Michel Nasser

**Valor preditivo da trombomodulina sérica em
pacientes com claudicação intermitente e com
isquemia crítica de membros inferiores**

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

Área de concentração: Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Nelson Wolosker

São Paulo

2006

DEDICATÓRIA

***A meus pais, Izabel (in memoriam) e Ragih,
pela vida de sacrifício e trabalho à
educação de seus filhos.***

***À Ana Lúcia que constrói nossa felicidade
com amor e sabedoria.***

***À Ana Izabel e Ana Beatriz,
que a complementam.***

***À Mônica, Miguel e Morgana,
pela alegria constante.***

HOMENAGENS

Ao *Professor Doutor Nelson Wolosker*, mestre, amigo e colaborador, profundo conhecedor de cirurgia vascular e endovascular, pelo estímulo constante às pesquisas, e à colaboração inestimável nesta etapa do meu aprendizado.

Ao *Professor Doutor Pedro Puech-Leão*, pelo constante estímulo, e exemplo de liderança médica.

Aos eternos *Prof. Dr. Berilo Langer* e *Prof. Dr. Milton J. Bechara* que muito cedo nos abandonaram, mas nos deixaram o exemplo de viver feliz realizando estudos das doenças vasculares.

Aos meus mestres *Prof. Dr. Paulo Kauffman*, *Prof. Dr. Cid Sitrângulo Júnior*, *Prof. Dr. Calógero Presti*, *Prof. Dr. Baptista Muraco Netto*, pelo exemplo de ética e ensino, aos seus discípulos, da arte em cirurgia vascular.

AGRADECIMENTOS

Ao *Dr. Rubén M.A. Rosoky*, o qual não poupou esforço e conhecimento para tornar mais fácil meu trabalho.

À *Dra. Luciana Uint*, pelo incentivo e auxílio recebido.

Ao *Dr. Manoel Lobato*, pela inestimável colaboração na coleta de dados.

Ao *Dr. Daniel F. Ketelhuth*, pela colaboração na dosagem das amostras de trombomodulina.

Ao Lim 28, que tem como responsáveis os *Professores Dr. Alberto Rosset Ferraz* e *Dr. Pedro Puech-Leão*, pelo auxílio financeiro.

Ao *Sr. Arcelino Pereira dos Santos*, pela colaboração e apoio no ambulatório.

Ao estatístico *Romeu Magnani*, pela elaboração e orientação no complexo estudo estatístico desta tese.

Ao *Lucas*, pelo talento e colaboração em programas de informática.

Aos *doentes*, sem os quais nada seria possível.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suelly Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Abreviaturas

Figuras

Gráficos

Tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução	1
1.1	A aterosclerose	1
1.2	Claudicação intermitente	5
1.3	Isquemia crítica	7
1.4	A trombomodulina	12
1.4.1	Histórico	12
1.4.2	Genética	12
1.4.3	Estrutura bioquímica	13
1.4.4	Distribuição	15
1.4.5	Mecanismo de ação	15
1.5	Doenças que promovem alterações de trombomodulina	18
1.6	Trombomodulina na doença aterosclerótica	19
2	Objetivos	25
3	Método	28
3.1	Método laboratorial	31
3.1.1	Coleta do material para análise de trombomodulina	31
3.1.2	Determinação da trombomodulina plasmática	31
3.2	Método estatístico	32
4	Resultados	36
4.1	Avaliação das variáveis quantitativas e qualitativas nos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica	36
4.1.1	Variáveis quantitativas	36
4.1.2	Variáveis qualitativas	39
4.2	Determinação da correlação linear entre a trombomodulina e as variáveis quantitativas	41

4.3	Determinação da correlação entre a trombomodulina e as variáveis qualitativas	44
5	Discussão	52
5.1	Discussão sobre o método	52
5.2	Discussão sobre os resultados	57
6	Conclusões	71
7	Anexos	73
8	Referências	82

Apêndices

LISTAS

ABREVIATURAS

CMLV	Células musculares lisas
CI	Claudicação intermitente
DAOP	Doença Arterial Obstrutiva Periférica
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
IC	Isquemia crítica
ITB	Índice tornozelo braquial
KDa	Quilodalton
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
TASC	Transatlantic Inter-Society Consensus
TM	Trombomodulina
TMp	Trombomodulina plasmática
TNF	Fator de necrose tumoral

FIGURAS

Figura 1	Os estágios de desenvolvimento de uma placa. Inicialmente, há disfunção endotelial, seguida da penetração do LDL no sub-endotélio, com oxidação por macrófagos. Posteriormente, tem-se a da lâmina basal, e a da formação de células espumosas, com migração e proliferação das CMLV, e com síntese de matriz extracelular. Finalmente, ocorrerá deposição de plaquetas e fibrina, com formação de trombos	4
Figura 2	Estrutura molecular da TM com seus cinco domínios	14
Figura 3	A ativação da proteína C depende da trombomodulina do endotélio da trombina circulante e da proteína S circulante, na presença de Ca^{+2}	16
Figura 4	A formação do complexo trombina-TM ativa a proteína C, inibe a quebra do fibrinogênio, diminui a ativação do fator V e das plaquetas	17
Figura 5	Complexo molecular que ativa a proteína C, e que inibe os fatores V e VIII da coagulação, além de inibir a ativação plaquetária e de regular o sistema fibrinolítico	18

GRÁFICOS

Gráfico 1	Correlação linear entre a TMp e a idade, nos pacientes dos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica	42
Gráfico 2	Correlação linear entre a TMp e o colesterol, nos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica	43
Gráfico 3	Correlação linear entre a TMp e o LDL, nos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica	43
Gráfico 4	Correlação linear entre a TMp e os triglicérides, nos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica	44
Gráfico 5	Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto ao sexo e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais	46
Gráfico 6	Histograma médias de TMp, em ng/mL, quanto à cor e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais	46
Gráfico 7	Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto ao hábito de fumar e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais	47
Gráfico 8	Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto à diabetes e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais	47
Gráfico 9	Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto à hipertensão e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais	48
Gráfico 10	Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto à medicação redutora de colesterol e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais	48

Gráfico 11	Histograma das médias de Tmp, em ng/mL, quanto à medicação antiagregante e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais	49
Gráfico 12	Histograma das médias de Tmp, em ng/mL, quanto ao nível de oclusão e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais	49

TABELAS

Tabela 1	Comparações entre os grupos de pacientes com claudicação intermitente e os pacientes com isquemia crítica, quanto às variáveis quantitativas	36
Tabela 2	Valores obtidos da TMp em cada paciente, nos grupos de pacientes com claudicação intermitente e com isquemia crítica	37
Tabela 3	Comparações entre os grupos de pacientes com claudicação intermitente e os pacientes com isquemia crítica, quanto à dosagem dos níveis séricos de trombomodulina	38
Tabela 4	Comparações entre os grupos de Claudicação Intermitente e de Isquemia Crítica, quanto às variáveis qualitativas	39
Tabela 5	Coeficientes de correlação entre a TMp e cada variável quantitativa, com respectivos valores de probabilidade p	41
Tabela 6	A avaliação do grau de correlação entre a TMp e as variáveis qualitativas e os grupos de doentes	45

RESUMO

Nasser M. *Valor preditivo dos níveis plasmáticos de trombomodulina plasmática em pacientes com claudicação intermitente e com isquemia crítica de membros inferiores [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 97p.

A trombomodulina é descrita como um marcador de lesão endotelial na doença aterosclerótica. O papel da trombomodulina como preditor da doença arterial obstrutiva periférica deve ser comprovado. Diferenças encontradas em seus níveis séricos poderiam indicar que esse marcador teria o poder de predizer a agressividade da doença aterosclerótica periférica. O objetivo deste estudo foi comparar as dosagens de trombomodulina plasmática em pacientes com claudicação intermitente e com isquemia crítica de membros inferiores e validar a utilização de um produto endotelial circulante específico de lesão endotelial como marcador de prognóstico da doença arterial obstrutiva periférica para ser empregado em pacientes com claudicação intermitente. A trombomodulina plasmática foi quantificada através de método imunoenzimático em 41 pacientes com claudicação intermitente e em 40 pacientes com isquemia crítica de acordo com a classificação *Transatlantic Inter-Society Consensus*. As hipóteses de normalidade e de homogeneidade de variância foram provadas, respectivamente, pelos testes de Shapiro-Wilk e de Levene. A comparação da trombomodulina plasmática entre ambos os grupos foi realizada empregando o teste t de *Student*. As correlações entre as dosagens de trombomodulina plasmática e as variáveis - idade (anos), colesterol (mM), LDL (mM), HDL (mM) e triglicérides (mM) - foram calculadas através do coeficiente de correlação de Pearson. As correlações entre trombomodulina plasmática e as variáveis - sexo, raça, hábito de fumar, diabetes, hipertensão e o nível anatômico de oclusão arterial - foram analisadas por Análise de Variância. O nível médio de trombomodulina plasmática nos pacientes com Claudicação Intermitente foi de 5,2ng/ml (0,78 - 13,61 ng/ml) e nos pacientes com Isquemia Crítica, de 6,34 (0,82 - 18,22 ng/ml) – $p = 0,265$. Não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os níveis de trombomodulina plasmática dos pacientes com Claudicação Intermitente e Isquemia Crítica, não permitindo, com isso, o seu uso como marcador de o

prognóstico da doença arterial obstrutiva periférica. A utilização de pacientes com claudicação e com isquemia crítica é interessante como modelo de estudo o qual deve ser empregado para avaliar diferentes marcadores de prognósticos da doença arterial obstrutiva periférica.

Descritores: 1.CLAUDICAÇÃO INTERMITENTE; 2.ISQUEMIA;
3.EXTREMIDADE INFERIOR/patologia; 4.MARCADORES BIOLÓGICOS;
5.TROMBOMODULINA; 6.ENDOTÉLIO VASCULAR.
7.ARTERIOSCLEROSE.

SUMMARY

Nasser M. *Predictive value of the plasmatic levels of thrombomodulin in patients with intermittent claudication and critical ischemia in the lower limbs* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 97p.

Thrombomodulin is an endothelial marker of arterosclerotic disease and its use as a predictor of Peripheral Arterial Disease must be proven. The application of TM as an aggressiveness marker has not been done. The goal of the present study is to compare the level of plasmatic thrombomodulin in patients with intermittent claudication and in patients with critical ischemia in the lower limbs, and to validate the use of a specific marker product of endotelial injury as marking of prognostic of the DAOP to be used in patients with intermittent claudication. Both groups of patients have the same peripheral atherosclerotic disease, however with distinct aggressiveness and evolution. Forty-one patients having intermittent claudication and forty having critical ischemia were evaluated. Plasmatic Thrombomodulin was quantified in all patients using the immunoenzymatic method (ELISA). The hypotheses of normality and variance homogeneity were proven, respectively, using the Wilk-Shapiro and Levene Tests. The comparison of the plasmatic thrombomodulin between both groups was carried out using the *Student-T* Test. The average levels of plasmatic thrombomodulin in Intermittent Claudication were 5,2ng/ml (0,78 the 13,61 ng/ml) and plasmatic thrombomodulin in Critical Ischemia were 6,34 (0,82 18,22 ng/ml) – $p = 0,265$. No statistically significant difference between the plasmatic thrombomodulin levels of the patients with Intermittent Claudication and Critical Ischemia was observed, thus not allowing its use as marking of the prognostic of the Peripheral Arterial Disease. The utilization of patients with Intermittent Claudication and Critical Ischemia is interesting as a study model and should be used to evaluate different prognostic markers of Peripheral Arterial Disease.

Descriptors: 1.INTERMITTENT CLAUDICATION; 2.ISCHEMIA; 3.LOWER
EXTREMITY/pathology; 4.BIOLOGICAL MARKERS;
5.THROMBOMODULIN; 6.ENDOTHELIUM/vascular;
6.ARTERIOSCLEROSIS.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 A aterosclerose

A aterosclerose se desenvolve progressivamente, gerando oclusão do lúmen das artérias de médio e grande calibre das extremidades, e tem como lesão fundamental a placa de ateroma. O surgimento desta placa origina-se no endotélio vascular, sendo resultado de um processo degenerativo complexo, o qual envolve alterações celulares e moleculares em sua formação^{1,2}.

O endotélio vascular é o local mais importante para ser avaliado na formação da placa aterosclerótica, pois tem capacidade de produzir uma superfície antitrombótica, e não adesiva, ao fluxo sanguíneo. Para isso, sintetiza moléculas que regulam o tônus e o diâmetro do vaso, como o óxido nítrico (NO). Além disso, o endotélio permite a entrada e a saída dos elementos do sangue à musculatura lisa adjacente (função de permeabilidade), e mantém a membrana basal sobre a qual está apoiado.

Os componentes do sangue interagem, continuamente, com as células endoteliais, mantendo o seu remodelamento. Quando ocorre uma

agressão ao endotélio, por agentes físicos ou químicos, a homeostase se quebra, promovendo disfunção endotelial, a qual resulta em modificações estruturais na parede do vaso, e que, por sua vez, leva à formação da placa de ateroma.

A disfunção endotelial promove o acúmulo de várias células inflamatórias locais, provocando adesão de leucócitos circulantes no endotélio lesado. A maior parte deste processo ocorre a partir de infiltração de células sangüíneas da circulação em locais específicos do endotélio. Para ocorrer a penetração de elementos circulantes para o interior do endotélio vascular, é necessário um carregador específico, as chamadas moléculas de adesão.

Estas moléculas são divididas em três classes:

1. As integrinas – moléculas de adesão vasculares - B₁, VLA-4, B₂, LFA-1, Mac-1, B₃, entre outras.
2. As selectinas – moléculas de adesão leucocitárias - (E-selectinas, P – selectinas, L – selectinas).
3. As imunoglobulinas – moléculas de adesão intercelulares - (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1).

O endotélio libera estas substâncias para evitar a ruptura da integridade vascular durante o processo inflamatório, o qual ocorre na superfície do vaso. As moléculas de adesão participam ativamente dos processos de sinalização, aderência, e migração celular para o interior do endotélio^{3,4} e são moduladas pelo óxido nítrico (NO).

Atualmente, está amplamente demonstrado que a patogenia da aterosclerose envolve diversos processos altamente inter-relacionados, sendo considerada como multifatorial². A teoria clássica de Russell Ross^{5,6,7} apresenta a formação da placa de aterosclerose como resultado de um processo inflamatório, mediado por fenômenos celulares e humorais, em resposta à agressão sofrida pelo endotélio.

Na gênese das lesões ateroscleróticas, observam-se, inicialmente, alterações da capacidade seletiva do endotélio, com acúmulo de gorduras no sub-endotélio e posterior formação de estrias lipóides ou gordurosas⁸. A placa de ateroma impede a célula endotelial de participar, adequadamente, no sistema de coagulação e fibrinólise, predispondo a trombose arterial⁹. A formação do trombo arterial depende da ativação do sistema de coagulação e fibrinólise, mediada por moléculas de adesão, as quais fazem a interação entre o endotélio e as células sangüíneas circulantes.

A formação da placa aterosclerótica se inicia com a penetração da lipoproteína de baixa densidade (LDL) circulante para o interior da célula endotelial, o que induz a infiltração de leucócitos circulantes (linfócitos T e monócitos), carregados para a região sub-endotelial pelas moléculas de adesão. Após a penetração do LDL, este é oxidado pelos macrófagos (evento mediado por proteínas quimiotáticas dos monócitos, que promovem o acúmulo de macrófagos inflamatórios e células T dentro da parede arterial)^{10,11}. A oxidação do LDL e das proteínas do fenômeno inflamatório promoverão a quebra da lâmina basal, na qual o endotélio repousa, com a migração de células musculares lisas (CMLV) para o espaço sub-endotelial.

Com isso, teremos a formação de células espumosas. As células espumosas são formadas como resultado do acúmulo dos macrófagos que oxidaram o LDL a partir de proteínas do processo inflamatório, com síntese de matriz extracelular, os leucócitos, que ativam enzimas proteolíticas e uma enorme variedade de fatores de crescimento e de citocinas, os quais degradam a matriz protéica e estimulam as células musculares lisas e os macrófagos. Finalmente, temos deposição de plaquetas e fibrina, com a formação de trombos.

A seqüência da formação da placa de aterosclerose é apresentada na Figura 1.

Figura 1 – Os estágios de desenvolvimento de uma placa. Inicialmente, há disfunção endotelial, seguida da penetração do LDL no sub-entotélio, com oxidação por macrófagos. Posteriormente, tem-se a da lâmina basal, e a da formação de células espumosas, com migração e proliferação das CMLV, e com síntese de matriz extracelular. Finalmente, ocorrerá deposição de plaquetas e fibrina, com formação de trombos

Enquanto existirem fatores agressivos ao endotélio, o processo inflamatório persistirá, levando ao agravamento da doença aterosclerótica na parede do vaso. A placa aterosclerótica, obstruindo as artérias de médio e

de grande calibre, levam à apresentação clínica mais comum da aterosclerose, que consiste na doença arterial obstrutiva periférica (DAOP)¹². Contudo, a DAOP ainda é a apresentação clínica da doença aterosclerótica menos diagnosticada e menos tratada até o momento.

A DAOP se manifesta de duas formas clínicas, a saber, a claudicação intermitente e a isquemia crítica.

1.2 A claudicação intermitente

O estreitamento da luz arterial, produzido pela doença arterial obstrutiva periférica (DAOP), pode gerar redução da capacidade de aumento de fluxo de sangue para grupos musculares dos membros inferiores durante exercícios, e, com isso, o indivíduo passa a apresentar dor característica, que chamamos claudicação intermitente¹³. A claudicação intermitente (CI) é definida como a dor muscular de membro inferior, que aparece após uma distância de marcha (exercício físico), e que cessa com o repouso. A claudicação intermitente apresentou uma incidência de 225/100.000 pessoas ao ano nos estudos de Framingham¹⁴, na década de 90. Diehn *et al.*, em 2004, observaram uma prevalência de 19.8% dos homens e de 16.8% das mulheres, em uma população alemã com faixa etária maior de 65 anos¹⁵.

A dor do paciente com claudicação intermitente surge em grupos musculares dos membros inferiores, quando o indivíduo anda, e tem intensidade crescente, diretamente proporcional ao tempo de marcha,

obrigando o doente a suspender, temporariamente, tal atividade, assim que atinge intensidade máxima. Com o repouso, o déficit metabólico causado pela isquemia é progressivamente compensado, a dor vai diminuindo, até desaparecer completamente. Nesse momento, o doente pode voltar a andar, e, ao fazê-lo, reinicia o ciclo de dor da mesma forma, caracterizando a intermitência.

A claudicação intermitente nunca ocorre com o paciente em repouso, ou quando ele assume determinadas posições. Aparece apenas com o exercício contínuo e desaparece com o repouso. Alterações na posição corporal não levam à melhora da dor. Com tais características, a CI é facilmente diferenciada de dores causadas por defeitos estruturais em ossos e ligamentos, neurites, osteoporose, artrite, hérnia de disco, e outras doenças que possam causar dor em extremidades.

Ela é sempre reproduzível após o esforço, com tempo e intensidade repetidos nos grupos musculares isquêmicos¹⁶. A localização da lesão obstrutiva, sua extensão, e os mecanismos compensatórios da isquemia dela decorrente (aumento do débito cardíaco, desenvolvimento de circulação colateral, dilatação das artérias, arteríolas e esfíncteres pré-capilares) influenciam a intensidade dos sintomas.

