que pode ser encontrado no seguinte endereço: Hospital das Clínicas 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. Cel: 981268841

Se você tiver quaisquer dúvidas e quiser mais informações sobre os seus direitos como participante de pesquisa ou sobre os aspectos éticos do estudo, você deve ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900, Campus Universitário, Monte Alegre, Sub-solo, Ribeirão Preto/SP, CEP: 14048-900, Brasil. (16) 3602-2228 de segunda a sexta-Feira das 08:00hs às 17:00hs.

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. Informe 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. Informe também ao médico 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 cópia assinada deste consentimento.

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

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

Data: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____ (se aplicável)

Data: _____

Investigador / subinvestigador ou pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Confirmando que expliquei pessoalmente a natureza, propósito, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo ao paciente acima mencionado.

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Prof. Dr. Edwaldo Edner Joviliano

Docente Responsável pela Orientação do Projeto Científico

ANEXO B

VALORES INDIVIDUAIS DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS (IL1-BETA, IL-6, IL-8 E TNF ALFA) DE TODOS OS PACIENTES DO ESTUDO NOS TEMPOS ANTES (A), 24 HORAS (B) E SEIS MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA(C). UNIDADE: pg/mL plasma.

AMOSTRAS	A - IL-1 beta	A - IL-6	A - IL-8	A - TNF-alfa	B - IL-1 beta	B - IL-6	B - IL-8	B - TNF-alfa	C - IL-1 beta	C - IL-6	C - IL-8	C - TNF-alfa
0789321D	456	1600	354	170	420	1400	245	120	320	612	156	45
1215027K	489	1790	250	180	400	1200	320	120	300	650	160	46
1191099K	480	1460	260	160	440	1300	350	135	350	580	170	55
1200955J	430	1500	320	150	400	1200	300	130	380	710	180	68
0299317H	456	1600	320	160	420	1300	320	110	400	890	290	60
0452261D	470	1400	410	150	420	1250	412	120	410	820	150	70
0077295D	468	1460	448	120	420	1200	405	130	390	890	210	40
1245154E	456	1700	360	150	410	1100	210	120	380	679	160	35
1235114A	457	1500	355	168	420	1200	315	110	420	740	150	45
0779995E	490	1600	320	156	410	1300	320	110	380	780	210	30
0139414F	456	1400	360	160	410	1200	390	110	400	710	190	52
1252622E	490	1700	487	170	420	1400	412	130	390	650	230	60
1135767J	467	1200	344	120	420	1400	300	130	390	900	168	42
1146086K	450	1450	350	178	480	1090	320	135	400	952	156	45
0597062J	430	1120	340	150	410	1150	315	120	383,75	763,542	178,167	51,917
0980704K	456	1491	350	168	390	1250	345	110	350	952	150	45
1252602K	420	1625	300	156	390	1300	390	140	383,75	763,542	178,167	51,917
0694279K	460	1580	280	160	410	1450	390	140	380	790	156	50
0580426J	460	1600	350	130	420	1200	300	130	400	700	140	49
08399552D	430	1400	370	140	410	1300	320	130	383,75	763,542	178,167	51,917
0927969C	440	1700	360	160	420	1200	412	120	390	750	160	58
1256834E	450	1500	365	140	410	1400	405	110	370	800	220	60
1337853K	460	1500	350	135	390	1350	410	145	390	890	150	50
111712J	470	1600	350	140	400	1200	380	140	420	670	210	66
1341780K	435	1400	340	150	410	1350	320	130	380	740	160	55
1342242C	460	1600	360	150	420	1420	390	120	420	780	190	60
1307522G	440	1400	370	140	430	1500	400	130	400	690	160	60

ANEXO C

VALORES INDIVIDUAIS DAS CITOCINAS ANTI- INFLAMATÓRIAS (IL-10 E TGF BETA) DE TODOS OS PACIENTES DO ESTUDO NOS TEMPOS ANTES(A), 24 HORAS(B) E SEIS MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA(C). UNIDADE: pg/mL plasma

AMOSTRAS	A - IL-10	A - TGF-beta	B - IL-10	B - TGF-beta	C - IL-10	C - TGF-beta
0789321D	56	79	65	70	110	100
1215027K	45	69	70	65	120	60
1191099K	36	60	60	80	124	70
1200955J	56	29	40	60	80	35
0299317H	65	32	40	50	99	70
0452261D	55	38	60	40	79	67
0077295D	50	42	65	40	110	80
1245154E	65	45	60	40	144	87
1235114A	87	46	60	40	156	92
0779995E	79	79	70	50	132	56
0139414F	32	46	85	50	105	70
1252622E	47	50	80	80	109	80
1135767J	65	40	60	80	121	80
1146086K	70	35	60	90	102	50
0597062J	87	45	65	70	118,208	72,32
0980704K	79	56	80	70	121	55
1252602K	32	36	54	40	118,208	72,32
0694279K	50	48	50	50	120	80
0580426J	60	32	60	40	130	87
08399552D	65	38	65	50	118,208	72,32
0927969C	70	42	60	50	130	72,32
1256834E	75	45	60	80	120	72,32
1337853K	80	50	70	70	110	70
111712J	70	57	58	50	144	67
1341780K	68	48	70	60	156	80
1342242C	90	49	60	50	100	75
1307522G	70	50	65	50	115	80