A claudicação intermitente tem intensidade variável, dependendo da extensão do segmento arterial acometido e do desenvolvimento da circulação colateral. As distâncias percorridas sem dor e com dor, bem como seu tempo de dissipação (que ocorre durante a interrupção da marcha), dependem da intensidade da isquemia. A CI mais branda só se manifesta

após longos percursos de caminhada, não impedindo que o paciente continue a andar por mais tempo, mesmo sentindo dor. Com a progressão da DAOP, ela torna-se mais intensa e, por isso, mais restritiva. A CI impeditiva é aquela em que a dor surge aos primeiros passos, demora a ceder, e impossibilita o paciente de ter autonomia para suas atividades profissionais ou sociais. De maneira geral, ela é considerada como isquemia de grau leve ou funcional, para a qual o membro com deficiência circulatória não apresenta iminência de lesão trófica, e, por isso, não há risco imediato, ou em curto prazo, de instalação de gangrena.

1.3 A isquemia crítica

A isquemia crítica de membros inferiores é a forma menos freqüente de aparecimento da DAOP. O termo isquemia crítica é usado para caracterizar pacientes com isquemia crônica, os quais apresentam dor de repouso, úlcera de extremidades com lesão de pele, ou gangrena em pés ou pernas¹⁷, ocorrendo em, aproximadamente, 500 - 1000 indivíduos por milhão ao ano, com maiores taxas entre indivíduos idosos, tabagistas e diabéticos¹⁸. A claudicação intermitente e a isquemia crítica dos membros inferiores são manifestações clínicas diferentes de uma mesma doença. Não obstante, apresentam resultados e prognósticos contrastantes, especialmente a respeito da preservação do membro. Enquanto a claudicação intermitente tem evolução benigna, com risco de amputação de

membro aproximado de 1% ao ano¹⁹, a isquemia crítica oferece este risco em nível mais elevado, chegando de 10 a até 40% de amputações¹⁸. A claudicação intermitente e a isquemia crítica apresentam peculiaridades fisiopatológicas, as quais as tornam incomparáveis. Os pacientes portadores de isquemia crítica possuem três vezes mais chances de apresentar infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, e óbito, do que os indivíduos com claudicação intermitente¹⁸.

O comprometimento aterosclerótico da DAOP ocorre mais freqüentemente na artéria femoral superficial, seguida pela artéria poplítea, aorta distal e suas bifurcações, e artérias ilíacas²⁰. Além disso, pacientes com isquemia crítica apresentam, geralmente, a doença arterial envolvendo mais segmentos arteriais do que a claudicação intermitente. Esta é, possivelmente, a expressão de uma doença mais severa em pacientes com isquemia crítica.

Estilos de vida mais favoráveis, com atenção à dieta, exercícios, interrupção do hábito de fumar, e identificação precoce de fatores de risco, são objetivos desejáveis e passíveis de serem alcançados. É importante estudar elementos que possam ter efeitos favoráveis na prevenção das doenças e, conseqüentemente, sobre a promoção da saúde.

Estes elementos, estando presentes na história clínica, no exame físico, ou em exames laboratoriais, nos permitem avaliar uma melhor, ou pior, evolução das doenças. A isso damos o nome de marcadores de prognóstico. Alguns exemplos destes marcadores são: o aumento da circunferência abdominal, relacionado com pior prognóstico para obesidade

e elevação das chances de se desenvolver síndrome metabólica²¹; elevação das taxas de hemoglobina A1-c, relacionadas com a elevação da insuficiência renal em diabéticos²²; e o Índice tornozelo braquial elevado, relacionado com a piora da DAOP²³.

Os marcadores de prognóstico devem ser práticos, de preferência pouco invasivos, com técnicas simples e reproduzíveis, e com grande sensibilidade para serem detectadas com pequenas alterações. O uso de marcadores de prognóstico permite, em muitos casos, conhecer a intensidade da progressão de uma doença, e serve como preditivo da mesma, em estudos epidemiológicos²⁴. Assim, se identifica, precocemente, grupos de indivíduos com maior risco de complicações e com doença mais agressiva, os quais poderão se beneficiar de um programa secundário de prevenção.

Na doença aterosclerótica, diversas substâncias produzidas pelo endotélio se elevam com a sua disfunção. Com isso, elas podem ser utilizadas como marcadoras de prognóstico para a doença aterosclerótica. Estas substâncias são conhecidas como marcadores de lesão endotelial. Destacamos as Prostaciclina, a Fibronectina, a Laminina, a E-selectina, a Endotelina, a Vitronectina, a Tromboplastina, o fator de von Willebrand, o fator relaxante derivado de endotélio, o ativador tecidual de plasminogênio (t-PA), a enzima de conversão de angiotensina, e a trombosmodulina.

Blann *et al.*²⁵, em 1995, analisaram algumas destas moléculas de endotélio vascular, buscando um marcador seguro para ser padrão na lesão endotelial, e, apesar de existirem diversos candidatos com elevado perfil em

potencial para serem marcadores de lesão endotelial, eles destacaram quatro como os mais importantes:

1. O ativador tecidual de plasminogênio (tPA),
2. O inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1),
3. O fator de von Willebrand,
4. A trombomodulina.

O ativador tecidual de plasminogênio (tPA) tem um importante papel na fibrinólise, sendo usado como agente terapêutico na trombólise do infarto agudo de miocárdio (IAM). Seu papel de destaque é para fenômenos de hemostasia, e, como sua elevação promove lise de coágulos, seu papel como marcador de disfunção endotelial ainda é incerto.

O inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1) também tem importância no processo de hemostasia. É produzido por hepatócitos, plaquetas, células do mesotélio, monócitos, e células da musculatura lisa. Entretanto, seu uso clínico ainda parece incerto, carecendo de maiores estudos para estabelecer a relação desta molécula como marcadora de lesão endotelial.

O fator de von Willebrand apresenta-se elevado em inúmeras doenças inflamatórias, nas quais ocorre lesão endotelial. Seu uso como marcador específico poderia ser duvidoso, pois também está presente em grânulos plaquetários, os quais são liberados na circulação em processos inflamatórios.

A Trombomodulina, por sua vez, tem despertado maior interesse. É um elemento do endotélio, importante como regulador de atividade de trombina, e participa da ativação da proteína C. Sua elevação no endotélio parece não estar relacionada ao aumento de citocinas e do fator de necrose tumoral (TNF), diferentemente do fator de von Willebrand, segundo Seigneur *et al.*²⁶ em 1993. Isto significa que a trombomodulina eleva-se como produto do dano celular, e não da atividade da célula endotelial.

Pearson *et al.*⁹ em 1994, estudando a interação da parede vascular e sua interação com o fenômeno de trombose, referem que as células endoteliais são responsáveis pela secreção, ou expressão, em sua superfície, de uma larga variedade de mediadores envolvidos no controle da trombose. Estes incluem o fator de von Willebrand, prostaciclina, óxido nítrico, ativadores e inibidores do plasminogênio tecidual, e a Tmp, como alguns dos marcadores em potencial. A produção de cada uma destas substâncias pode ser modulada, em alguns casos, muito rapidamente a um estímulo externo, e em outros casos, muito lentamente. A trombina é o estímulo chave que afeta a produção de quase todos estes mediadores.

Apesar de existirem várias substâncias produzidas no endotélio, as quais são usadas como marcadoras de lesão endotelial, não temos, ainda, um marcador seguro para o seguimento e prognóstico da DAOP. Por apresentar níveis séricos elevados²⁷ na ocorrência de lesão endotelial aterosclerótica, supusemos que a trombomodulina poderia vir a ser um importante marcador de DAOP.

1.4 A Trombomodulina

1.4.1 Histórico

A trombomodulina (TM)²⁸ é um proteoglicano da parede do endotélio, receptor de trombina. Foi descoberta por Esmon e Owen em 1981, quando procuravam por um co-fator endotelial responsável pela ativação da proteína C. Por estar presente na membrana da célula endotelial e por participar da modulação do processo de trombose e de coagulação, recebeu o nome de trombomodulina.

1.4.2 Genética

O gene da TM já foi clonado, seqüenciado e mapeado²⁹. Está localizado no cromossomo 20, e em sua seqüência genética não encontramos introns. Os introns são segmentos do DNA que estão localizados no mesmo cromossomo, porém, que não são codificantes protéicos.

Outros segmentos do DNA auxiliam a transcrição gênica, como a região promotora, a qual pode estar localizada num mesmo cromossomo, ou em cromossomo distante. A região promotora da TM se localiza no mesmo cromossomo e em sua região proximal, e pode sofrer mutações naturais ou

desencadeadas por outras proteínas^{30,31}. Estas alterações parecem promover uma modificação em sua expressão³². Com isso, a TM pode ser expressa em maior ou menor quantidade no endotélio, tendo sua expressão regulada por este segmento.

1.4.3 Estrutura bioquímica

Devido a suas pontes dissulfúricas, a TM é uma proteína muito estável e compacta; seu peso molecular é de 60,3 KDa, variando de 75 KDa forma não reduzida até 105 KDa em sua forma reduzida. Ela pode ser obtida de vários animais, como ratos e bovinos²⁸, e em pulmão e placenta humanos³³.

A TM é uma molécula transmembrana glicosilada, com 557 aminoácidos e com cinco domínios estruturais bem definidos.

O primeiro deles - aproximadamente metade do domínio extracelular - consiste de uma amina terminal globular, e possui 226 aminoácidos, os quais, provavelmente, são essenciais para a endocitose. O segundo domínio da porção extracelular da TM, composto por seis estruturas consecutivas homólogas ao fator de crescimento epidérmico, dentre as quais, as três últimas contêm a região necessária para a ligação da trombina e para a ativação da proteína C, possui 236 aminoácidos. O domínio seguinte, com 34 aminoácidos, é rico em serina e treonina, podendo conter cadeias de condroitina ancoradas à serina, cujas pontes sulfatadas são de grande

importância. Os 23 aminoácidos que se seguem estão localizados na porção hidrofóbica, de domínio transmembrana, e se constituem no segmento de maior conservação entre as espécies. Finalmente, o quinto domínio: a região carboxi-terminal e intracitoplasmática, com 38 aminoácidos, contém sítios para fosforilação, necessários para a endocitose^{34,35,36,37}. A estrutura bioquímica da TM é mostrada na Figura 2.

Figura 2 – Estrutura molecular da TM com seus cinco domínios

1.4.4 Distribuição

Cada célula endotelial contém de 30.000 a 100.000 moléculas de TM, sendo esta responsável por 50 a 60% dos sítios de ligações de trombina na superfície do endotélio. A maior quantidade de TM encontra-se na micro-circulação³⁸.

A TM está presente em todas as células endoteliais, inclusive naquelas do sistema nervoso central^{39,40,41}. Ela não é um polipeptídeo exclusivo de células endoteliais, está presente em megacariócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, célula muscular lisa, queratinócitos, e osteoblastos^{42,43,44}. Também é encontrada no sinciciotrofoblasto placentário⁴⁵ e nas plaquetas⁴⁶. A TM não é encontrada nos sinusóides hepáticos e nas vênulas pós-capilares dos linfonodos⁴⁵.

A trombomodulina plasmática (TMP) é a forma circulante decorrente da degradação proteolítica da trombomodulina endotelial (TM), sem os domínios intracelulares, e transmembrana. A TMP é composta por fragmentos de diferentes pesos moleculares⁴⁷, apresentando sua excreção via renal^{47,48,49}, e sendo metabolizada pelo fígado^{50,51,52}.

1.4.5 Mecanismo de ação

A atividade da trombomodulina (TM) no endotélio vascular se caracteriza por sua ligação à trombina circulante, diminuindo a atividade

(pró-coagulante) e a ativação da proteína C do sistema de coagulação. A ativação da proteína C exige Cálcio (Ca^{+2}), trombina, e dois co-fatores: Proteína S (do plasma), e a Trombomodulina (TM) endotelial^{53,54,55}. Estes elementos que participam da ativação da proteína C são apresentados na Figura 3.

Figura 3 – A ativação da proteína C depende da trombomodulina do endotélio da trombina circulante e da proteína S circulante, na presença de Ca^{+2}

A interação desses componentes ocorre em etapas. Inicialmente, temos a formação do complexo trombina-trombomodulina. Esta reação altera a especificidade do substrato da trombina, de tal forma que já não haja clivagem do fibrinogênio, nem ativação do fator V ou das plaquetas (fenômeno antitrombótico). Isto promove a ativação da proteína C. Esta etapa é mostrada na Figura 4.

Figura 5 – Complexo molecular que ativa a proteína C, e que inibe os fatores V e VIII da coagulação, além de inibir a ativação plaquetária e de regular o sistema fibrinolítico.

Além de ser um receptor de trombina na superfície do endotélio, a TM apresenta propriedades antitrombogênicas⁵⁶, e parece contribuir para a ativação da procarboxipeptidase/TAFI do sistema fibrinolítico, participando, inclusive, da regulação da fibrinólise⁵⁷ e do processo inflamatório⁵⁸. Estudos mostram que a ausência da TM no endotélio possa ser letal em ratos, estando sua presença relacionada com a embriogênese⁵⁹.

1.5 Doenças que promovem alterações de trombomodulina

A TM apresenta-se elevada em diversas doenças, como na coagulação intravascular disseminada (CIVD), doença hipertensiva da gravidez

(DHEG)⁶⁰, infecções por *Plasmódio falciparo*⁶¹, e infecções por *Rickettsias*⁶², Hepatites⁵², Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)⁶³, aneurismas de aorta abdominal (não complicados)⁶⁴, doença periférica arterial oclusiva com reestenoses tardias pós angioplastia periférica⁶⁵, desordens mieloproliferativas crônicas⁶⁶, e doenças neoplásicas malignas^{67,68}.

No Brasil, Villaça *et al.*⁶⁹, em 1999, realizaram um estudo da TM em pacientes com hanseníase, em diversas fases, comparando-os com indivíduos normais. Concluíram que a elevação dos níveis plasmáticos de TM poderia ser usada como um marcador de lesão endotelial, nos doentes com hanseníase do grupo multibacilar, mas não estaria relacionado com as fases da doença.

Estudos relatam que os níveis séricos de TM estão diminuídos, como na utilização de algumas drogas, tais quais os anticoncepcionais orais⁷⁰ e o cilostazol⁷¹.

1.6 Trombomodulina na doença aterosclerótica

As pesquisas com TMp, envolvendo a doença aterosclerótica, iniciaram-se com Seigneur *et al.*²⁷ em 1993. Eles detectaram TMp mais elevada em pacientes com doença aterosclerótica em diferentes territórios arteriais, em comparação com controles normais. Esse achado incentivou o uso dessa substância como marcador diagnóstico de doença aterosclerótica.

Conri *et al.*⁷² em 1993, realizando estudos em 37 pacientes com doença ateromatosa e em 21 controles saudáveis, evidenciaram uma correlação entre a doença aterosclerótica e os níveis plasmáticos de trombomodulina.

Handa *et al.*⁷³ em 1996, avaliando 18 homens com Claudicação Intermitente, observaram que os níveis da trombomodulina eram significativamente mais elevados do que em indivíduos que não apresentavam fatores de risco para a doença aterosclerótica. Concluíram que a Tmp serviria como indicador para a deterioração do endotélio periférico, e que o sistema de coagulação e fibrinólise estariam ativados em pacientes com Claudicação Intermitente.

Blann *et al.*⁷⁴ em 1997, estudando 200 pacientes com DAOP e comparando-os com 213 controles, verificaram que os níveis da Tmp são mais elevados em pacientes cuja doença aterosclerótica acomete mais de um território arterial, do que naqueles em que o acometimento é de apenas um território. Concluíram que a Tmp poderia indicar doença aterosclerótica mais disseminada.

Boffa *et al.*^{75,76} em 1998 e 1996, mostraram que a Tmp parecia ser o melhor método não-invasivo para se detectar dano no endotélio.

Tsakiris *et al.*⁶⁵ em 1999, estudando 71 pacientes antes e após angioplastia percutânea, observaram que a dosagem de Tmp estava elevada, não só naqueles pacientes que evoluíram com reestenose após angioplastia percutânea em segmento fêmoro-poplíteo, mas também

naqueles que apresentavam estádios mais avançados da DAOP, nos quais os processos ateroscleróticos têm maior agressividade.

Wisniewska *et al.*⁷⁷ em 2001, analisando 87 pacientes com angina pectoris instável, e comparando-os com 30 pacientes do grupo controle, verificaram que a TMp encontrava-se elevada e que a coexistência de hipertensão arterial, diabetes, e tabagismo não afetavam os níveis da TMp.

Alguns estudos apresentam resultados conflitantes ou controversos em relação ao aumento da TM em doença aterosclerótica.

Salomaa *et al.*²⁴ em 1999, num estudo epidemiológico (ARIC Study) envolvendo 14.170 pacientes, mostraram dados conflitantes da TMp em relação à doença aterosclerótica, em pacientes com doença coronária e com estenose de carótida. Eles encontraram níveis mais elevados da TMp em pacientes com doença carotídea, quando comparados com o controle, e níveis menores da TMp em pacientes com doença coronária.

Sernau *et al.*⁷⁸ em 1995, estudando 183 pacientes com diabetes melitus, com ou sem DAOP, e um segundo grupo de 33 doentes com DAOP, sem nenhum sinal de diabetes, não encontraram elevação dos níveis de TMp entre os grupos e seus controles. Sugeriram que a TMp seria um marcador de dano endotelial de microcirculação, e não de macrocirculação.

Peter *et al.*⁷⁹ em 1997, realizaram estudos em 52 pacientes com DAOP, e a extensão da doença foi avaliada com base em angiografia. Não houve evidência de uma relação linear entre a TMp e a doença aterosclerótica.

Jonh *et al.*⁸⁰ em 1999, estudando 29 pacientes com hipercolesterolemia e 30 pacientes saudáveis, demonstraram que a TM não é um bom marcador de lesão endotelial, e sugeriram haver correlação com vaso dilatação nas fases iniciais do processo aterosclerótico.

Blann *et al.*⁸¹ em 2000, empregando o índice tornozelo-braço como expressão da gravidade da DAOP, em 45 claudicantes, e o grau de estenose como expressão de gravidade da doença carotídea, em 53 pacientes com ataque isquêmico transitório, não evidenciaram correlação entre os níveis de TMp e esses parâmetros.

Salomaa *et al.*⁸² em 2001, em seus estudos epidemiológicos, dessa vez envolvendo 15.792 participantes, não encontraram associação positiva entre os doentes com DAOP e os níveis de TMp.

Postulou-se que o que o aumento dos níveis plasmáticos da trombomodulina corresponda ao grau de extensão de injúria endotelial. Com isso, a abordagem para estudar a lesão vascular, através da investigação de produtos endoteliais circulantes, tornou-se interessante.

Apesar de alguns autores demonstrarem a relação da TMp com a doença arterial obstrutiva periférica, nenhum deles, até o presente momento, analisou as concentrações da TMp, relacionando-a com o grau de lesões vasculares.

Apesar das controvérsias na literatura, procuramos mostrar que a TMp pode ser utilizada como um elemento marcador de lesão endotelial, fornecendo um prognóstico de gravidade nos pacientes com Claudicação Intermitente. Na verdade, o uso da TMp poderia fornecer o prognóstico da

---

gravidade da doença arterial obstrutiva periférica (DAOP), e serviria para ser utilizada em estudos epidemiológicos, bem como para identificar pacientes com elevado risco de apresentar pior prognóstico, os quais se beneficiariam com um programa de prevenção secundária.

Por isso, a análise do comportamento dos níveis da TMp, nos pacientes com Claudicação Intermitente e com Isquemia Crítica, nos pareceu o melhor método para analisar a progressão da lesão aterosclerótica. Desse modo, o papel da TMp como um indicador da severidade da DAOP ainda deve ser provado.

OBJETIVOS

2 Objetivos

Analisar os grupos de pacientes com claudicação intermitente e com isquemia crítica, e suas variáveis, para validar a utilização de um produto endotelial circulante como um marcador de prognóstico de gravidade de DAOP.

Avaliar o comportamento da Trombomodulina (TMp) como o marcador da gravidade da Doença Arterial Obstrutiva Periférica (DAOP), comparando os níveis plasmáticos de Trombomodulina em pacientes com Claudicação Intermitente com os pacientes com Isquemia Crítica de membros inferiores.

Verificar as correlações entre os valores obtidos da TMp com as variáveis: idade (anos), colesterol (mM), LDL (mM), HDL (mM), e triglicérides (mM), entre os grupos de pacientes com claudicação intermitente e com isquemia crítica

Verificar as correlações entre os valores da TMp com as variáveis: sexo, raça, hábito de fumar, diabetes, hipertensão, medicação redutora de colesterol, medicação antiagregante plaquetária, e nível de oclusão arterial, entre os grupos de pacientes com claudicação intermitente e com isquemia crítica.

Validar este modelo de estudo, com a utilização de um produto endotelial circulante específico de lesão endotelial como marcador de prognóstico da DAOP, para ser empregado em pacientes com claudicação intermitente.

MÉTODO

3 Método

No ambulatório de DAOP do Hospital das Clínicas da FMUSP, foram estudados 41 doentes com diagnóstico clínico de claudicação intermitente, os quais já se encontravam em acompanhamento, e outros 40 pacientes que apresentavam isquemia crítica de membros inferiores, internados na enfermaria do Departamento de Cirurgia Vascular, de abril de 2002 a dezembro de 2003, segundo um protocolo preestabelecido (Anexo C).

O protocolo de exame incluiu a realização de anamnese, exame físico geral e vascular (palpação de batimentos em trajetos arteriais), determinação do grau de claudicação, conforme classificação proposta pela Sociedade Internacional de Cirurgia Vascular (ISCVS) e pela Sociedade de Cirurgia Vascular dos Estados Unidos da América (SVS), atualizada em 1997, e preconizado pelo TASC 2000⁸³ (Apêndice I).

As provas funcionais compreenderam a medida do índice tornozelo-braquial (ITB) e o teste de esforço em esteira com carga progressiva. Ambos exames foram realizados em todos os pacientes com acompanhamento ambulatorial no serviço.

Para determinar o índice tornozelo-braquial (ITB), efetuou-se a medida da pressão sistólica das artérias da perna e o resultado comparado

com a medida obtida no membro superior. As duas medições foram obtidas utilizando um detetor ultra-sônico portátil, de 8 MHz, com onda contínua de fluxo (*Scimed*) e um manguito de pressão. No membro superior, as artérias aferidas foram as radiais, direita e esquerda. Nos membros inferiores as medidas foram obtidas nas artérias dorsais do pé e nas tibiais posteriores. O maior valor sistólico de cada membro inferior foi dividido pelo maior valor sistólico do membro superior, obtendo-se como resultado o ITB.

$$\text{ITB} = \frac{\text{Maior pressão sistólica de tornozelo ao Doppler}}{\text{Maior pressão sistólica braquial ao Doppler}}$$

O teste de esforço em esteira com carga progressiva foi realizado nos pacientes com claudicação intermitente, em esteira rolante com velocidade inicial de 3,2 Km/h e no plano (0 graus de inclinação). A dificuldade foi aumentada paulatinamente, havendo um aumento progressivo de 2% na inclinação a cada 2 minutos. O paciente andava até apresentar a dor máxima, característica da claudicação, definida como aquela que não permite ao paciente andar. Finalizada a prova foi medida a distância máxima de marcha.

O Laboratório Central do Hospital das Clínicas foi responsável pelas provas laboratoriais, que incluíram as dosagens de glicemia em jejum, lipidograma, uréia e creatinina. O exame específico de dosagem de trombomodulina sérica foi realizado pelo laboratório do Departamento de

Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Nos 41 pacientes com claudicação intermitente, o protocolo de avaliação foi completo, e o diagnóstico foi realizado através de teste de esteira com carga progressiva, com medida de índice pressórico tornozelo-braquial, antes e após o teste.

A isquemia crítica foi diagnosticada em pacientes internados que apresentavam dor isquêmica de repouso persistente, e que requisessem analgesia regular há mais de duas semanas, ou que apresentassem úlcera, ou gangrena de extremidades. Também apresentavam pressão sistólica inferior a 40 mmHg. O teste de carga progressiva, em pacientes com isquemia crítica, não foi realizado.

No estudo não foram incluídos os pacientes portadores ou com antecedentes de hepatite, malária, aneurisma de aorta abdominal ou periférica, insuficiência renal crônica, neoplasias malignas e doenças do colágeno. Foram excluídos os pacientes que apresentavam sopro carotídeo, membros amputados, que tinham sido submetidos à cirurgia cardíaca ou à angioplastia periférica há menos de 6 meses, além daqueles que tivessem usado imunossupressores ou drogas citotóxicas.

Todos pacientes assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo a pesquisa aprovada pelo Comitê de Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (Anexo A e B). Todos os pacientes foram submetidos a tratamento semelhante, conforme os

padrões éticos determinados pela da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde de 1996.

3.1 Método laboratorial

3.1.1 Coleta do material para análise de trombomodulina

A coleta de sangue para a análise de Tmp foi realizada sempre pela mesma pessoa e do mesmo modo em todos os 81 pacientes, mediante uma rápida punção, não traumática, em uma veia superficial do membro superior, utilizando *vacutaner*, em tubo, com 0,11M de citrato de sódio.

Depois de adequadamente identificado, o material foi conservado em gelo até ser levado ao laboratório da Cardio-Geriatria do Instituto do Coração (INCOR). As amostras foram centrifugadas a 2000 *g* durante 15 minutos e a uma temperatura de 4°C; o plasma foi retirado e estocado a -70°C, sendo armazenado conforme as especificações da *American Diagnostica Inc.*

3.1.2 Determinação da trombomodulina plasmática

A Tmp foi quantificada pelo laboratório do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São

Paulo, utilizando-se o método imunoenzimático de ELISA, com técnica de anticorpo monoclonal (*Imubind® Thrombomodulin Elisa Kit*).

Após serem retirados do freezer, as amostras ficaram 2 horas em temperatura ambiente, para serem analisados.

Inicialmente uma pequena amostra de aproximadamente 200µl, diluída na proporção de 1/5 em tampão de diluição, foi aplicada em cada poço da placa de microtitulação, por uma hora e em temperatura ambiente. Depois de lavadas 4 vezes com solução tampão, foram adicionadas às placas 200µl do segundo anticorpo monoclonal, o qual ficou incubado por mais 30 minutos.

As placas foram lavadas outras 4 vezes com solução tampão, e mais 200µl do substrato - perborato/3,3',5,5' - tetrametilbenzidina (TMB) – foram acrescidos, para desenvolver a coloração azul, por 20 minutos em temperatura ambiente. Interrompeu-se a reação adicionando-se 100 µl de 0,5 M de ácido sulfúrico. A solução tornou-se amarelada. Os níveis plasmáticos de TM puderam ser determinados pela leitura das placas de micro-teste. Expostas à absorbância de onda de 450nm por 30 minutos, as soluções foram comparadas ao valor da curva padrão, utilizada com a TM de referência. O resultado final foi expresso em ng/ml.

3.2 Método estatístico

Os pacientes com claudicação intermitente (CI) e com isquemia crítica (IC), foram avaliados de acordo com variáveis quantitativas e qualitativas.

Entre as variáveis quantitativas foram incluídos a Idade medida em anos, o Colesterol em mM, a LDL em mM, a HDL em mM, os Triglicérides em mM e a Tmp medida em ng/mL.

Foram incluídas entre as variáveis qualitativas dos objetos da pesquisa a raça, dividida em branca e outras; os sexos masculino e feminino; o hábito de fumar nenhum, até vinte ou mais de vinte cigarros por dia; a presença ou ausência de diabetes; a presença ou ausência de hipertensão; a medição redutora de colesterol, sim ou não; o uso de medicação antiagregante, sim ou não; finalmente o nível de oclusão da aorta e femoral.

A avaliação dos grupos de pacientes com claudicação intermitente e isquemia crítica, foi realizada pelo teste t de *Student* quando consideradas as variáveis quantitativas. Nos casos das variáveis triglicérides e Tmp, elas foram transformadas em logaritmo, para que a distribuição da variável pudesse ser considerada normal ou gaussiana, e a variância nos dois grupos pudesse ser considerada como equivalente ou homogênea, tornando viável a aplicação do referido teste.

As hipóteses de normalidade e de homogeneidade de variância foram provadas, respectivamente, pelos testes de Shapiro-Wilk e de Levene.

Para a comparação dos grupos de pacientes com claudicação intermitente e com isquemia crítica, quanto às variáveis qualitativas, foi empregado o teste qui-quadrado. Foram determinados os números de indivíduos, em cada categoria ou frequência absoluta, e as respectivas porcentagens.

Para determinar o grau de relação linear entre a trombomodulina e as outras variáveis quantitativas (idade, colesterol, LDL, HDL, triglicérides), foram determinados os coeficientes de correlação de Pearson.

Para determinar a relação da trombomodulina entre os grupos de doentes e as variáveis qualitativas, foi empregado o procedimento da análise de variância de dois fatores (*two-way anova*).

Em todos os procedimentos anteriormente citados, adotou-se o nível de 5% como parâmetro de significância estatística. Esta decisão foi tomada quando se obteve um valor de probabilidade p menor do que 0,05.

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Avaliação das variáveis quantitativas e qualitativas nos grupos de claudicação intermitente e isquemia crítica

4.1.1 Variáveis quantitativas

As variáveis quantitativas (idade, colesterol, LDL, HDL, triglicérides), comparando-se os grupos de pacientes com claudicação intermitente e de pacientes com isquemia crítica, foram avaliadas pelo teste t de *Student*, e são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparações entre os grupos de pacientes com claudicação intermitente e os pacientes com isquemia crítica, quanto às variáveis quantitativas

Variável	Claudicação Intermitente				Isquemia Crítica				t Student
Idade	41	67	43	88	40	66	37	85	0,723
Colesterol	41	209	110	328	40	198	107	269	0,300
LDL	41	133	62	217	40	126	48	184	0,391
HDL	41	45	22	74	40	41	22	66	0,205
Triglicérides	41	157	53	383	40	151	73	315	0,998 ^a

^a calculado sobre dados transformados para logaritmo

Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos e as variáveis analisadas.

Os Valores obtidos da Tmp, em cada um dos pacientes, nos grupos de pacientes com claudicação intermitente e de pacientes com isquemia crítica, são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores obtidos da Tmp em cada paciente, nos grupos de pacientes com claudicação intermitente e com isquemia crítica

Paciente	Claudicação Intermitente	Tmp (ng/ml)	Paciente	Isquemia Crítica	Tmp (ng/ml)
1	GRAU 1-A	3,260	1	GRAU 2	6,976
2	GRAU 1-A	2,872	2	GRAU 2	7,109
3	GRAU 1-A	1,963	3	GRAU 2	2,040
4	GRAU 1-A	4,800	4	GRAU 2	3,648
5	GRAU 1-A	6,960	5	GRAU 2	7,008
6	GRAU 1-A	5,445	6	GRAU 2	7,706
7	GRAU 1-A	9,674	7	GRAU 2	2,920
8	GRAU 1-A	3,048	8	GRAU 2	5,800
9	GRAU 1-A	13,558	9	GRAU 2	3,841
10	GRAU 1-A	4,279	10	GRAU 2	4,026
11	GRAU 1-A	3,844	11	GRAU 2	2,396
12	GRAU 1-A	10,123	12	GRAU 3-A	18,220
13	GRAU 1-A	7,962	13	GRAU 3-A	2,141
14	GRAU 1-A	3,982	14	GRAU 3-A	5,389
15	GRAU 1-A	5,072	15	GRAU 3-A	16,196
16	GRAU 1-B	3,410	16	GRAU 3-A	12,113
17	GRAU 1-B	2,803	17	GRAU 3-A	6,657
18	GRAU 1-B	4,428	18	GRAU 3-A	4,537
19	GRAU 1-B	2,317	19	GRAU 3-A	2,690
20	GRAU 1-B	3,445	20	GRAU 3-A	8,141
21	GRAU 1-B	4,907	21	GRAU 3-A	5,824
22	GRAU 1-B	10,983	22	GRAU 3-A	5,947
23	GRAU 1-B	13,612	23	GRAU 3-A	0,822
24	GRAU 1-B	5,864	24	GRAU 3-A	2,238
25	GRAU 1-B	3,441	25	GRAU 3-A	3,216
26	GRAU 1-B	3,436	26	GRAU 3-A	3,198
27	GRAU 1-B	1,292	27	GRAU 3-A	6,925
28	GRAU 1-B	6,281	28	GRAU 3-A	14,430
29	GRAU 1-B	4,555	29	GRAU 3-B	8,710
30	GRAU 1-B	7,004	30	GRAU 3-B	2,317
31	GRAU 1-B	2,645	31	GRAU 3-B	3,559
32	GRAU 1-B	2,770	32	GRAU 3-B	3,507
33	GRAU 1-C	5,507	33	GRAU 3-B	3,480

(continua)

(conclusão)

Paciente	Claudicação Intermitente	TMp (ng/ml)	Paciente	Isquemia Crítica	TMp (ng/ml)
34	GRAU 1-C	4,294	34	GRAU 3-B	4,669
35	GRAU 1-C	3,630	35	GRAU 3-B	7,868
36	GRAU 1-C	13,424	36	GRAU 3-B	3,674
37	GRAU 1-C	0,775	37	GRAU 3-B	17,639
38	GRAU 1-C	3,850	38	GRAU 3-B	3,595
39	GRAU 1-C	5,249	39	GRAU 3-B	13,330
40	GRAU 1-C	1,158	40	GRAU 3-B	8,943
41	GRAU 1-C	5,269			

Os valores plasmáticos mínimos encontrados para os pacientes com Claudicação Intermitente e com Isquemia Crítica foram, respectivamente, 0,775 e 0,822 ng/mL.

Os valores plasmáticos máximos encontrados para os pacientes com Claudicação Intermitente e com Isquemia Crítica foram, respectivamente, 13,612 e 18,220 ng/mL.

A variável quantitativa trombomodulina, comparando com os grupos de pacientes com claudicação intermitente e os pacientes com isquemia crítica, foi avaliada pelo teste t de *Student*, e é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparações entre os grupos de pacientes com claudicação intermitente e os pacientes com isquemia crítica, quanto à dosagem dos níveis séricos de trombomodulina

	Claudicação Intermitente	Isquemia Crítica	t-Student
Trombomodulina	Média	Média	<i>p</i>
ng/ml	5.20	6.34	0.265

^a calculado sobre dados transformados para logaritmo

Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos e a variável analisada ($p = 0,265$).

4.1.2 Variáveis qualitativas

As variáveis qualitativas (sexo, raça, hábito de fumar, número de cigarros consumidos por dia, diabetes, hipertensão, medicação redutora de colesterol, e antiagregantes), comparando-se os grupos de pacientes com claudicação intermitente e de pacientes com isquemia crítica, foram avaliadas empregando-se o teste de qui-quadrado. Suas frequências absolutas e percentuais de indivíduos são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Comparações entre os grupos de Claudicação Intermitente e de Isquemia Crítica, quanto às variáveis qualitativas

Variável	Categoria	Claudicação Intermitente		Isquemia crítica		χ^2 (p)
		Freq.	%	Freq.	%	
Sexo	Feminino	16	39,0	16	40,0	0,928
	Masculino	25	61,0	24	60,0	
Raça	Branca	31	75,6	35	87,5	0,168
	Outras	10	24,4	5	12,5	
Tabagismo (Cigarros/dia)	Nenhum	11	26,8	9	22,5	0,567
	Até 20	9	22,0	6	15,0	
	Mais de 20	21	51,2	25	62,5	
Diabetes	Ausente	25	61,0	27	67,5	0,540
	Presente	16	39,0	13	32,5	
Hipertensão	Ausente	14	34,1	15	37,5	0,753
	Presente	27	65,9	25	62,5	

(continua)

(conclusão)

Variável	Categoria	Claudicação Intermitente		Isquemia crítica		χ^2 (p)
		Freq.	%	Freq.	%	
Redutor de colesterol	Sim	12	29,3	1	2,5	0,001*
Antiagregante	Não	15	36,6	30	75,0	
	Sim	26	63,4	10	25,0	0,001*
Nível de oclusão	Aorta	11	26,8	16	40,0	0,209
	Outra	30	73,2	24	60,0	

^a freqüências de ex-fumantes e fumantes foram agrupadas

* Associação significativa entre grupos e a variável a um nível menor do que 5%

Somente houve evidência de associação significativa, entre as medicações utilizadas pelos pacientes, nos grupos de claudicação intermitente e nos de isquemia crítica ($p = 0,001$).

Observa-se que 29,3% (12/41) dos pacientes com claudicação intermitente tomavam redutor do colesterol, enquanto somente 2,5% (1/40) dos pacientes com isquemia crítica tomavam essa medicação.

Observa-se também que 63,4% (26/41) dos pacientes com claudicação intermitente encontravam-se fazendo uso de antiagregante plaquetário, e que apenas 25% (10/40) tomavam essa medicação quando apresentavam isquemia crítica.

Não foram observadas diferenças significativas entre as outras variáveis nos dois grupos analisados.

4.2 Determinação da correlação linear entre a trombomodulina e as variáveis quantitativas

A avaliação do grau de correlação entre a TMp e as variáveis quantitativas, para os grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica, foram realizadas através do coeficiente de correlação de Pearson, e é mostrada na Tabela 5.

Tabela 5 - Coeficientes de correlação entre a TMp e cada variável quantitativa, com respectivos valores de probabilidade p

Variável	Claudicação		Isquemia	
	Intermitente		Crítica	
	Coef. Correl.	p	Coef. Correl.	p
Idade	0,330	(0,035) *	0,432	(0,005) *
Colesterol	-0,341	(0,034) *	-0,157	(0,348)
LDL	-0,367	(0,021) *	-0,080	(0,635)
HDL	-0,071	(0,669)	-0,004	(0,979)
VLDL	-0,202	(0,218)	-0,302	(0,065)
Triglicérides	-0,205	(0,211)	-0,305	(0,063)

* significativamente diferente de zero, no nível menor do que 5%

Existe uma correlação linear entre a TMp e as variáveis idade, colesterol, e LDL, no grupo de claudicação intermitente ($p < 0,05$), e entre a TMp e a idade, no grupo de isquemia crítica.

Os coeficientes de correlação dos pacientes e as variáveis idade, colesterol e suas frações, e triglicérides, nos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica, são mostrados nos Gráficos 1, 2, 3, e 4.

Gráfico 1 – Correlação linear entre a TMp e a idade, nos pacientes dos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica

Idade: Claudicação intermitente, coeficiente de correlação 0,330 ($p = 0,035$);
Isquemia crítica, coeficiente de correlação 0,432 ($p = 0,005$).

Apesar da dispersão dos resultados da TMp, conseguiu-se obter uma correlação da TMp em relação à idade e à claudicação intermitente, coeficiente de correlação de 0,330 ($p = 0,035$). Obteve-se, também, uma correlação da TMp em relação à idade e à isquemia crítica de $p = 0,432$ ($p = 0,005$).

Existe correlação linear entre a TMp e o colesterol, no grupo de claudicantes, coeficiente $-0,341$ ($p = 0,034$). Esta correlação não existe entre os pacientes com isquemia crítica.