ANEXO D

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

AMOSTRAS	A - CAPM	A - CBPM	B - CAPM	B - CBPM	C - CAPM	C - CBPM
0789321D	1,3	2,1	0,9	1,3	1,1	1,1
1215027K	1,3	2,0	1,2	1,5	0,6	1,3
1191099K	1,3	2,3	1,5	2,1	1,3	1,4
1200955J	1,8	2,5	1,1	2,0	0,8	1,0
0299317H	1,8	2,0	1,2	2,0	0,8	1,1
0452261D	1,2	2,0	1,0	2,0	0,7	0,8
0077295D	1,5	2,5	0,9	2,1	1,5	1,1
1245154E	1,5	2,0	1,6	1,8	1,1	1,1
1235114A	1,8	2,1	1,6	2,0	0,6	1,3
0779995E	1,2	2,4	1,0	2,2	1,3	1,4
0139414F	1,5	2,2	1,2	2,3	1,0	1,3
1252622E	1,4	2,4	1,2	2,5	0,8	1,0
1135767J	1,6	2,4	1,4	2,1	1,5	1,1
1146086K	1,3	2,5	0,9	1,8	1,0	0,9
0597062J	1,4	2,2	1,2	2,1	1,0	1,1
0980704K	1,5	2,1	1,5	1,9	1,1	1,0
1252602K	1,3	2,0	1,8	1,8	1,0	1,1
0694279K	1,4	2,3	1,1	2,0	1,2	1,1
0580426J	1,8	2,5	1,6	2,2	1,2	1,0
08399552D	1,2	2,0	1,0	1,9	1,0	1,1
0927969C	1,5	2,1	1,2	1,8	0,9	1,0
1256834E	1,5	2,4	1,2	2,0	0,8	1,0
1337853K	1,5	2,4	0,8	2,1	1,3	1,1
111712J	1,4	2,5	1,4	1,9	1,0	1,2
1341780K	1,4	2,5	1,2	1,8	0,9	1,2
1342242C	1,2	2,2	1,1	1,9	1,0	1,0
1307522G	1,5	2,4	1,2	1,8	1,1	1,2

ANEXO E

VALORES INDIVIDUAIS DA CALICREÍNA PLASMÁTICA E TECIDUAL DE TODOS OS PACIENTES DO ESTUDO NOS TEMPOS ANTES (A), 24 HORAS (B) E SEIS MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA (C). UNIDADE: $\mu\text{M pNa/ mL plasma}$ (CAL TECIDUAL); U/mL plasma (CAL PLASMÁTICA)

AMOSTRAS	A - CAL PLASMÁTICA	A - CAL TECIDUAL	B - CAL PLASMÁTICA	B - CAL TECIDUAL	C - CAL PLASMÁTICA	C - CAL TECIDUAL
0789321D	2,5	1,7	2,1	1,8	1,7	1,4
1215027K	2,4	2,9	2,0	2,0	2,0	1,8
1191099K	2,7	2,3	2,3	1,5	1,8	1,7
1200955J	2,9	1,9	2,1	1,6	1,8	1,4
0299317H	2,3	1,7	1,9	1,4	1,7	1,3
0452261D	2,9	2,0	1,9	1,4	1,8	1,5
0077295D	2,2	1,5	1,8	2,0	1,6	1,4
1245154E	2,4	2,0	1,9	1,5	1,7	1,4
1235114A	2,1	1,7	1,9	1,6	2,0	1,8
0779995E	2,0	1,4	1,9	1,4	1,8	1,7
0139414F	2,3	1,4	2,1	1,4	2,0	1,4
1252622E	2,5	2,0	1,9	1,5	1,8	1,4
1135767J	3,1	1,7	2,5	2,0	1,6	1,4
1146086K	2,7	2,0	2,2	1,6	1,8	1,6
0597062J	2,3	1,7	1,8	1,5	1,8	1,6
0980704K	2,5	2,9	1,9	1,5	1,9	1,7
1252602K	2,4	2,3	1,8	1,8	1,8	1,6
0694279K	2,7	1,8	1,9	1,4	1,8	1,8
0580426J	2,2	2,0	1,9	1,5	2,0	1,9
08399552D	2,4	1,7	1,8	1,3	1,8	1,6
0927969C	2,1	1,4	1,9	1,5	1,9	1,6
1256834E	2,0	1,5	2,0	1,4	1,8	1,8
1337853K	2,5	1,6	1,9	1,5	1,9	1,9
111712J	2,6	1,7	1,8	1,5	1,8	1,5
1341780K	2,5	1,7	2,0	1,4	1,9	1,7
1342242C	2,3	1,6	1,8	1,6	1,8	1,7
1307522G	3,0	1,7	1,9	1,5	1,9	1,6