Gráfico 2 - Correlação linear entre a Tmp e o colesterol, nos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica

Gráfico 3 - Correlação linear entre a Tmp e o LDL, nos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica

Existe correlação linear entre a Tmp e o LDL, no grupo de claudicantes, coeficiente de correlação de Pearson = $-0,367$ ($p = 0,021$). Esta correlação não existe entre os pacientes com isquemia crítica.

Gráfico 4 - Correlação linear entre a Tmp e os triglicérides, nos grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica

Não existe uma correlação da Tmp e os triglicérides, tanto nos claudicantes, como nos pacientes com isquemia crítica, $p=0,211$ e $p=0,063$.

4.3 Determinação da correlação entre a trombomodulina e as variáveis qualitativas

Para avaliação do grau de correlação entre a Tmp e as variáveis qualitativas, nos grupos de pacientes com claudicação intermitente e nos com isquemia crítica, foi empregado o procedimento da análise de variância de dois fatores (*two-way anova*). As estatísticas descritivas dos valores de

TMp, de acordo com a variável qualitativa, e dos grupos de doentes são mostradas na Tabela 6.

Tabela 6 – A avaliação do grau de correlação entre a TMp e as variáveis qualitativas e os grupos de doentes

Variável	Categoria	Claudicação intermitente				Isquemia crítica			
		n	Média	Mín.	Máx.	n	Média	Mín	Máx
Sexo	Fem.	16	5,66	1,96	13,56	16	6,87	0,82	16,20
	Masc.	25	4,91	0,78	13,61	24	5,98	2,04	18,22
Cor	Branca	31	5,38	1,16	13,61	35	6,45	0,82	18,22
	Outras	10	4,65	0,78	13,42	5	5,56	2,69	8,94
Tabagismo (cigarros/dia)	Nenhum	11	5,06	2,32	9,67	9	6,25	0,82	16,20
	Até 20	9	6,55	2,87	13,56	6	6,67	2,14	12,11
	Mais de 20	21	4,69	0,78	13,61	25	6,29	2,04	18,22
Diabetes	Ausente	25	5,01	1,16	13,61	27	6,80	2,14	18,22
	Presente	16	5,50	0,78	13,42	13	5,38	0,82	14,43
Hipertensão	Ausente	14	4,33	1,96	10,98	15	4,30	2,14	8,71
	Presente	27	5,65	0,78	13,61	25	7,56	0,82	18,22
Redução colesterol	Não	29	4,83	0,78	13,56	39	6,45	0,82	18,22
	Sim	12	6,08	2,77	13,61	1	2,04	2,04	2,04
Antiagregante	Não	15	6,15	0,78	13,61	30	6,78	2,14	18,22
	Sim	26	4,65	1,16	13,56	10	5,01	0,82	8,71
Nível de oclusão	Aorta	11	5,81	0,78	13,61	16	4,85	2,04	13,33
	Femoral	30	4,98	1,16	13,42	24	7,33	0,82	18,22

Não foram observadas diferenças significativas na correlação entre a TMp e as variáveis qualitativas, nos dois grupos analisados.

As médias do nível plasmático de trombomodulina, comparando os grupos de claudicação intermitente e de isquemia crítica, são apresentadas nos Gráficos de 5 a 12. Notamos que quanto maior for a sobreposição dos intervalos, menor será a evidência de diferença entre as médias, confirmando os resultados da análise de variância.

Gráfico 5 - Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto ao sexo e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais.

Não existe correlação entre a TMp e a variável sexo, em ambos os grupos $p = 0,285$.

Gráfico 6 - Histograma médias de TMp, em ng/mL, quanto à cor e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais.

Não existe correlação entre a TMp e a variável raça entre os grupos ($p=0,305$).

Gráfico 7 – Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto ao hábito de fumar e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais.

Não existe correlação entre a TMp e a variável hábito de fumar (cigarros /dia) entre os grupos ($p=0,444$).

Gráfico 8 - Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto à diabetes e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais.

Não existe correlação entre a TMp e a variável diabetes entre os grupos ($p=0,465$).

Gráfico 9 - Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto à hipertensão e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais.

Não existe correlação entre a TMp e a variável hipertensão entre os grupos ($p=0,384$).

Gráfico 10 - Histograma das médias de TMp, em ng/mL, quanto à medicação redutora de colesterol e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais.

Não existe correlação entre a TMp e a variável redutor de colesterol entre os grupos ($p=0,163$).

Observe que a variável redutor de colesterol, no grupo de isquemia crítica, não foi considerada para a análise, pois o uso de redutor de colesterol só foi utilizado por um pequeno número de indivíduos (1/40).

Gráfico 11 - Histograma das médias de Tmp, em ng/mL, quanto à medicação antiagregante e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais.

Não existe correlação entre a Tmp e a variável antiagregante plaquetário entre os grupos ($p = 0,709$).

Gráfico 12 - Histograma das médias de Tmp, em ng/mL, quanto ao nível de oclusão e intervalos de 95% de confiança, para as médias populacionais.

Não existe correlação entre a Tmp e a variável nível de oclusão arterial entre os grupos ($p = 0,471$).

Como pudemos constatar, não foram observadas diferenças significativas na correlação entre a TMp e as variáveis qualitativas, nos dois grupos analisados.

DISCUSSÃO

5 Discussão

5.1 Discussão sobre a casuística e método

A claudicação intermitente é um dos sintomas mais específicos da medicina e, ao mesmo tempo, apresenta-se como uma doença pouco diagnosticada e pouco tratada até o momento, causando, com isso, enorme interesse de estudo entre os cirurgiões vasculares. Em nossa instituição, o seu estudo foi impulsionado em 1992, com a criação do laboratório CI (U-308) pelo Prof. Dr. Berilo Langer, e que hoje se encontra sob a orientação do Prof. Dr. Nelson Wolosker, com supervisão do Prof. Dr. Pedro P. Leão. Um elevado número de doentes com claudicação intermitente e com isquemia crítica encontra-se em nosso ambulatório e enfermaria. Por isso, decidimos avaliá-los de uma forma sistematizada.

Este estudo analisou 81 doentes com DAOP, e avaliou o comportamento dos níveis de trombomodulina sérica entre os grupos de claudicantes e de isquemia crítica. Outros pesquisadores^{27,64,65,69,72,81}, na literatura, estudaram a Tmp em processos ateroscleróticos, com um número de pacientes semelhante ao nosso.

A realização do exame físico geral e vascular, além das provas funcionais - índice tornozelo braquial (ITB) e o teste em esteira com carga progressiva - foram sempre realizados pelos mesmos pesquisadores e de mesmo modo.

A palpação de batimentos arteriais é, provavelmente, a etapa mais importante do exame físico num paciente com DAOP. A presença ou ausência desses pulsos é, geralmente, utilizada para confirmar ou rejeitar o diagnóstico da DAOP, apresentando, no entanto, resultados falso-negativos significantes⁸⁴. Além disso, existe grande variabilidade intra e inter examinador, encontrada durante a observação clínica, sobretudo em ambiente de ensino, como o nosso. A forma padronizada de execução do exame físico, sempre pelos mesmos observadores, diminuiu esta variabilidade de resultados.

A prova funcional de medida de índice tornozelo braquial (ITB) é um método objetivo, simples, de baixo custo, e não invasivo, o qual permite quantificar a gravidade da doença, por meio de um aparelho portátil de detecção ultrassônica e de um manguito de pressão^{85,86,87}. Este procedimento dirime a maioria das dúvidas em casos de claudicação intermitente, cujo diagnóstico não tenha sido possível apenas com o exame clínico. O ITB tem sido utilizado como valor preditivo na evolução clínica dos pacientes portadores de claudicação intermitente, mas não sem alguns resultados controversos^{88,89}. Ainda existem dúvidas quanto a validade do índice, e também quanto ao valor mais adequado para desempenhar sua função⁹⁰. O ITB apresenta uma especificidade reduzida, e sua utilização de

forma isolada para definição de conduta em pacientes com Claudicação Intermitente é ineficiente. O uso do associado do ITB a outras variáveis talvez apresente maior eficiência⁹⁰.

O teste em esteira com carga progressiva passou a ser empregado em investigações de doentes com claudicação intermitente na década de 80⁸⁷. Ele apresenta os menores coeficientes de variação (12 a 17%)⁸⁷, são bem aceitos pelos doentes, inclusive pelos mais idosos⁹⁰, e tem baixo efeito de aprendizado⁸⁷. Sua utilização está comprovada na aferição da evolução temporal da distância de marcha, em pacientes submetidos a tratamento clínico⁹¹, e é utilizado para determinação do grau de claudicação, conforme classificação proposta pelo TASC 2000⁸³.

A coleta, o preparo, a identificação, e o armazenamento do sangue coletado para a análise específica (dosagem de trombomodulina sérica), foram realizados pelo mesmo pesquisador, e sempre do mesmo modo. O processamento das amostras foi realizado conforme as especificações da *American Diagnostic Inc*, EUA, evitando, com isso, um erro na padronização do teste.

Os critérios de não inclusão dos pacientes foram baseados em estudos anteriores, nos quais doenças ou estados de morbidade, ou ainda o uso de drogas alterariam (ou possivelmente interfeririam) os níveis plasmáticos de trombomodulina. Logo, não foram incluídos os pacientes portadores de antecedentes clínicos ou sorologia para: Malária⁶¹, Hepatite B^{50,51} e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida⁶³; portadores de Aneurisma de Aorta Abdominal ou Periférico⁶⁴, Insuficiência Renal Crônica⁹² ou

Hepatopatias⁵² e neoplasias malignas^{66,67,68}; aqueles que apresentavam sopro carotídeo⁸¹, tinham membros amputados, ou tivessem sido submetidos à cirurgia cardíaca⁹³ e angioplastia periférica há menos de 6 meses⁶⁵; que apresentavam ulcerações venosas⁹⁴; ou que estavam usando imunossupressores ou drogas citotóxicas⁹⁵.

Sabemos que a TMp pode sofrer variações fisiológicas e individuais nos níveis medidos no plasma. Por ser uma glicoproteína transmembrana da célula endotelial, vários fragmentos de trombomodulina são encontrados no soro, no plasma, e na urina⁴⁸. Inúmeros ensaios imunoenzimáticos têm sido propostos. Estes ensaios utilizam diferentes anticorpos específicos contra a trombomodulina, os quais podem reconhecer epítopes distintas nestes fragmentos.

Existem diferentes kits comercialmente disponíveis no mercado, e cada um deles apresenta valores absolutos diferentes. Os três mais importantes mostram que os valores de medidas obtidos variam em adultos saudáveis de 3 – 9 ng/ml, de 10 - 19 ng/ml, e de 20 - 50 ng/ml, para *IMUBIND thrombomodulin ELISA®*, *Thrombomodulin ELISA®*, e *Asserachrom thrombomodulin ELISA kit®*, respectivamente. Nossa opção pela utilização do kit comercial da *IMUBIND thrombomodulin ELISA®* foi baseada nos estudos de literatura, e por apresentar melhor custo/benefício. Sua utilização e padronização são consagradas, e a comparação entre os diferentes kits comerciais foi realizada por Wolfgang.

Wolfgang *et al.*⁹⁶, em 2004, compararam três kits comerciais de trombomodulina disponíveis, e realizados por Elisa. Eles dosaram em 60

pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico (LES) e em 10 indivíduos saudáveis. O comportamento de cada um dos diferentes kits foi avaliado, e as análises comparativas realizadas mostraram a existência de uma correlação significativa entre cada um dos diferentes kits comerciais e seus resultados com a atividade do LES. Concluíram, com isso, que, para um mesmo estudo, deverá ser utilizado o mesmo kit ELISA comercialmente disponível, e que, para estudos que utilizem os diferentes fragmentos que já são utilizados, deverá ser necessária uma padronização internacional com valor absoluto direto no uso destes kits.

A claudicação intermitente e a isquemia crítica dos membros inferiores são manifestações clínicas diferentes de uma mesma doença. Não obstante, apresentam resultados e prognósticos contrastantes, especialmente a respeito da preservação do membro. Enquanto a claudicação intermitente tem evolução benigna, com risco de amputação de membro aproximado de 1% ao ano⁹⁷, a isquemia crítica oferece este risco em nível mais elevado, chegando de 10 a até 40% de amputações ao ano¹⁸. Além disso, pacientes com isquemia crítica apresentam, geralmente, a doença arterial envolvendo mais segmentos arteriais do que a claudicação intermitente. Esta é, possivelmente, a expressão de uma doença mais severa em pacientes com isquemia crítica²⁷.

5.2 Discussão dos resultados

Ao analisarmos as variáveis qualitativas e quantitativas entre os grupos de claudicantes e de isquemia crítica, detectamos a predominância de doentes masculinos (61%), entre os doentes com claudicação intermitente, ocorrendo o mesmo (60%) entre os pacientes com isquemia crítica. Estes números são coincidentes com os dados de literatura^{98,99,100}. Além disso, observa-se que os grupos são comparáveis, $p = 0,928$.

A idade, além de apontar tendência à doença degenerativa, é considerada por alguns autores como um fator de prognóstico¹⁰¹. A idade média dos doentes foi de 67 anos, nos pacientes com claudicação intermitente, e de 66 anos, nos pacientes com isquemia crítica, $p = 0,723$.

Em relação à raça, encontramos 75,6% dos pacientes de raça branca, no grupo de claudicantes, e 87,5%, no grupo de isquemia crítica, $p = 0,168$.

Os efeitos nocivos do fumo são incontestáveis e cada vez mais conhecidos¹⁰². Os fumantes apresentam um maior risco de evoluir para isquemia grave do que os não fumantes¹⁰³, e apresentam manifestações clínicas de DAOP cerca de 10 anos antes¹⁰⁴. A intensidade do tabagismo parece estar associada à progressão da doença¹⁰⁵, assim como suas manifestações clínicas. Sabemos que o tabagismo é um fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose. Os mecanismos que o levam a causar danos no endotélio vascular envolvem a ativação de células inflamatórias¹⁰⁶. Nossos estudos mostraram que 73,2% dos pacientes com claudicação intermitente eram fumantes, e que 77,5% dos pacientes com isquemia grave

fumavam, $p = 0,567$. A distribuição do tabagismo nesta casuística foi semelhante à encontrada na literatura¹⁰⁷.

A associação entre o diabetes e a DAOP é clara^{98,108,109}. A prevalência de DAOP em diabéticos é 1,5 a 6 vezes maior do que em não diabéticos. Os pacientes com diminuição de função renal¹¹⁰, comum em diabéticos com nefropatias, apresentam níveis mais elevados de TmP. Uehara¹¹¹ refere que níveis elevados de glicose no sangue podem causar lesões endoteliais e elevar o nível da TmP. Nosso estudo mostrou que o diabetes está associado à DAOP numa proporção de 39,0% em pacientes com claudicação intermitente, e de 32,5% nos pacientes com isquemia crítica, $p = .0,540$. Nesta análise, todos os pacientes apresentavam função renal normal.

Já a hipertensão associada à DAOP foi detectada em 65,9% dos pacientes com claudicação intermitente, e em 62,5% dos pacientes com isquemia crítica, $p = 0,753$.

Observações importantes podem ser feitas quando analisamos a utilização de medicações (redutores de colesterol e AAS), e comparamos os grupos de pacientes com claudicação intermitente com os de isquemia crítica.

Houve evidência de associação significativa quanto ao uso das drogas, entre os dois grupos, $p < 0,005$.

O redutor de colesterol foi consumido pelos pacientes de modo diferente entre os dois grupos; 29,3 % dos pacientes claudicantes faziam

uso desta medicação, e apenas 2,5% dos pacientes com isquemia crítica ($p= 0,001$) a estavam utilizando ao serem internados na enfermaria.

Ensaio clínico demonstram que a redução do colesterol com o uso de agentes redutores, principalmente as Co A redutase, diminui a morbidade e mortalidade por eventos coronários^{112,113}. Tratamento com estatinas tem mostrado bons resultados, tanto na inibição, como no retardo da progressão da lesão coronariana. Sua ação se faz no processo inflamatório celular e, com isso, temos visto os marcadores endoteliais, como a TMp, serem reduzidos com o uso destas drogas¹¹⁴. De modo análogo, devemos pensar se a utilização desta droga, em claudicantes, poderia reduzir os eventos de isquemia grave. Nossos achados demonstram que, no grupo dos pacientes com claudicação intermitente, seu uso era mais freqüente, enquanto nos pacientes que apresentavam isquemia crítica seu uso era raro. Isso não nos permite inferir a idéia de proteção endotelial e de diminuição dos eventos isquêmicos graves com o uso desta droga.

O efeito benéfico cardioprotetor do uso perioperatório da estatinas (atorvastatina) foi demonstrado com a diminuição dos eventos isquêmicos sistêmicos, como o infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral, a angina instável, e morte por causa cardíaca nos primeiros 6 meses após a cirurgia arterial, quando comparadas ao placebo¹¹⁵. Estudos com estas substâncias, com a finalidade de se verificar seu efeito protetor no endotélio dos pacientes com DAOP, estão sendo realizados.

Também mostramos, neste estudo, que o consumo de antiagregantes plaquetários era, freqüentemente, mais utilizado entre os pacientes com

claudicação intermitente (63,4%) do que nos pacientes com isquemia crítica (25%), $p = 0,001$.

A eficácia da utilização de antiagregantes plaquetários para evitar eventos isquêmicos coronarianos já é consagrada. Porém, a sua utilização em pacientes com DAOP merece ser comentada. O emprego desta droga rotineiramente em claudicantes, em nosso meio, é de 79%¹¹⁶, próximo ao valor obtido em nosso estudo, de 63,4%. O uso dos antiagregantes plaquetários tem sido recomendado com terapêutica primária ou secundária para prevenir eventos cardiovasculares, proporcionando benefícios aos pacientes^{117,118}. Seu uso é preconizado, rotineiramente, para pacientes mais idosos¹¹⁹, a menos que eles apresentem contra-indicações. Nos pacientes portadores de isquemia crítica, seu uso prolongado ocorre após cirurgias, com uso de enxertos autólogos ou heterólogos¹²⁰, com bons resultados em sua pervicácia.

O nível de obstrução arterial também foi analisado em nosso estudo, sendo que as obstruções fêmoro-poplíteas foram as mais freqüentes.

No presente estudo, avaliamos o comportamento da TMp como um marcador da severidade da Doença Arterial Obstrutiva Periférica (DAOP), comparando os níveis de TMp em pacientes com Claudicação Intermitente com os níveis em pacientes com Isquemia Crítica de membros inferiores. Os resultados demonstram, claramente, que os níveis da TMp em pacientes com claudicação não diferem, significativamente, daqueles dos pacientes com isquemia crítica nos membros inferiores. Os claudicantes apresentaram uma média de TMp de 5.2 ng/ml (0.78 - 13.61 ng/ml), e os pacientes com

isquemia crítica dos membros inferiores apresentaram uma média de 6.34 ng/ml (0.82 - 18.22 ng/ml) $p = 0.265$.

Não dosamos os níveis de Tmp em indivíduos normais, pois sabemos que seus níveis variam de 2.73 a 4,79 ng/ml em mulheres, conforme a idade, e de 4.00 a 5.35 em homens, conforme a idade¹²¹. Nossos dados são corroborados pelos dados de outros autores.

A não observação de nenhuma relação entre a severidade da doença aterosclerótica e a Tmp sugerem uma concordância com os achados de Blann *et al.*⁸¹, os quais não provaram haver uma relação entre a Tmp e o índice tornozelo braquial nos pacientes claudicantes com o grau de estenose, como expressão de gravidade da doença carotídea. Certamente, a Tmp pôde sinalizar apenas a presença da DAOP, mas não foi um bom preditor de seu resultado. Isto é ilustrado pela analogia em duas investigações, as quais não relatam nenhuma correlação entre Tmp e a doença coronária¹²², ou mesmo uma associação inversa entre Tmp e a severidade do resultado após um infarto cerebral¹²³. De outro modo, Blann e colaboradores⁷⁴ encontraram uma correlação direta entre Tmp e o número dos locais arteriais envolvidos por DAOP. Não obstante, as diferenças de não inclusão e de critérios de exclusão poderiam ser responsáveis pelas discrepâncias entre os nossos resultados e aqueles dessa investigação. Blann *et al.* incluíram pacientes com doença coronariana⁷⁴, e não excluíram pacientes com doenças hepáticas⁵², aqueles que tinham se submetido, recentemente, à cirurgia arterial⁶⁵, ou aqueles que eram portadores de aneurismas⁶⁴.

As possíveis correlações entre a Tmp e as variáveis quantitativas foram realizadas pela determinação do coeficiente de correlação de Pearson. Há evidência de correlação entre a Tmp e as variáveis idade, colesterol, e LDL, no grupo de pacientes com claudicação ($p < 0,05$), e a variável idade, no grupo de isquemia crítica. Estes dados demonstram a positividade que também existe entre a elevação dos níveis da Tmp e a idade, em pacientes saudáveis, como referido na literatura¹²¹. Pensamos que esta elevação seja natural, pois existe um envelhecimento do endotélio com o passar dos anos, com um remodelamento menor.

O processo inflamatório desencadeado pela doença aterosclerótica é objeto de estudo em inúmeras investigações^{2,3,11} nos últimos anos. A disfunção endotelial é um estágio inicial desta doença, e sua completa compreensão poderia, provavelmente, fornecer um meio de antecipar as complicações da severidade da aterosclerose.

Uma possível abordagem para se estudar a lesão vascular é através da investigação de produtos endoteliais circulantes^{25,124}. A busca por um marcador de disfunção endotelial seguro não é recente^{9,25,125}. Idealmente, ele poderia fornecer o prognóstico da severidade da doença arterial obstrutiva periférica (DAOP), e ser utilizado em estudos epidemiológicos²⁴, bem como identificar pacientes com elevado risco de apresentar pior prognóstico, os quais se beneficiariam com um programa de prevenção secundária. Por isso, a análise do comportamento dos níveis séricos da Trombomodulina nos pareceu o melhor método para analisar a progressão da lesão aterosclerótica, em nosso ambulatório e em nossa enfermaria.

A trombomodulina (TM) é uma glicoproteína receptora de trombina da membrana da célula endotelial, a qual acelera a ativação da proteína C. Possui uma grande porção extracelular, na qual a maior parte de sua atividade bioquímica ocorre¹²⁶.

Vários polimorfismos no gene de TM foram caracterizados, e sua associação com trombozes ou arterosclerose é o foco de pesquisas recentes. As variações raciais, na frequência destes polimorfismos, poderiam determinar disparidades na predisposição de algumas doenças relacionadas à trombomodulina. Além disso, alguns investigadores atribuíram à TM um efeito anti-trombogênico e endotélio protetor¹²⁷.

Em populações normais saudáveis, a concentração de TM solúvel no plasma reflete a quantidade de TM expresso na superfície endotelial, e a expressão aumentada de TM pode representar o aumento das concentrações de TM solúvel na circulação. Assim, uma concentração elevada de TM solúvel pode indicar um estado pro-trombótico diminuído, e um risco baixo da doença coronariana¹²⁷. De outro modo, a concentração de TM solúvel é afetada, também, pela atividade proteolítica, a qual eleva esses resultados ao quebrar a porção extracelular da TM do endotélio. Enzimas proteolíticas podem ser liberadas dos leucócitos ativados do sangue¹²⁸. Assim, em alguns estados patológicos, a concentração plasmática de trombomodulina pode refletir melhor o processo inflamatório e os danos vasculares, do que o nível de expressão de TM no endotélio.

O nível da expressão de TM no endotélio é considerado um fator antitrombótico e endotélio protetor. Shi *et al.*¹²⁹, em 2003, mostraram um

aumento na expressão da TM em células endoteliais de cordão umbilical humano, células de artérias coronárias humanas, e em células endoteliais, em resposta ao tratamento com estatinas.

Rigla *et al.*¹³⁰, em 2001, avaliaram 30 pacientes diabéticos (15 tipo I e 15 tipo II) e 23 pacientes saudáveis, e verificaram que, após 3 meses de realização de um programa de exercícios físicos, os níveis da Tmp diminuíram. Concluíram, em seu estudo, que esta normalização dos níveis da Tmp ocorreu devido a uma menor expressão da trombomodulina no endotélio, sob o efeito de um programa de exercício físico.

Além disso, alguns elementos prejudiciais ao endotélio diminuem o nível da expressão de TM, possivelmente, pela diminuição da regulação de sua expressão ao nível da transcrição genética, tal como os lipopolissacarídeos¹³¹, LDL oxidada (lipoproteína de baixa densidade oxidada)¹³², TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), e interleucina -1 (IL-1)¹³³.

Determinadas mutações genéticas da TM são relacionadas, também, a uma diminuição em sua transcrição, que se traduz em uma redução do nível da expressão de TM, e em menor capacidade protetora do endotélio^{123,134}.

Algumas mutações do gene da trombomodulina poderiam alterar a regulação do processo aterosclerótico na célula endotelial, bem como alterar a resposta inflamatória do vaso^{135,136}. Nestas situações, os pacientes com isquemia crítica poderiam ter a concentração do plasma de TM solúvel similar aos com claudicação intermitente, mas com uma função danificada

desta substância, a qual poderia influenciar um resultado pior para sua doença arterial.

Neste sentido, Li YH *et al.*¹²³, em 2001, demonstraram uma associação entre a mutação da região promontora G-33 à do gene de trombomodulina, e à aterosclerose de carótida, em pacientes com mais de 60 anos. Embora a redução da atividade de transcrição da atividade genética fosse diminuída, nenhuma associação foi provada relacionando-se aos derrames. Além disso, esta mutação levaria a uma diminuição da atividade do gene de trombomodulina, justificando valores menores do que aqueles encontrados. Por analogia, os claudicantes poderiam carregar algum polimorfismo genético, o qual determinaria sua doença arterial, mas não necessariamente seu mau prognóstico.

Considerando a mutação da região G-33 a, Wu KK *et al.*¹²⁷, em 2003, mostraram que os pacientes com doença coronariana, que não apresentam este polimorfismo genético, apresentavam níveis plasmáticos de trombomodulina mais elevados do que os mutantes. Concluíram que os mutantes poderiam ter a capacidade de realizar uma transcrição diminuindo a expressão deste gene, quando se esperaria, normalmente, níveis mais elevados. Do mesmo modo, os pacientes com isquemia crítica poderiam apresentar um polimorfismo que influenciaria, negativamente, na expressão de trombomodulina na célula endotelial, além de diminuir os níveis plasmáticos de trombomodulina na doença aterosclerótica.

Um relacionamento inverso, entre o nível da expressão de TM e a tensão arterial da parede, foi recentemente elucidado. Sperry *et al.*³², em

2003, encontraram uma expressão de trombomodulina reduzida nos enxertos venosos autólogos de coelhos. Os achados implicam em mudanças nas pressões induzidas na tensão da parede do vaso, com deformação endotelial concomitante (tensão), como um regulador principal da expressão de TM em vivo.

Consequentemente, a TM solúvel no plasma é uma variável determinada por múltiplos fatores, os quais poderiam estar presentes seguindo-se numa distribuição heterogênea entre os pacientes, como a estudada em nossa investigação.

Algumas possíveis explanações adicionais para nossos resultados podem ser formuladas. Entre elas, correlacionamos os níveis plasmáticos de trombomodulina e a área aterosclerótica total envolvida. Sabendo que os sintomas de isquemia crítica de alguns pacientes podem ser relacionados a uma pequena área ocluída, mas numa região do membro inferior com pouca circulação colateral, a estenose ou oclusão torna-se crítica. Determinou-se que o nível da expressão de TM está diminuído, profundamente, no endotélio que alinha as placas de aterosclerose¹³⁷, incluindo as artérias coronárias¹³⁸, e que aqueles locais são particularmente propensos à trombose, dependendo da magnitude de deficiência da TM¹³⁹. Considerando o balanço entre a expressão e a fragmentação, que determina os níveis plasmáticos de trombomodulina, as placas de aterosclerose em pacientes com isquemia crítica poderiam, possivelmente, ter um nível mais baixo da expressão de TM, submeter-se a mais liberação de fragmentos de TM, e serem mais propensos aos eventos trombóticos, do que aquelas em

claudicantes. Neste sentido, o contrapeso final seria uma aproximação de valores de TMp de ambos os grupos.

Ao iniciarmos nossa pesquisa, buscando um marcador de produto degradado do endotélio lesado circulante, a literatura apresentava poucos trabalhos relacionando este marcador (TMp) e sua expressão gênica. Como vemos, nos últimos anos, inúmeros trabalhos têm correlacionado a TMp e sua expressão gênica, e ressaltam que ela é influenciada por inúmeros fatores externos.

Em outro estudo, Sernau *et al.*⁷⁸ concluíram que a TMp é um marcador para os danos microvasculares do endotélio, e não para a lesão de endotélio macrovascular. Estendendo este conceito, poder-se-ia realizar a hipótese de se considerar os ciclos freqüentes de isquemia e de reperfusão, aos quais os claudicantes são submetidos, àqueles pacientes submetidos aos surtos de inflamação em sua microcirculação, e que estão ausentes nos pacientes com isquemia crítica, devido à doença mais disseminada. Consequentemente, os pacientes com claudicação intermitente puderam experimentar maior propagação da TM do que suas contrapartes, fazendo ambos o alcance de TM plasmática.

Uma outra razão adicional é que a TMp poderia ser um marcador apropriado, por uma fase incipiente da doença aterosclerótica, e que se tornou estável em uma fase avançada, combinando o TMp de ambos os grupos de pacientes. Suportando este conceito, o estudo EVA¹⁴⁰ encontrou uma correlação entre a TM e a espessura da camada íntima da carótida (IMT), sendo esta considerada um marcador para a doença generalizada

aterosclerótica adiantada. Inversamente, esse estudo não estabeleceu um relacionamento similar de TMp com a presença das placas na artéria, um sinal de doença avançada. Considerando estes resultados, uma analogia pode ser sugerida para explicar nossos resultados a respeito da claudicação intermitente como um estágio prematuro da doença, e da isquemia crítica como doença em estágio mais avançado. Contudo, mesmo a correlação entre IMT e TMp pode ser questionada, enquanto possa ser influenciada por fatores adquiridos.

Os pacientes com hipotireoidismo, que foram submetidos à terapia da reposição de levotiroxina, exibem a melhoria em IMT sem mudanças em TMp¹⁴¹. Além disso, a idéia de que a TMp não pôde ser um marcador apropriado para doença avançada pode ser questionada. As culturas de células endoteliais humanas mostram um aumento de TM associado com a necrose celular e com apoptose, bem como as disfunções da camada média, ambas originadas pela ação de proteases e de radicais livres derivados dos neutrófilos¹⁴².

Juntos, aqueles trabalhos relembram a grande complexidade que determina a TMp em um grupo de pacientes. Isto é reforçado por um trabalho que descreve o aumento da TMp nos pacientes com DAOP, e em pacientes com aneurisma de aorta abdominal⁶⁴. Reforçando nossos resultados, esta investigação mostra que, embora originadas pelo mesmo processo da doença, a claudicação intermitente e a isquemia crítica puderam, de fato, ter peculiaridades fisiopatológicas que se tornam

incomparáveis. De outro modo, a TMp deve ser um marcador apropriado para apenas um deles.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

A semelhança da distribuição das variáveis, nos dois grupos de pacientes, permitiu a aplicação de um estudo utilizando um produto endotelial circulante como marcador da gravidade da DAOP.

Embora a trombomodulina plasmática seja um marcador apropriado para a aterosclerose, ela não é apropriada para avaliar a severidade da DAOP.

A progressão da idade gera um aumento dos níveis de Tmp, tanto em pacientes com Claudicação Intermitente, quanto aos com Isquemia Crítica, porém, não existem correlações entre a Tmp e as outras variáveis analisadas (sexo, raça, hábito de fumar, diabetes, hipertensão, medicações redutoras de colesterol, níveis de oclusão arterial, colesterol, HDL, LDL, e triglicérides), nos pacientes com Claudicação Intermitente e com Isquemia Crítica.

A utilização de pacientes com Claudicação Intermitente e com Isquemia Crítica (em diferentes graus) é interessante como modelo de estudo, e deve ser empregado para avaliar diferentes marcadores de prognóstico da DAOP.

ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação CAPPesq

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
D A
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL 8091
SÃO PAULO - BRASIL
DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.03.02, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 927/01, intitulado: "Comportamento da trombomodulina sérica em pacientes com claudicação intermitente e com Isquemia Crítica de membros inferiores", do Departamento de Cirurgia, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: Dr. Nelson Wolosker

Pesquisador(a) Executante: Dr. Michel Nasser

CAPPesq, 19 de março de 2002.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

FACULDADE DE MEDICINA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: .../.../...
ENDEREÇO..... Nº..... APTO: .....
BAIRRO:..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO. .../.../...
ENDEREÇO:..... Nº.....
APTO:..... BAIRRO: .....
CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....
-

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1 TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

"Comportamento da Trombomodulina Sérica em pacientes com Claudicação Intermitente e com Isquemia Crítica de Membros Inferiores".

.....
.....

.....
.....
2 PESQUISADOR: Michel Nasser

CARGO/FUNÇÃO: Médico Pesquisador

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL – SP: Nº 68873

UNIDADE DO HC-MUSP: Departamento de Cirurgia Vascular da FMUSP

3 AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO   ☐   RISCO MÍNIMO   ☒   RISCO MÉDIO   ☐

RISCO BAIXO   ☐   RISCO MAIOR   ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4 DURAÇÃO DA PESQUISA. 18 MESES

**III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE
OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA,
CONSIGNANDO:**

1 Justificativa e os objetivos da pesquisa: Comparar a quantidade de uma proteína que circula no sangue - Trombomodulina Sérica - que está presente em pacientes com dores nas pernas quando caminham (Claudicação Intermitente), em pacientes que já apresentem dores intensas e feridas nas pernas (Isquemia Crítica de Membros Inferiores). Esta pesquisa será realizada para que nós pesquisadores possamos, num futuro próximo, saber se no sangue das pessoas poderemos encontrar substâncias que indiquem quais os indivíduos poderão ter feridas nas pernas e trombozes.

2 Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Durante a coleta de exames laboratoriais de rotina, aos quais já são submetidos os pacientes do ambulatório de Cirurgia Vascular, portadores de Claudicação Intermitente e com Isquemia Crítica de membros inferiores, em quais nós iremos acrescentar a retirada de mais 2ml de

sangue circulante, afim de que seja determinada, nestas amostras, a quantidade desta proteína - a Trombomodulina.

3 Desconfortos e riscos esperados: Poucos desconfortos, ou mesmo nenhum desconforto, serão esperados, pois estes pacientes já são submetidos a punção venosa rotineiramente, sendo que nós apenas acresceremos a coleta de mais 2 ml de sangue. Os riscos que podem decorrer deste ato são, normalmente, os de hematoma e dor local.

4 Benefícios que poderão ser obtidos: Se a determinação da quantidade desta proteína no sangue destes pacientes possa prever, num futuro próximo, se o estado clínico do paciente com apenas dores nas pernas possa ter relação ou prever que estes indivíduos possam evoluir para feridas nas pernas e trombose dos membros inferiores.

5 Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:
Nenhum até o momento.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1 Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Em qualquer dia, após já coletado e dosado o sangue do paciente, este terá assegurado, se assim quiser, o direito de saber os dados obtidos em análise de seu material. Nós lhes daremos acesso aos seus dados obtidos para que não haja nenhuma dúvida.

2 Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Fica estabelecido que, em qualquer momento, o paciente pode retirar o consentimento do estudo de seu sangue, devendo alertá-lo que isto em nada influenciará ou modificará o relacionamento médico-paciente no tratamento definido para cada um.

3 Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Os dados obtidos de cada paciente permanecerão salvaguardados e só serão divulgados os números obtidos na pesquisa. Os dados serão confidenciais ao médico pesquisador. Os dados de cada um dos indivíduos participantes serão sigilosos e privados, sendo proibido sua divulgação.

4 Disponibilidade de assistência no HC-FMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa. Todo paciente que por ventura apresentar qualquer dano a sua saúde, e que comprove ser ele decorrente diretamente do procedimento que está sendo proposto, terá assistência no HC-FMUSP.

5 Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. A indenização monetária de quaisquer indivíduos está descartada neste procedimento, pois a coleta do sangue já faz parte da rotina efetuada no HC-FMUSP. O tratamento do paciente não será modificado pelo acréscimo de 2 ml de sangue, efetuado na coleta, não devendo o mesmo, em qualquer momento, requerer qualquer indenização monetária, ou atribuir ao experimento em questão ser o causador do dano de sua saúde.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

DR. MICHEL NASSER

PROF. DR. NELSON WOLOSKE

AV. ENÉAS DE CARVALHO AGUIAR, 255

05403-009 -SÃO PAULO

TELEFONES:

MANHÃ: (11) 38 85 53 61 e 30 69 61 01

TARDE: (16) 33 32 03 27

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Não existem.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido(a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,   de   2006   .

_____
assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

_____
assinatura e carimbo do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo C – Ficha de Pacientes

FICHA DE PACIENTES

Data: ____/____/____

Paciente: _____

Idade: ____

Nasc: ____/____/____ Sexo: ____ Est. civil: ____ Cor: ____

Profissão: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ CEP: _____

Cidade: _____ Estado: _____ Fone: _____

Nacionalidade: _____ Naturalidade: _____

End. com.: _____ Fone: _____

QUEIXA E DURAÇÃO: _____

HPMA _____

I.S.D.A.:

Cabeça e pescoço: _____

Gastrointestinal: _____

Cardiopulmonar: _____

Genito-urinário: _____

Cirurgias: _____

Gestações: ____ G ____ P ____ A ____ Diabetes: _____

Tabagismo: _____ cig/dia _____ anos _____

HAS ____ Doença neurológica: _____ Doença psiquiátrica: _____

Medicações:

_____
_____

EXAME FÍSICO:

Geral e específico vascular _____

PROVAS FUNCIONAIS:

Índice T/B _____

MID _____

MIE _____

Esteira _____

Classificação Clínica Vascular: _____

Glicemia de Jejum _____

Uréia _____ Creatinina _____

Perfil Lipídico: _____

Colesterol Total: _____

LDL _____ HDL _____ VLDL _____

Triglicérides _____

Trombomodulina Sérica: _____

REFERÊNCIAS

---

8 Referências

- 1 Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med.* 1998;105(1A):32S-39S.
- 2 Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RD, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, MD; Rosalind P. Fabunmi RP, Robertson RM, Loscalzo J. American Heart Association. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation.* 2004;109(21):2617-25.
- 3 Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med.* 1999;107(1):85-97.
- 4 Serrano CV, Fernandes JL, Luz PL. Moléculas de adesão, inflamação e endotélio. In: Luz PL. *Endotélio e doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu; 2003. p.97-114.
- 5 Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1977;86(3):675-84.
- 6 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(6423):801-9.
- 7 Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.
- 8 DiCorleto PE, Chisolm GM 3rd. Participation of the endothelium in the development of the atherosclerotic plaque. *Prog Lipid Res.* 1986;25(1-4):365-74.