ANEXO F

VALORES INDIVIDUAIS DA CININASE II DE TODOS OS PACIENTES NOS TEMPOS ANTES (A), 24 HORAS (B) E SEIS MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA (C). UNIDADE: nmoles His-Leu/ml/min

AMOSTRAS	A - CININASE II	B - CININASE II	C - CININASE II
0789321D	1,3	2,2	1,3
1215027K	1,0	1,7	1,5
1191099K	0,9	1,8	1,2
1200955J	0,8	1,8	1,3
0299317H	1,2	1,3	1,4
0452261D	1,0	1,5	2,0
0077295D	1,1	1,2	2,0
1245154E	1,5	1,7	1,3
1235114A	1,4	1,3	1,5
0779995E	0,8	1,4	1,2
0139414F	0,9	2,0	1,7
1252622E	1,3	2,0	1,3
1135767J	1,3	1,6	2,0
1146086K	1,4	1,6	1,8
0597062J	1,2	1,8	1,6
0980704K	1,3	1,2	1,9
1252602K	1,3	1,7	1,6
0694279K	1,0	1,3	2,0
0580426J	1,3	1,2	1,6
08399552D	1,0	1,7	1,6
0927969C	0,9	1,3	1,7
1256834E	0,9	1,5	1,9
1337853K	1,2	1,6	1,3
111712J	1,0	1,8	1,5
1341780K	1,1	1,2	1,7
1342242C	0,8	1,8	1,8
1307522G	0,9	1,2	1,4

ANEXO G

VALORES INDIVIDUAIS DOS NITRITOS E NITRATOS (NO), PROTEINA C REATIVA (PCR) E LEUCÓCITOS DE TODOS OS PACIENTES NOS TEMPOS ANTES (A), 24 HORAS (B) E SEIS MESES DA ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERIFÉRICA (C). UNIDADE: NO- micromolar (μM); PCR- mg/dl plasma; LEUC- mg/dl plasma.

AMOSTRAS	A - NO	A - PCR	A - LEUC	B - NO	B - PCR	B - LEUC	C - NO	C - PCR	C - LEUC
0789321D	24,57	1	3,3	31,06	0,87	3,9	53,79	0,77	4,7
1215027K	59,89	0,81	6,9	40,39	0,73	7,1	63,97	0,15	6,3
1191099K	46,74	0,63	5,2	59,65	0,72	6,8	47,16	1,72	4,6
1200955J	124,95	1,27	8,7	76,66	1,21	11,6	67,8	0,12	5
0299317H	31,2	0,61	5,8	21,49	0,57	6,2	22,89	0,32	5,1
0452261D	29,97	0,07	6,9	24,98	0,41	11,1	30,16	0,06	6,5
0077295D	33,15	0,96	8,5	78,48	1,9731818	9,5	49,59	0,32	8
1235114A	36,86	0,53	13,1	39,58	0,29	14,2	38,5	0,78	7,4
0779995E	47,05	0,15	5,8	41,93	0,18	7,8	48,57	0,09	6,6
0139414F	142,33	0,68	7	46,72	1,9731818	9,208333	72,51	3,25	8,5
1252622E	67,82	0,48	8,4	39,23	0,35	11,1	49,85	0,35	7,2478261
1135767J	47,33	0,68	10,1	89,61	0,89	13,4	76,53	0,5	8,4
1146086K	75,08	0,7	6,7	69,52	1,31	9,7	41,62	0,67	7,2478261
0597062J	64,25	1,11	8	52,1	1,7	8,5	50,27	0,17	7,2478261
0980704K	44,04	1,84	4,8	66,24	2,25	4,6	41,09	1,052083	3,9
1252602K	116,51	0,25	6,8	68,97	0,96	7,6	164,27	0,22	6,9
0694279K	170	0,52	8,8	77,44	1,9731818	9,208333	56,93	1,052083	7,8
0580426J	70,21	1,36	8	40,77	5,76	13	77,89	1,28	6,2
08399552D	52,58	0,18	6,1	75,23	0,68	8,5	61,32538	1,052083	7,2478261
0927969C	108,03	1,68	10,7	65,52	3,67	9,8	59,44	2,5	9,8
1256834E	73,41	0,87	7,2	72,46	1,9731818	9,208333	117,4	0,33	5,5
1337853K	73,66	7,65	5	41,93	5,86	5,9	76,23	0,98	8,1
111712J	48,53	3,98	9,6	33,02	4,42	9,6	82,11	0,3	7,8
1341780K	51,37	0,6	9,5	93,86	1,9731818	12,4	56,16	0,95	11,4
1342242C	83,61	3,11	7,1	58,06	6,36	9	77,34	7,99	11,2
1307522G	64,35	0,11	7,3	25,36	0,09	8,1	42,37	0,22	9,4
1329654C	68,88	2,38	9,4	55,01	4,13	11,6	61,32538	1,21	7,6