-
- 9 Pearson JD. Vessel wall interactions regulating thrombosis. *Br Med Bull.* 1994;50(4):776-88.
  - 10 Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(12):1876-90.
  - 11 Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135-43.
  - 12 Mohler ER 3rd. Peripheral arterial disease: identification and implications. *Arch Intern Med.* 2003;163(19):2306-14.
  - 13 Sumner DS. Essential hemodynamic principles. In: Rutherford RB. *Vascular surgery.* Philadelphia: WB Saunders Company; 1995. p.18-44.
  - 14 Murabito JM, Evans JC, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, Kannel WB. Temporal trends in the incidence of intermittent claudication from 1950 to 1999. *Am J Epidemiol.* 2005;162(5):430-7.
  - 15 Diehm C, Kareem S, Lawall H. Epidemiology of peripheral arterial disease. *Vasa.* 2004;33(4):183-9.
  - 16 Hughson WG, Mann JI, Garrod A. Intermittent claudication: prevalence and risk factors. *Br Med J.* 1978;1(6124):1379-81.
  - 17 TASC Transatlantic Inter-Society Consensus - Management of Peripheral Arterial Disease (PAD). Definition and nomenclature for Chronic Critical Limb Ischemia. *J Vasc Surg.* 2000;1(2)S170.
  - 18 Novo S, Coppola G, Milio G. Critical limb ischemia: definition and natural history. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2004;4(3):219-25.
  - 19 Fiotti N, Altamura N, Capelli C, Schillan M, Guarnieri G, Giansante C. Long term prognosis in patients with peripheral arterial disease treated with antiplatelet agents. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26(4):374-80.

-
- 20 Thomaz JB. Isquemia aguda dos membros inferiores. In: Thomas JB. *Fundamentos da cirurgia vascular e angiologia*. São Paulo: Fundação BYK; 1997. Cap.26, p.400-2.
- 21 Monteiro JC, Suplici HL, Matos AFG, Halpern A. In: Halpern A. *Obesidade*. São Paulo: Lemos; 1998. p.31-53.
- 22 Manley S, John WG, Marshall S. Introduction of IFCC reference method for calibration of HbA: implications for clinical care. *Diabet Med*. 2004;21(7):673-6.
- 23 Collins TC, Petersen NJ, Suarez-Almazor M. Peripheral arterial disease symptom subtype and walking impairment. *Vasc Med*. 2005;10(3):177-83.
- 24 Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-Garcia L, Folsom AR, Juneja H, Chambless LE, Wu KK. Soluble Thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk Communities(ARIC) Study: A case cohort study. *Lancet*. 1999;353(9166):1729-3.
- 25 Blann AD, Taberner DA. A reliable marker of endothelial cell dysfunction: Does it exist? *Br J Haematol*. 1995;90:244-8.
- 26 Seigneur M, Dufourcq P, Conri C, Constans J, Mercie P, Pruvost A, Boisseau M. Plasma thrombomodulin: new approach of endothelium damage. *Int Angiol*. 1993;12(4):355-9.
- 27 Seigneur M, Dufourcq P, Conri C. Levels of Plasma Thrombomodulin are increase in atheromatous arterial disease. *Thromb Res*. 1993;71(6):423-31.
- 28 Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of Protein C. *J Biological Chemistry* 1982;257:859.
- 29 Wen DZ, Dittman WA, Ye RD, Deaven LL, Majerus PW, Sadler JE. Human thrombomodulin: complete cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry*. 1987;26(14):4350-7.

-
- 30 Le Flem L, Mennen L, Aubry ML, Aiach M, Scarabin PY, Emmerich J, Alhenc-Gelas M. Thrombosis Thrombomodulin Promoter Mutations, Venous Thrombosis, and Varicose Veins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2001;21(3):445.
- 31 Kunz G, Ohlin AK, Adami A, Zoller B, Svensson P, Lane DA. Naturally occurring mutations in the thrombomodulin gene leading to impaired expression and function. *Blood*. 2002;99(10):3646-53.
- 32 Sperry JL, Deming CB, Bian C, Walinsky PL, Kass DA, Kolodgie FD, Virmani R, Kim AY, Rade JJ. Wall tension is a potent negative regulator of in vivo thrombomodulin expression. *Circ Res*. 2003;92(1):41-7.
- 33 Salem HH, Maruyama I, Ishii H, Majerus PW. Isolation and characterization of thrombomodulin from human placenta. *J Biol Chem*. 1984;259(19):12246-51.
- 34 Sadler JE. Thrombomodulin structure and function. *Thromb Haemost*. 1997;78(1):392-5.
- 35 Honda G, Masaki C, Zushi M, Tsuruta K, Sata M. The roles played by the D2 and D3 domains of recombinant human thrombomodulin in its function. *J Biochem (Tokyo)*. 1995;118(5):1030-6.
- 36 Zushi M, Gomi K, Honda G, Kondo S, Yamamoto S, Hayashi T, Suzuki K. Aspartic acid 349 in the fourth epidermal growth factor-like structure of human thrombomodulin plays a role in its Ca(2+)-mediated binding to protein C. *J Biol Chem*. 1991;266(30):19886-9.
- 37 Hayashi T, Zushi M, Yamamoto S, Suzuki K. Further localization of binding sites for thrombin and protein C in human thrombomodulin. *J Biol Chem*. 1990;265(33):20156-9.
- 38 Dittman WA, Majerus PW. Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood*. 1990;75(2):329-36.
- 39 Wong VL, Hofman FM, Ishii H, Fisher M. Regional distribution of thrombomodulin in human brain. *Brain Res*. 1991;556(1):1-5.

-
- 40 Grau GE, de Moerloose P, Bulla O, Lou J, Lei Z, Reber G, Mili N, Ricou B, Morel DR, Suter PM. Haemostatic properties of human pulmonary and cerebral microvascular endothelial cells. *Thromb Haemost.* 1997;77(3):585-90.
- 41 Boldt J, Wollbruck T, Sonneborn S, Welters A, Hempelmann G. Thrombomodulin in intensive care patients. *Intensive Care Med.* 1995;21(8):645-50.
- 42 Kizaki K, Naito S, Horie S, Ishii H, Kazama M. Different thrombomodulin induction in monocytic, macrophagic and neutrophilic cells differentiated from HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;193(1):175-81.
- 43 Tohda G, Oida K, Okada Y, Kosaka S, Okada E, Takahashi S, Ishii H, Miyamori I. Expression of thrombomodulin in atherosclerotic lesions and mitogenic activity of recombinant thrombomodulin in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(12):1861-9.
- 44 Maillard C, Berruyer M, Serre CM, Amiral J, Dechavanne M, Delmas PD. Thrombomodulin is synthesized by osteoblasts, stimulated by 1,25-(OH)₂D₃ and activates protein C at their cell membrane. *Endocrinology.* 1993;133(2):668-74.
- 45 Maruyama I, Bell CE, Majerus PW. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J Cell Biol.* 1985;101(2):363-71.
- 46 Suzuki K, Nishioka J, Hayashi T, Kosaka Y. Functionally active thrombomodulin is present in human platelets. *J Biochem.* 1988;104(4):628-32.
- 47 Ishii H, Nakano M, Tsubouchi J, Ishikawa T, Uchiyama H, Hiraishi S, Tahara C, Miyajima Y, Kazama M. Establishment of enzyme immunoassay of human thrombomodulin in plasma and urine using monoclonal antibodies. *Thromb Haemost.* 1990;63(2):157-62.
- 48 Ishii H, Majerus PW. Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J Clin Invest.* 1985;76(6):2178-81.

-
- 49 Inukai T, Fujiwara Y, Tayama K, Aso Y, Takemura Y. Clinical significance of measurements of urinary and serum thrombomodulins in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996;33(2):99-104.
- 50 Akiyama K, Nakamura K, Makino I. [Evaluation of plasma thrombomodulin (TM) levels in patients with liver disease]. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi.* 1992;89(10):2559-67.
- 51 Borawski J, Naumnik B, Pawlak K, Mysliwiec M. Soluble thrombomodulin is associated with viral hepatitis, blood pressure, and medications in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(4):787-92.
- 52 Iwabuchi S, Yoshida Y, Kamogawa A, Moriyama N, Takatori M, Mizuguchi A, Uchikoshi T, Ishii H, Hiraishi S, Kazama M. Plasma thrombomodulin in liver diseases. *Gastroenterol Jpn.* 1990;25(5):661.
- 53 Salem HH, Broze GJ, Miletich JP, Majerus PW. The light chain of factor Va contains the activity of factor Va that accelerates protein C activation by thrombin. *J Biol Chem.* 1983;258(14):8531-4.
- 54 Thompson EA, Salem HH. Inhibition by human thrombomodulin of factor Xa-mediated cleavage of prothrombin. *J Clin Invest.* 1986;78(1):13-7.
- 55 Esmon CT. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J.* 1995;9:946-955.
- 56 Esmon CT, Fukudome K. Cellular regulation of the protein C pathway. *Semin Cell Biol.* 1995;6(5):259-68.
- 57 Bajar L, Nesheim M, Morser J, Tracy PB. Both Cellular and Soluble Forms of Thrombomodulin Inhibit Fibrinolysis by Potentiating the Activation of Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor*. *J Biol Chem.* 1998;273(5):2792-8.

-
- 58 Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, Weitz JI, Weiler H, Hellings PW, Schaeffer P, Herbert JM, Collen D, Theilmeier G. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Exp Med*. 2002;196(5):565-77.
- 59 Healy AM, Rayburn HB, Rosenberg RD, Weiler H. Absence of the blood-clotting regulator thrombomodulin causes embryonic lethality in mice before development of a functional cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(3):850-4.
- 60 Boffa MC, Valsecchi L, Fausto A, Gozin D, Vigano' D'Angelo S, Safa O, Castiglioni MT, Amiral J, D'Angelo A. Predictive value of plasma thrombomodulin in preeclampsia and gestational hypertension. *Thromb Haemost*. 1998;79(6):1092-5.
- 61 Hemmer CJ, Bierhaus A, von Riedesel J, Gabat S, Liliensiek B, Pitronik P, Lin J, Grauer A, Amiral J, Ziegler R. Elevated thrombomodulin plasma levels as a result of endothelial involvement in plasmodium falciparum malaria. *Thromb Haemost*. 1994;72(3):457-64.
- 62 George F, Brouqui P, Boffa MC, Mutin M, Drancourt M, Brisson C, Raoult D, Sampaol J. Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood*. 1993;82:2109-16.
- 63 de Larranaga GF, Bocassi AR, Puga LM, Alonso BS, Benetucci JA. Endothelial markers and HIV infection in the era of highly active antiretroviral treatment. *Thromb Res*. 2003;110(2-3):93-8.
- 64 Blann AD, Devine C, Amiral J, McCollum CN. Soluble adhesion molecules, endothelial markers and atherosclerosis risk factors in abdominal aortic aneurysm: a comparison with claudicants and healthy controls. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998;9(6):479-84.
- 65 Tsakiris DA, Tschöpl M, Jäger K, Haefeli WE, Wolf F, Marbet GA. Circulating cell adhesion molecules and endothelial markers before and after transluminal angioplasty in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis*. 1999;142(1):193-200.

-
- 66 Morishita E, Saito M, Asakura H, Jokaji H, Uotani C, Kumabashiri I, Yamazaki M, Matsuda T. Increased levels of plasma thrombomodulin in chronic myelogenous leukemia. *Am J Hematol*. 1992;39(3):183-7.
- 67 Kim SJ, Shiba E, Ishii H, Inoue T, Taguchi T, Tanji Y, Kimoto Y, Izukura M, Takai S. Thrombomodulin is a new biological and prognostic marker for breast cancer: an immunohistochemical study. *Anticancer Res*. 1997;17(3C):2319-23.
- 68 Hosaka Y, Higuchi T, Tsumagari M, Ishii H. Inhibition of invasion and experimental metastasis of murine melanoma cells by human soluble thrombomodulin [letter]. *Cancer*. 2000;161(2):231-40.
- 69 Villaça PR. *Avaliação de lesão e disfunção endotelial através da análise da trombomodulina e do fator de von Willebrand, no grupo multibacilar da hanseníase* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.
- 70 Quehenberger P, Loner U, Kapiotis S, Handler S, Scheneider B, Huber J, Speiser W. Increase level of activated factor VII e decreased plasma protein S activity and circulating thrombomodulin during use of oral contraceptives. *Thromb Haemost*. 1996;76(5):729-34.
- 71 Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Hayakawa T, Kagawa H, Nishikawa M, Inada M, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S. Effect of cilostazol on soluble adhesion molecules and platelet-derived micro particles in patients with diabetes. *Thromb Haemost*. 1998;80(3):388-92.
- 72 Conri C, Seigneur M, Constans J, Mercier P, Baste JC, Dufourcq P, Boisseau MR. Evidence of elevated soluble plasma thrombomodulin in atherosclerosis. *J Mal Vasc*. 1993;18(2):112-8.
- 73 Handa K, Takao M, Nomoto J. Evaluation of coagulation and fibrinolytic systems in men with Intermittent claudication. *Angiology*. 1996;47(6):543-48.
- 74 Blann AD, Seigneur M, Steiner M, Boisseau MR, McCollum. Circulating endothelial cell markers in peripheral vascular disease: relationship to the location and extent of atherosclerotic disease. *Eur J Clin Invest*. 1997;27(11):916-21.

-
- 75 Boffa MC, Karmochkine M. Thrombomodulin: an overview and potential implications in vascular disorders. *Lupus*. 1998;7(Suppl 2):S120-5.
- 76 Boffa MC. Considering cellular thrombomodulin distribution and its modulating factors can facilitate the use of plasma thrombomodulin as a reliable endothelial marker? *Haemostasis*. 1996;26(Suppl 4):233-43.
- 77 Wisnieska E, Wodynska T, Kulwas A, Kotschy M, Nartowicz E, Paczuski R, Michalski A. Thrombomodulin--endothelial thrombin receptor in blood of patients with unstable angina pectoris. *Med Sci Monit*. 2001;7(2):256-9.
- 78 Sernau T, Wilhelm C, Seyfert U, Gabath S, Henkels M, Amiral J, Bergis KH, Ziegler R, Wahl P, Nawroth PP. Thrombomodulin is a marker of microvascular, but not for macrovascular endothelial cell damage. *Vasa*. 1995;24(4):347-53.
- 79 Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, Wunsch A, Allenberg J, Kubler W, Bode C. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(3):505-12.
- 80 John S, Drobnik W, Lackner K, Schmieder RE. Soluble thrombomodulin and endothelial dysfunction in early atherosclerosis. *Lancet*. 1999;354(9190):1647.
- 81 Blann AD, Farrell A, Picton A, McCollum CN. Relationship between endothelial cell markers and arterial stenosis peripheral and carotid artery disease. *Thromb Res*. 2000;97(4):209-16.
- 82 Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-Garcia L, Folsom AR, Juneja H, Park E, Wu KK. Cross-sectional association of soluble thrombomodulin with mild peripheral artery disease; the ARIC study. *Atherosclerosis Risk in Communities*. 2001;157(2):309-14.
- 83 TASC. Transatlantic Inter-Society Consensus- Management of Peripheral Arterial Disease (PAD). *J Vasc Surg*. 2000;31,1(2).

-
- 84 Lundin M, Wikstein JP, Perakyla T, Lindfors O, Savolainen H, Skytta J, Lepantalo A. Distal pulse palpation: is it reliable? *World J Surg*. 1999;23(3):252-5.
- 85 Carter SA. Clinical measurement of systolic pressures in limbs with arterial occlusive disease. *JAMA*. 1969;207(10):1869-74.
- 86 Yao ST. Hemodynamic studies in peripheral arterial disease. *Br J Surg*. 1970;57(10):761-6.
- 87 Hiatt WR. The evaluation of exercise performance in patients with peripheral vascular disease. *J Cardiopulm Rehabil*. 1998;12(4):525-35.
- 88 Jelnes R, Gaardsting O, Hougaard Jensen K, Baekgaard N, Tonnesen KH, Schroeder T. Fate in intermittent claudication: outcome and risk factors. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986;293(6555):1137-40.
- 89 Gardner AW, Poehlman ET. Exercise rehabilitation programs for the treatment of claudication pain. A meta-analysis. *JAMA*. 1995;274(12):975-80.
- 90 Wolosker N, Rosoky RA, Nakano L, Basyches M, Puech-Leao P. Predictive value of the ankle-brachial index in the evaluation of intermittent claudication. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2000;55(2):61-4.
- 91 Wolosker N, Nakano L, Rosoky RA, Puech-Leao P. Evaluation of walking capacity over time in 500 patients with intermittent claudication who underwent clinical treatment. *Arch Intern Med*. 2003;163(19):2296-300.
- 92 Takano S, Kimura S, Ohdama S, Aoki N. Plasma thrombomodulin in health and diseases. *Blood*. 1990;76(10):2024-9.
- 93 Mihara H; Murai A; Handa K, Saku K, Shirai K, Tanaka K, Arakawa K. Thrombomodulin levels in patients with coronary artery disease. *Artery*. 1997;22(6):293-308.

-
- 94 Simioni P. The molecular genetics of familial venous thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 1999;12(3):479-503.
- 95 Saito M, Asakura H, Jokai H, Uotani C, Kumabashiri I, Morishita E, Yamazaki M, Yoshida T, Aoshima K, Matsuda T. Haemostatic and fibrinolytic parameters in septic patients with leukopenia or leukocytosis. *Eur J Haematol*. 1995;54(3):176-9.
- 96 Boehme MW, Stremmel W. Comparison of three commercially available thrombomodulin ELISA kits. *J Immunol Methods*. 2004;286(1-2):231-40.
- 97 Wattanakit K, Williams JE, Schreiner PJ, Hirsch AT, Folsom AR. Association of anger proneness, depression and low social support with peripheral arterial disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Vasc Med*. 2005;10(3):199-206.
- 98 Kannel WB, McGee DL. Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J Am Geriatr Soc*. 1985;33(1):13-8.
- 99 Wolosker N. *Evolução temporal da distância máxima de marcha em doentes com claudicação intermitente submetidos ao tratamento clínico com treinamento físico não supervisionado* [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2000.
- 100 Juergens JL, Barker NW, Hines EA Jr. Arteriosclerosis obliterans: review of 520 cases with special reference to pathogenic and prognostic factors. *Circulation*. 1960;21:188-95.
- 101 Diehm C, Kareem S, Lawall H. Epidemiology of peripheral arterial disease. *Vasa*. 2004;33(4):183-9.
- 102 Wolosker M, Wolosker N, Manastersky J, Monteiro CP, Quintão E. Tabagismo e doença vascular periférica. In: Gama JJ. *Fumo ou Saúde*. São Paulo: Bradepca; 1984. p.141-67.
- 103 Walsh DB, Gilbertson JJ, Zwolak RM, Besso S, Edelman GC, Schneider JR, Cronenwett JL. The natural history of superficial femoral artery stenoses. *J Vasc Surg*. 1991;14(3):299-304.

-
- 104 Kannel WB, Shurtleff D. The Framingham Study. Cigarettes and the development of intermittent claudication. *Geriatrics*. 1973;28(2):61-8.
- 105 Holm J, Bjorntorp P, Schersten T. Metabolic activity in human skeletal muscle. Effect of peripheral arterial insufficiency. *Eur J Clin Invest*. 1972;2(5):321-5.
- 106 Blann AD, Kirkpatrick U, Devine C, Naser S, McCollum CN. The influence of acute smoking on leucocytes, platelets and the endothelium. *Atherosclerosis*. 1998;141(1):133-9.
- 107 Quick CR, Cotton LT. The measured effect of stopping smoking on intermittent claudication. *Br J Surg*. 1982;69(Suppl):S24-6.
- 108 Langer B, Aguiar ET, Wolosker N. Complicações vasculares do diabetes. In Waishemberg BL. *Tratado de endocrinologia clínica*. São Paulo: Rocca;1992. p.787-96.
- 109 Wolosker N, Rosoky RMA, Muraco NB, Langer B. Tratamento conservador dos doentes diabéticos portadores de doença arterial tibio-peroneira. *Rev Paul Med*. 1995;13(1):701-5.
- 110 Mihara H, Murai A, Handa K, Saku K, Shirai K, Tanaka K, Arakawa K. Thrombomodulin levels in patients with coronary artery disease. *Artery*. 1997;22(6):293-308.
- 111 Uehara S, Gotoh K, Handa H. Separation and characterization of the molecular species of thrombomodulin in the plasma of diabetic patients. *Thromb Res*. 2001;104(5):325-32.
- 112 [No authors listed] Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the scandinavian simvastatin survival study (4S). *Lancet*. 1994;344(8934):1383-9.
- 113 Sacks FM, Pfeffer MA, Moyer LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1001-9.

-
- 114 Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2002;162(1):179-85.
- 115 Durazzo AE, Machado FS, Ikeoka DT, De Bernoche C, Monachini MC, Puech-Leao P, Caramelli B. Reduction in cardiovascular events after vascular surgery with atorvastatin: a randomized trial. *J Vasc Surg*. 2004;39(5):967-75; discussion 975-6.
- 116 Durazzo AE, Sitrangulo CJ Jr, Presti C, Silva ES, Luccia N. Peripheral obstructive arterial disease: what kind of clinical treatment are we recommending to our patients? *J Vasc Br*. 2005; 4(3): 255-64.
- 117 Clagett GP, Sobel M, Jackson MR, Lip GY, Tangelder M, Verhaeghe R. Antithrombotic Therapy in Peripheral Arterial Occlusive Disease The Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):609S-26S.
- 118 Guyatt G, Schünemann HJ, Cook D, Jaeschke R, Pauker S. Applying the grades of recommendation for antithrombotic and thrombolytic therapy the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):179S-87S.
- 119 Ness J, Aronow WS, Newkirk E, McDanel D.. Prevalence of symptomatic peripheral arterial disease, modifiable risk factors, and appropriate use of drugs in the treatment of peripheral arterial disease in older persons seen in a university general medicine clinic. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005;60(2):255-7.
- 120 Albertini JN, Barral X, Branchereau A, Favre JP, Guidicelli H, Magne JL, Magnan PE. Vascular surgical society of great britain and ireland: mid-term results of arterial allograft below-knee bypasses for limb salvage. *Br J Surg*. 1999;86(5):701.
- 121 Loreth RM, Seus Ch, Berger HH, Albert FW. .Plasma Thrombomodulin concentrations in healthy persons depends on age and sex. *Ann Hematol*. 1997;74(Suppl II):A89.

-
- 122 Morange PE, Simon C, Alessi MC, Luc G, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, Evans A, Ducimetiere P, Juhan-Vague I; PRIME Study Group. Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study. *Circulation*. 2004;109(11):1343-8.
- 123 Li YH, Chen CH, Yeh PS, Lin HJ, Chang BI, Lin JC, Guo HR, Wu HL, Shi GY, Lai ML, Chen JH. Functional mutation in the promoter region of thrombomodulin gene in relation to carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2001;154(3):713-9.
- 124 Blann AD. Von Willebrand factor as a marker of injury to the endothelium in inflammatory vascular disease. *J Rheumatol*. 1993;20(9):1469-71.
- 125 Hamsten A. The hemostatic system and coronary heart disease. *Thromb Res*. 1993;70(1):1-38.
- 126 Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost*. 2003;1(7):1515-24.
- 127 Wu KK, Aleksic N, Ballantyne CM, Ahn C, Juneja H, Boerwinkle E. Interaction between soluble thrombomodulin and intercellular adhesion molecule-1 in predicting risk of coronary heart disease. *Circulation*. 2003;107(13):1729-32.
- 128 Califano F, Giovanniello T, Pantone P, Campana E, Parlapiano C, Alegiani F, Vincentelli GM, Turchetti P. Clinical importance of thrombomodulin serum levels. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2000;4(3):59-66.
- 129 Shi J, Wang J, Zheng H, Ling W, Joseph J, Li D, Mehta JL, Ponnappan U, Lin P, Fink LM, Hauer-Jensen M. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003;14(6):575-85.

-
- 130 Rigla M, Fontcuberta J, Mateo J, Caixas A, Pou JM, de Leiva A, Perez A. Physical training decreases plasma thrombomodulin in type I and type II diabetic patients. *Diabetologia*. 2001;44(6):693-9.
- 131 Terada Y, Eguchi Y, Nosaka S, Toba T, Nakamura T, Shimizu Y. Capillary endothelial thrombomodulin expression and fibrin deposition in rats with continuous and bolus lipopolysaccharide administration. *Lab Invest*. 2003;83(8):1165-73.
- 132 Ishii H, Kizaki K, Horie S, Kazama M. Oxidized low density lipoprotein reduces thrombomodulin transcription in cultured human endothelial cells through degradation of the lipoprotein in lysosomes. *J Biol Chem*. 1996;271(14):8458-65.
- 133 Nomura E, Kohriyama T, Kozuka K, Kajikawa H, Nakamura S, Matsumoto M. Significance of serum soluble thrombomodulin level in acute cerebral infarction. *Eur J Neurol*. 2004;11(5):329-34.
- 134 Li YH, Chen JH, Wu HL, Shi GY, Huang HC, Chao TH, Tsai WC, Tsai LM, Guo HR, Wu WS, Chen ZC. G-33 A mutation in the promoter region of thrombomodulin gene and its association with coronary artery disease and plasma soluble thrombomodulin levels. *Am J Cardiol*. 2000;85(1):8-12.
- 135 Kunz G, Ohlin AK, Adami A, Zoller B, Svensson P, Lane DA. Naturally occurring mutations in the thrombomodulin gene leading to impaired expression and function. *Blood*. 2002;99(10):3646-53.
- 136 Weiler H, Lindner V, Kerlin B, Isermann BH, Hendrickson SB, Cooley BC, Meh Da, Mosesson MW, Shworak NW, Post MJ, Conway EM, Ulfman LH, von Andrian UH, Weitz JI. Characterization of a mouse model for thrombomodulin deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(9):1531-7.
- 137 Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, Silva FG, Esmon CT. Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol*. 2001;159(3):797-802.

-
- 138 Merlini PA, Rossi ML, Faioni EM, Franchi F, Bramucci E, Lucreziotti S, Biguzzi E, Mannucci PM, Ardissino D. Expression of endothelial protein C receptor and thrombomodulin in human coronary atherosclerotic plaques. *Ital Heart J.* 2004;5(1):42-7.
- 139 Healy AM, Hancock WW, Christie PD, Rayburn HB, Rosenberg RD. Intravascular coagulation activation in a murine model of thrombomodulin deficiency: effects of lesion size, age, and hypoxia on fibrin deposition. *Blood.* 1998;92(11):4188-9.
- 140 Petit L, van Oort FV, Le Gal G, Mennen LI, Alhenc-Gelas M, Touboul PJ, Zureik M, Scarabin PY. Association of postmenopausal hormone replacement therapy with carotid atherosclerosis and soluble thrombomodulin: the vascular aging (EVA) study. *Étude du Vieillissement Arteriel. Thromb Res.* 2002;105(4):291-7.
- 141 Nagasaki T, Inaba M, Henmi Y, Kumeda Y, Ueda M, Tahara H, Ishimura E, Onoda N, Ishikawa T, Nishizawa Y. Change in von Willebrand factor and carotid intima-media thickness in hypothyroid patients with normal thyroid function after levothyroxine replacement therapy. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(2):125-31.
- 142 Boehme MW, Galle P, Stremmel W. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology.* 2002;107(3):340-9.

APÊNDICE

Apêndice I

TASC - Classificação da Claudicação Intermitente

Grau zero:

Paciente assintomático, que apresenta doença oclusiva hemodinamicamente não significativa, realizando testes de esforço com carga fixa (5 minutos a 2 milhas por hora numa inclinação de 12 graus), sem nenhuma restrição.

Grau 1:

Subdividido em três categorias Leve, Moderada e Grave:

- A. Leve: Paciente completa o exercício na esteira; o valor da pressão obtida após o esforço em membro inferior é maior que 50 mmhg, embora pelo menos 20 mmhg menor em relação ao repouso.
- B. Moderada: faixa intermediária entre leve e grave.
- C. Grave: Paciente não completa o teste de esforço (menos que 5 minutos).
A pressão sistólica em tornozelos ou metatarsos cai para níveis inferiores a 50 mmhg.

Grau 2:

Paciente com dor isquêmica de repouso; pressão arterial medida no tornozelo menor que 40 mmhg, em pododáctilo menor que 30 mmhg; com ondas de pulso achatadas.

Grau 3:

Subdivididos em 2 categorias:

- A. Perda tecidual pequena: úlcera que não cicatriza ou gangrena focal com isquemia difusa do pé. Na situação de repouso, a pressão de tornozelo é inferior a 60 mmhg e a pressão em pododáctilo é menor que 40 mmhg.
- B. Perda tecidual maior: Lesão de tecidos que se estendem proximalmente a metatarsos.

APÊNDICE II

Thrombosis Research (2006) 117, 271—277

Relationship between soluble thrombomodulin in patients with intermittent claudication and critical ischemia

M. Nasser^{a,*}, N. Wolosker^a, L. Uint^b, R.A. Rosoky^a, M. Lobato^c,
M. Wajngarten^d, P. Puech-Leao^a

^aDivision of Vascular Surgery, Hospital das Clinicas, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil

^bHeart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School, Brazil

^cDepartment of Surgery, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil

^dGeriatric Cardiology Division, Heart Institute, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil

Received 1 November 2004; received in revised form 9 March 2005; accepted 24 March 2005

REGULAR ARTICLE

Relationship between soluble thrombomodulin in patients with intermittent claudication and critical ischemia

M. Nasser^{a,*}, N. Wolosker^a, L. Uint^b, R.A. Rosoky^a, M. Lobato^c,
M. Wajngarten^d, P. Puech-Leao^a

^aDivision of Vascular Surgery, Hospital das Clinicas, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil

^bHeart Institute (InCor), University of Sao Paulo Medical School, Brazil

^cDepartment of Surgery, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil

^dGeriatric Cardiology Division, Heart Institute, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Brazil

Received 1 November 2004; received in revised form 9 March 2005; accepted 24 March 2005

Available online 10 May 2005

KEYWORDS

Thrombomodulin;
Intermittent
claudication;
Critical limb ischemia;
Atherosclerosis;
Endothelium

Abstract

Introduction: Thrombomodulin (TM) has been described as a marker of endothelial injury in atherosclerosis. The role of TM as a predictor of PAD severity is to be proven. The goal of the present study is to compare the level of plasmatic (TMp) in patients with intermittent claudication with patients with critical ischemia in the lower limbs.

Materials and methods: TMp was measured using ELISA in the plasma of 41 patients with intermittent claudication degree 1 and in 40 patients presenting critical ischemia in the lower limbs degrees 2 and 3, according to TASC. The hypotheses of normality and homogeneity of the variance had been proven via Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. The comparison of the TMp between the groups was done using the *t*-Student test.

Results: No statistically significant difference was observed. The average levels of TMp for intermittent claudication were 5.2 ng/ml (0.78–13.61 ng/ml) and TMp for

Abbreviations: PAD, peripheral artery disease; TMp, plasmatic thrombomodulin; TM, thrombomodulin; TASC, Transatlantic Inter-Society Consensus.

* Corresponding author. Avenida Feijó 811, Araraquara, San Paulo, Brazil CEP 14801-1401. Tel.: +55 163332 0327; fax: +55 163332 0327.

E-mail addresses: michelnasser@aol.com.br (M. Nasser), nwolosker@yahoo.com.br (N. Wolosker), dcllucy@incor.usp.br (L. Uint), rrmrosoky@terra.com.br (R.A. Rosoky), manoellobato@hotmail.com (M. Lobato), manoellobato@hotmail.com, mauriciowa@uol.com.br (M. Wajngarten), cirurgia.vascular@hcnet.usp.br (P. Puech-Leao).

0049-3848/\$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.thromres.2005.03.010

critical ischemia in the lower limbs were 6.34 (0.82–18.22 ng/ml) where $p=0.265$.
Conclusion: Tmp does not seem to be an appropriate marker for PAD severity.
 © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The inflammatory process triggered by atherosclerotic disease in the arterial wall has been the subject of an increasing number of investigations over recent years [1–3]. Endothelial dysfunction is thought to be one of the initial stages of the disease. Its complete understanding would probably provide a means of anticipating severe atherosclerotic complications.

The search for a suitable marker for endothelial dysfunction is not recent [4–6]. Ideally, it would be a predictor of the severity of peripheral arterial disease (PAD), specific enough to be used in epidemiologic studies [7] as well as to identify patients at high risk of a worse outcome, who could benefit from a secondary prevention program.

Within this context, the proteoglycan thrombomodulin (TM) [8] has come into sharp focus of the investigation as an appropriate marker and predictor of PAD [9–12]. It is an endothelial cell membrane receptor that accelerates protein C activation once linked to thrombin [13] and inactivates factors Va and VIIIa in presence of protein S. The TM plasma level (Tmp) has been shown to be elevated in early endothelial atherosclerotic injury [14] as a sign of endothelial dysfunction.

The role of TM as a predictor of PAD severity is yet to be proven. Some studies revealed a correlation between increased Tmp and carotid atherosclerosis [15], involvement of other arterial segments [14] and nonspecifically situated atherosclerotic disease [11,12]. Tmp was also shown to be raised in patients with intermittent claudication, although in this study, a cluster of Raynaud patients had been included, a condition which is able to increase Tmp on its own [10]. However, research concerning the role of TM as a marker of atherosclerotic disease severity has yielded poor results. Although Blann et al. [9] had observed that Tmp increases are more intense in multisegmental arterial involvement than in unisegmental disease, the same author failed to prove a correlation between Tmp and carotid stenosis degree or ankle–brachial index in claudicants, which are well-established parameters of atherosclerotic disease severity [15]. Furthermore, John et al. [16] have also failed to show correlation between Tmp elevation and the impairment of endothelial-dependent vasodilation, a good marker of endo-

thelial dysfunction. Finally, some works have proven no difference between Tmp in atherosclerotic patients and normal controls [17–19].

The goal of the present study is to evaluate the role of TM as a marker of PAD severity, comparing Tmp in patients with intermittent claudication with levels in patients with critical ischemia in the lower limbs.

Methods

Patients

Eighty-one patients consecutively included with PAD were studied. Forty-one had intermittent grade-1 claudication, according to the TASC classification [20]. Forty patients presented critical ischemia in the lower limbs (grades 2 and 3), also according to this classification. All the patients were submitted to clinical observation that included peripheral pulse palpation and examination of the affected limb.

Intermittent claudication was diagnosed by means of a progressive load treadmill test and with measurement of the ankle–brachial index before and after the test [21–23]. Critical ischemia was diagnosed in hospitalized patients who presented persistent ischemic pain while at rest for more than 2 weeks, or who presented ulceration or gangrene at the extremities. Such patients also presented systolic pressure in the lower limbs less than 40 mm Hg.

Patients were not included in the study if they had, or had had a history of: malaria [24], hepatitis B [25], acquired immunodeficiency syndrome [26], abdominal or peripheral aortic aneurysm [27], chronic renal insufficiency [28], hepatic insufficiency [23] and malignant neoplasia [29]. Nor were they included if they presented carotid bruits [15], limb amputations or venous ulceration, or if they had been submitted to cardiac surgery [30] or peripheral angioplasty less than six months previously [31]. Patients who had used immunosuppressives or cytotoxic drugs were also not included, since such use could alter the Tmp.

The demographic characteristics relating to risk factors and the level of arterial occlusion are presented in Table 1.

Table 1 Demographic characteristics relating to risk factors and the level of arterial occlusion

		Intermittent claudication	Critical ischemia
No. of patients		41 100%	40 100%
Age		67 years	66 years
Sex	Female	16 39.0%	16 40.0%
	Male	25 61.0%	24 60.0%
Race	White	31 75.6%	35 87.5%
Smoking habit	Smoker	23 56.1%	15 37.5%
Diabetes		16 39.0%	13 32.5%
Hypertension		27 65.9%	25 62.5%
Anatomical level of the occlusion	Aorta	11 26.8%	16 40.0%
	Others	30 73.0%	24 60.0%
Cholesterol (mM)		209 (110–328)	198 (107–269)
LDL (mM)		133 (62–217)	126 (48–184)
HDL (mM)		45 (22–74)	41 (22–66)
Triglycerides (mM)		157 (53–383)	151 (73–315)

The groups of patients were homogenous and did not present any statistical difference between themselves in relation to the characteristics cited in Table 1 ($p > 0.05$).

All patients signed an informed consent statement, and the study was approved by the research ethics committee of our Hospital. All these patients were submitted to similar treatment that was in conformity with the ethical standards of the university's ethics committee for the analysis of research projects involving experimentation on human beings, and in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983.

Laboratory methods

After patients had fasted for at least 8 h, a non-traumatic puncture was made in a superficial vein of an upper limb in order to collect blood. This sample was transferred to test tubes containing 0.11 M sodium citrate and was centrifuged at 2500 rpm and 4 °C for 20 min. The resultant plasma was separated and stored at –80 °C for subsequent analysis.

The TMp was quantified using the immunoenzymatic method (ELISA), utilizing the monoclonal antibody technique (Imubind® Thrombomodulin Elisa Kit, American Diagnostica Inc, 500 West Avenue, Stanford EUA) [32]. Plasma thrombomodulin concentrations in healthy persons depend on age and sex; male (range 4.00–5.35 ng/ml), independent of age. Mean levels in females ranged from 2.73 ng/ml for the age group 21–30 years increasing to 4.79 ng/ml for the age group 61–70 years [33].

Statistical analysis

Comparisons were made between the two groups of patients using the Student's *t*-test. The test took into account the quantitative variables of age (years), cholesterol (mM), LDL (mM), HDL (mM), triglycerides (mM) and thrombomodulin (ng/ml). When necessary the values had been transformed into logarithms in order to achieve normality and homogeneity of variances. These conditions had been proven by the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. The Pearson coefficient of correlation was calculated to determine the degree of linear relationship between the TMp levels and the quantitative variables.

To undertake the study of the thrombomodulin, the variance analysis of two factors (two-way ANOVA) was utilized. This took into account the groups and each one of the qualitative variables—sex (female or male), race (White or other), smoking habit (smoker or non-smoker), diabetes (absent or present), hypertension (absent or present) and the anatomical level of the arterial occlusion (aortic or femoral/distal). *P* values < 0.05 were considered significant. All analyses were performed using StatSoft Statistica Software running under Windows XP.

Results

There were no statistically significant differences between the two groups of patients and the quantitative variables including the TMp. The claudicants presented an average TMp level of 5.2 ng/ml (range: 0.78–13.61 ng/ml) and the patients with critical ischemia in the lower limbs presented an average TMp level of 6.34 (range: 0.82–18.22 ng/ml), $p = 0.265$. Then relationships were sought between the groups of patients and other variables observed in this study in relation to TMp. The

Table 2 Pearson coefficients for comparisons between plasmatic TM levels and the quantitative variables

Variable	Intermittent claudication		Critical ischemia	
	Correlation coefficient	<i>p</i>	Correlation coefficient	<i>p</i>
Age	0.330	0.035	0.432	0.005
Cholesterol	–0.341	0.034	–0.157	0.348
LDL	–0.367	0.021	–0.080	0.635
HDL	–0.071	0.669	–0.004	0.979
VLDL	–0.202	0.218	–0.302	0.065
Triglycerides	–0.205	0.211	–0.305	0.063

Pearson coefficients calculated for investigating a correlation between Tmp levels and the quantitative variables are presented in Table 2.

There is evidence of linear correlation ($p < 0.05$) between the thrombomodulin and the variable: age ($r = 0.330$), cholesterol ($r = 0.341$) and LDL ($r = 0.367$) in the group with intermittent claudication and between the thrombomodulin and the age in the group of critical ischemia in the lower limbs ($r = 0.432$). However, these correlations are weak.

The variance analyses did not show any evidence of a significant difference between the groups or between any of the variable analyzed and the Tmp.

Discussion

The results of the present investigation clearly demonstrate that thrombomodulin (TM) plasma levels (Tmp) of claudication patients do not differ significantly from those of patients with critical ischemia in the lower limbs. We conclude that although Tmp might be an appropriate indicator of atherosclerosis, our results do not support the concept that it is a suitable marker for PAD severity.

TM is an endothelial cell membrane receptor for thrombin, that accelerates protein C activation. It has a large extracellular portion, where most of its biochemical activity takes place [34]. A number of polymorphisms in the TM gene have been characterized, and their association with thrombosis or arteriosclerosis are the focus of ongoing research. Racial variations in the frequency of those polymorphism could determine disparities in the predisposition to some TM-related diseases. Moreover, some investigators have attributed to TM an antithrombotic and atheroprotective effect [35].

In healthy people, the concentration of soluble TM reflects the quantity of TM expressed on the endothelial surface and increased expression of TM may raise the concentrations of soluble TM in the circulation. Thus, a high concentration of soluble TM may indicate a low prothrombotic state and low risk of coronary heart disease [35]. On the other hand, the concentration of soluble TM is also affected by increased proteolytic activity that results in the cleavage of the extracellular portion from endothelial TM. The proteolytic enzymes are thought to be released from activated white blood cells [36]. Thus, in some pathological states, the soluble TM concentration may reflect the degree of vascular damage and associated inflammation rather than the expression level of TM.

The expression level of TM is regarded as an antithrombotic factor as well, and it has been

shown to be increased concurrently with endothelium-protective approaches such as treatments with statins [37] and physical exercise [38]. Furthermore, some endothelium harmful elements decrease TM expression level possibly through down-regulation at the transcriptional level, such as lipopolysaccharide [39], oxidized low density lipoprotein [40] and TNF- α and IL-1 [41]. Certain mutations of the TM gene are also related to a decrease in its transcription, which translates into a reduction in TM expression level and less endothelium-protective ability [42,43]. Finally, an inverse relationship between TM expression level and arterial wall tension was recently elucidated [44]. Findings implicate pressure-induced changes in vessel wall tension, with concomitant endothelial deformation (strain), as a major regulator of TM expression in vivo. Therefore, Tmp is a variable which is determined according to multiple factors, which could be present following a heterogeneous distribution among the patients studied in our investigation.

Intermittent claudication and critical ischemia of the lower limbs are distinct clinical manifestations of PAD (TASC). Nevertheless, they present contrasting outcomes and prognoses specially regarding limb preservation. Patients with critical ischemia usually present an extensive arterial involvement more frequently than claudication patients. This possibly is the reflection of a more severe atherosclerotic disease in critical ischemia patients. In accordance with another research [14], our results corroborate the elevation of Tmp in atherosclerotic patients. However, we observed no relationship between the severity of the arterial disease and Tmp. These findings are in resonance with those of Blann et al. [15] who failed to prove a relationship between Tmp and the ankle-brachial index in claudicants (a PAD severity index). Indeed, Tmp might signal just the presence of PAD, but would not be a good predictor of its outcome. This is illustrated by analogy in two investigations, which report no correlation between Tmp and coronary artery disease [45] or even an inverse association between Tmp and the severity of the outcome after an acute cerebral infarction [42]. On the other hand, Blann et al. [9] have found a direct correlation between Tmp and the number of arterial sites involved by PAD. Nevertheless, differences in inclusion and exclusion criteria might be responsible for the discrepancies between our results and those of that investigation. Blann et al. have included patients with coronary artery disease [9], and have not excluded patients with hepatic disease [25], those who had recently

undergone arterial surgery [32] or had an arterial aneurism [27].

Some further possible explanations for our findings may be formulated. TMp might be related to the total atherosclerotic area, whereas some patients' symptoms might be related to a small, but critically stenotic area. It has been determined that TM expression level is deeply decreased in the endothelium lining atherosclerotic plaques [46] including coronary arteries [47], and those sites are particularly prone to thrombosis depending on the magnitude of TM deficiency [48]. Considering the balance between expression and fragmentation which determines TMp, atherosclerotic plaques of critical ischemia patients could possibly have lower TM expression level, could undergo more shedding of TM fragments, and could be more prone to thrombotic events than those of claudicants. In this sense, the final balance would be an approximation of TMp values of both groups. In another approach, Sernau et al. [19] have concluded that TMp is a marker for microvascular but not for macrovascular endothelial cell damage. Extending this concept, it could be hypothesized that considering the frequent cycles of ischemia and reperfusion to which claudicants are submitted to, those patients undergo inflammation bouts in their microcirculation which are absent in the critical ischemia patients owing to the more disseminated disease. Therefore, claudication patients might experience more TM shedding than their counterparts, making both TMp reach each other.

Another additional reason could be that TMp might be a suitable marker for an incipient phase of atherosclerotic disease, which would become stable in an advanced phase, matching TMp of both groups of patients. Supporting this concept, the EVA study [49] found a relationship between TMp and carotid artery intimal–medial thickness (IMT), a marker for early atherosclerotic generalized disease. Conversely, that study failed to establish a similar relationship of TMp with the presence of plaques in that artery, a sign of advanced disease. Considering these results, an analogy can be suggested to explain our findings, regarding intermittent claudication as an early stage of the disease and critical ischemia as an advanced one. Nevertheless, even the correlation between IMT and TMp may be questioned, as it may be influenced by acquired factors. Hypothyroid patients submitted to levothyroxine replacement therapy exhibit improvement in IMT without changes in TMp [50]. In addition, the idea that TMp might not be an appropriate marker for advanced disease may be challenged. Human

endothelial cell cultures show an increase of TM associated with cell necrosis and apoptosis as well as with mild membrane dysfunctions, both originated by the action of neutrophil derived proteases and oxygen radicals [51].

Together, those reports evoke the great complexity which determines TMp in a group of patients. This is reinforced by a report describing elevated TMp in patients with PAD and normal TMp in those with abdominal aortic aneurisms [27]. Corroborating our results, this investigation shows that although originated by the same disease process, intermittent claudication and critical ischemia might actually have pathophysiological peculiarities which deem them incomparable. On the other hand, TMp might be a proper marker for just one of them.

Genetic polymorphisms are even another relevant issue not to be neglected, in the search for explanations of our results. Some mutations in the TM gene can impair its atheroprotective ability [35,52]. In these situations, critical ischemia patients could have the plasma concentration of soluble TM similar to claudicants, but with an impaired function of this substance, which might influence a worse outcome for their arterial disease.

In this particular sense, an association between the G-33A mutation of the TM gene and carotid atherosclerosis in patients under 60 years old has been demonstrated, although no such association had been proven regarding ischemic stroke [44]. Moreover, this mutation leads to a decreased transcriptional activity of the TM gene, justifying lower TMp values found in those patients due to a decline in the endothelial TM expression level [43]. By analogy, claudicants might bear some genetic polymorphism which could determine their arterial disease but not necessarily a worse prognosis.

Yet regarding the G-33A mutation, it has been shown that coronary artery disease patients without this polymorphism have a higher TMp than mutants while TMp is directly correlated to the amount of vessels involved. Therefore, mutants might have their transcriptional ability hindered in atherosclerosis, when this is expected to be increased. Likewise, critical ischemia patients might have a polymorphism which could have a negative influence on TM expression and lower TMp.

In conclusion, TMp does not seem to be a proper marker for PAD severity, because of the amount and variability of factors which can influence this variable. We believe that further investigation is necessary to better elucidate the role of plasma markers in atherosclerotic disease.

References

- [1] Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, et al. Atherosclerotic vascular disease conference: writing group: III. Pathophysiology. *Circulation* 2004 (Jun 1);**109**(21):2617-25.
- [2] Price DT, Loscalzo J. Cellular cules and atherogenesis. *Am J Med* 1999 (Jul);**107**(1):85-97.
- [3] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002 (Mar 5);**105**(9):1135-43.
- [4] Blann AD, Taberner DA. A reliable marker of endothelial cell dysfunction: does it exist? *Br J Haematol* 1995 (Jun);**90**(2):244-8.
- [5] Hamsten A. The hemostatic system and coronary heart disease. *Thromb Res* 1993 (Apr 1);**70**(1):1-38.
- [6] Pearson JD. Vessel wall interactions regulating thrombosis. *Br Med Bull* 1994 (Oct);**50**(4):776-88.
- [7] Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-Garcia L, Folsom AR, Juneja H, et al. Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: a case-cohort study. *Lancet* 1999 (May 22);**353**(9166):1729-34.
- [8] Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem* 1982 (Jan 25);**257**(2):859-64.
- [9] Blann AD, Seigneur M, Steiner M, Boisseau MR, McCollum CN. Circulating endothelial cell markers in peripheral vascular disease: relationship to the location and extent of atherosclerotic disease. *Eur J Clin Invest* 1997 (Nov);**27**(11):916-21.
- [10] Handa K, Takao M, Nomoto J, Oku K, Shirai K, Saku K, et al. Evaluation of the coagulation and fibrinolytic systems in men with intermittent claudication. *Angiology* 1996 (Jun);**47**(6):543-8.
- [11] Conri C, Seigneur M, Constans J, Mercier P, Baste JC, Dufourcq P, et al. Evidence of elevated soluble plasma thrombomodulin in atherosclerosis. *J Mal Vasc* 1993;**18**(2):112-8.
- [12] Boffa MC, Karmochkine M. Thrombomodulin: an overview and potential implications in vascular disorders. *Lupus* 1998;**7**(Suppl 2):S120-5.
- [13] Esmon CT. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J* 1995;**9**:946-55.
- [14] Seigneur M, Dufourcq P, Conri C, Constans J, Mercie P, Pruvost A, et al. Levels of plasma thrombomodulin are increased in atheromatous arterial disease. *Thromb Res* 1993 (Sep 15);**71**(6):423-31.
- [15] Blann AD, Farrell A, Picton A, McCollum CN. Relationship between endothelial cell markers and arterial stenosis in peripheral and carotid artery disease. *Thromb Res* 2000 (Feb 15);**97**(4):209-16.
- [16] John S, Drobnik W, Lackner K, Schmieder RE. Soluble thrombomodulin and endothelial dysfunction in early atherosclerosis. *Lancet* 1999 (Nov 6);**354**(9190):1647.
- [17] Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-Garcia L, Folsom AR, Juneja H, et al. Cross-sectional association of soluble thrombomodulin with mild peripheral artery disease; the ARIC study. *Atherosclerosis Risk in Communities. Atherosclerosis* 2001 (Aug);**157**(2):309-14.
- [18] Peter K, Nawroth P, Conradt C, Nordt T, Weiss T, Boehme M, et al. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 correlates with the extent of human atherosclerosis in contrast to circulating intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, P-selectin, and thrombomodulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 (Mar);**17**(3):505-12.
- [19] Sernau T, Wilhelm C, Seyfert U, Gabath S, Henkels M, Amiral J, et al. Thrombomodulin is a marker of microvascular, but not for macrovascular endothelial cell damage. *Vasa* 1995;**24**(4):347-53.
- [20] TASC. Transatlantic Inter-Society Consensus—Management of Peripheral Arterial Disease (PAD). *J Vasc Surg* 2000 (Jan 31);**1**(2).
- [21] Hiatt WR. The evaluation of exercise performance in patients with peripheral vascular disease. *J Cardiopulm Rehabil* 1998;**12**(4):525-35.
- [22] Wolosker N, Nakano L, Rosoky RA, Puech-Leao P. Evaluation of walking capacity over time in 500 patients with intermittent claudication who underwent clinical treatment. *Arch Intern Med* 2003 (Oct 27);**163**(19):2296-300.
- [23] Yao ST. Haemodynamic studies in peripheral arterial disease. *Br J Surg* 1970 (Oct);**57**(10):761-6.
- [24] Hemmer CJ, Bierhaus A, von Riedesel J, Gabat S, Liliensiek P, Pitronik P, et al. Elevated thrombomodulin plasma levels as a result of endothelial involvement in *Plasmodium falciparum* malaria. *Thromb Haemost* 1994 (Sep);**72**(3):457-64.
- [25] Iwabuchi S, Yoshida Y, Kamogawa A, Moriyama N, Takatori A, Mizuguchi A, et al. Plasma thrombomodulin in liver diseases. *Gastroenterol Jpn* 1990 (Oct);**25**(5):661.
- [26] de Larranaga GF, Bocassi AR, Puga LM, Alonso BS, Benetucci JA. Endothelial markers and HIV infection in the era of highly active antiretroviral treatment. *Thromb Res* 2003 (May 1);**110**(2-3):93-8.
- [27] Blann AD, Devine C, Amiral J, McCollum CN. Soluble adhesion molecules, endothelial markers and atherosclerosis risk factors in abdominal aortic aneurysm: a comparison with claudicants and healthy controls. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998 (Sep);**9**(6):479-84.
- [28] Takano S, Kimura S, Ohdama S, Aoki N. Plasma thrombomodulin in health and diseases. *Blood* 1990 (Nov 15);**76**(10):2024-9.
- [29] Morishita E, Saito M, Asakura H, Jokaji H, Uotani C, Kumabashiri I, et al. Increased levels of plasma thrombomodulin in chronic myelogenous leukemia. *Am J Hematol* 1992 (Mar);**39**(3):183-7.
- [30] Mihara H, Murai A, Handa K, Saku K, Shirai K, Tanaka K, et al. Thrombomodulin levels in patients with coronary artery disease. *Artery* 1997;**22**(6):293-308.
- [31] Tsakiris DA, Tschohl M, Jager K, Haefeli WE, Wolf F, Marbet GA. Circulating cell adhesion molecules and endothelial markers before and after transluminal angioplasty in peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis* 1999 (Jan);**142**(1):193-200.
- [32] Esmon CT, Owen WG. Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 (Apr);**78**(4):2249-52.
- [33] Loreth RM, Seus Ch, Berger HH, Albert FW. Plasma thrombomodulin concentrations in healthy persons depends on age and sex. *Ann Hematol* 1997;**74**(suppl II):A89.
- [34] Weiler H, Isermann BH. Thrombomodulin. *J Thromb Haemost* 2003 (Jul);**1**(7):1515-24.
- [35] Wu KK, Aleksic N, Ballantyne CM, Ahn C, Juneja H, Boerwinkle E. Interaction between soluble thrombomodulin and intercellular adhesion molecule-1 in predicting risk of coronary heart disease. *Circulation* 2003 (Apr 8);**107**(13):1729-32.
- [36] Califano F, Giovanniello T, Pantone P, Campana E, Parlapiano C, Alegiani F, et al. Clinical importance of thrombo-

- modulin serum levels. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2000 (May-Jun);4(3):59-66.
- [37] Shi J, Wang J, Zheng H, Ling W, Joseph J, Li D, et al. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003 (Sep);14(6):575-85.
- [38] Rigla M, Fontcuberta J, Mateo J, Caixas A, Pou JM, de Leiva A, et al. Physical training decreases plasma thrombomodulin in type I and type II diabetic patients. *Diabetologia* 2001 (Jun);44(6):693-9.
- [39] Terada Y, Eguchi Y, Nosaka S, Toba T, Nakamura T, Shimizu Y. Capillary endothelial thrombomodulin expression and fibrin deposition in rats with continuous and bolus lipopolysaccharide administration. *Lab Invest* 2003 (Aug);83(8):1165-73.
- [40] Ishii H, Kizaki K, Horie S, Kazama M. Oxidized low density lipoprotein reduces thrombomodulin transcription in cultured human endothelial cells through degradation of the lipoprotein in lysosomes. *J Biol Chem* 1996 (Apr 5);271(14):8458-65.
- [41] Nomura E, Kohriyama T, Kozuka K, Kajikawa H, Nakamura S, Matsumoto M. Significance of serum soluble thrombomodulin level in acute cerebral infarction. *Eur J Neurol* 2004 (May);11(5):329-34.
- [42] Li YH, Chen JH, Wu HL, Shi GY, Huang HC, Chao TH, et al. G-33A mutation in the promoter region of thrombomodulin gene and its association with coronary artery disease and plasma soluble thrombomodulin levels. *Am J Cardiol* 2000 (Jan 1);85(1):8-12.
- [43] Li YH, Chen CH, Yeh PS, Lin HJ, Chang BI, Lin JC, et al. Functional mutation in the promoter region of thrombomodulin gene in relation to carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001 (Feb 15);154(3):713-9.
- [44] Sperry JL, Deming CB, Bian C, Walinsky PL, Kass DA, Kolodgie FD, et al. Wall tension is a potent negative regulator of in vivo thrombomodulin expression. *Circ Res* 2003 (Jan 10);92(1):41-7.
- [45] Morange PE, Simon C, Alessi MC, Luc G, Arveiler D, Ferrieres J, et al. Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME) study. *Circulation* 2004 (Mar 23);109(11):1343-8.
- [46] Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, Silva FG, Esmon CT. Downregulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 2001 (Sep);159(3):797-802.
- [47] Merlini PA, Rossi ML, Faioni EM, Franchi F, Bramucci E, Lucreziotti S, et al. Expression of endothelial protein C receptor and thrombomodulin in human coronary atherosclerotic plaques. *Ital Heart J* 2004 (Jan);5(1):42-7.
- [48] Healy AM, Hancock WW, Christie PD, Rayburn HB, Rosenberg RD. Intravascular coagulation activation in a murine model of thrombomodulin deficiency: effects of lesion size, age, and hypoxia on fibrin deposition. *Blood* 1998 (Dec 1);92(11):4188-97.
- [49] Petit L, van Oort FV, Le Gal G, Mennen LI, Alhenc-Gelas M, Touboul PJ, et al. Association of postmenopausal hormone replacement therapy with carotid atherosclerosis and soluble thrombomodulin: the vascular aging (EVA) study. *Etude du Vieillissement Arteriel. Thromb Res* 2002 (Feb 15);105(4):291-7.
- [50] Nagasaki T, Inaba M, Henmi Y, Kumeda Y, Ueda M, Tahara H, et al. Change in von Willebrand factor and carotid intima-media thickness in hypothyroid patients with normal thyroid function after levothyroxine replacement therapy. *Eur J Endocrinol* 2004 (Feb);150(2):125-31.
- [51] Boehme MW, Galle P, Stremmel W. Kinetics of thrombomodulin release and endothelial cell injury by neutrophil-derived proteases and oxygen radicals. *Immunology* 2002 (Nov);107(3):340-9.
- [52] Kunz G, Ohlin AK, Adami A, Zoller B, Svensson P, Lane DA. Naturally occurring mutations in the thrombomodulin gene leading to impaired expression and function. *Blood* 2002 (May 15);99(10):3646-53.