Thiago Oliveira Carvalho Silva

O IMPACTO DO DISTÚRBIO NO PADRÃO DE FLUXO ARTERIAL NA FUNÇÃO, ATIVAÇÃO E APOPTOSE ENDOTELIAL EM PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Janieire de
Nazaré Nunes Alves

São Paulo

2019

Thiago Oliveira Carvalho Silva	O impacto do distúrbio no padrão de fluxo arterial na função, ativação e apoptose endotelial em pacientes com insuficiência cardíaca	Mestrado <i>FMUSP</i> 2019

Thiago Oliveira Carvalho Silva

**O IMPACTO DO DISTÚRBIO NO PADRÃO DE FLUXO ARTERIAL NA
FUNÇÃO, ATIVAÇÃO E APOPTOSE ENDOTELIAL EM PACIENTES COM
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Janieire de
Nazaré Nunes Alves

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Thiago Oliveira Carvalho

O impacto do distúrbio no padrão de fluxo
arterial na função, ativação e apoptose endotelial em
pacientes com insuficiência cardíaca / Thiago
Oliveira Carvalho Silva. -- São Paulo, 2019.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Maria Janieire de Nazaré Nunes
Alves.

Descritores: 1.Velocidade de fluxo sanguíneo
2.Endotélio vascular 3.Insuficiência cardíaca

USP/FM/DBD-262/19

Dedicatória

Especialmente, dedico a meu padrinho **José Luís** e ao meu avô **Dougival** por me proporcionar educação acadêmica de excelência durante toda a vida. Ao último, dedico ainda mais esta conquista, por todo esforço dispendido e inúmeros valores transferidos. Foi fundamental para chegar até aqui ter sido bem alfabetizado e estudar em colégios de excelência.

Meu imensurável, muito obrigado, a minha mãe **Joilce Oliveira Souza**, minha avó **Joselita Moraes de Oliveira** e ao meu padrasto **Marcos Venícius Wagner**, por todo amor, carinho e dedicação. Jamais esquecerei o quanto vocês abdicaram nos últimos cinco anos e meio, para me proporcionar esse sonho. Obrigado por tanta intensidade em cada ação, ato e gesto, em prol desse objetivo.

À minha avó de consideração **Celeste Brandão** e tia **Raimunda Moraes**, por toda preocupação, compreensão pelas ausências constante e por sempre terem tanto carinho e amor por mim.

À meu irmão **Diego Braga Carvalho Silva** por todas as risadas, bate papo, desabafos, e conselhos. Curiosamente, esses momentos sempre aconteceram em situações muito oportunas e me ajudaram a seguir em frente quando o desânimo tomava conta.

À minha namorada **Jade Moreira** por todo incentivo, compreensão, carinho, companheirismo, e especialmente por me ouvir em muitos momentos difíceis ainda que distantes fisicamente.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Oxalá (Jesus Cristo), Ogum e Iemanjá por me guiarem e protegerem de forma incansável em todos os momentos.

À todos os voluntários, por participarem deste estudo. A colaboração de vocês tornou viável a realização desta pesquisa, do contrário, nada seria possível.

À minha orientadora, Doutora Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves, por abrir as portas e me conceder a chance de realizar meu sonho, e pela confiança inabalável creditada a mim. Obrigado por todos exemplos acadêmicos, científicos, correções e “sermões”. Tudo isto será muito importante para minha formação. Saiba que lhe tenho no mais alto exemplo profissional a ser seguido.

Ao meu co-orientador e amigo, Doutor Allan Robson Kluser Sales por me fornecer todas as ferramentas necessárias para conquista deste objetivo. Por tamanha intensidade profissional, cobranças e exigências. Reconheço que foi sempre visando meu amadurecimento acadêmico e pessoal. Tenha certeza que forjou minha dedicação daqui para frente.

Aos colegas de grupo, Francis Ribeiro, Guilherme Fonseca, Kelly Correia, Rafael Armani e Marcelo Santos, pela parceria ao me ajudar em todos os exames e apoio no dia a dia. Foram momentos acadêmicos enriquecedores.

Ao amigo Gustavo Souza Mendonça de Araújo, pela disposição e compromisso, com os dias e horários dos experimentos, sempre de forma dedicada e pró ativa.

Aos professores Walter Abrantes, Léa Barbetta e Mauricio Maltez por me apresentarem a Unidade de Reabilitação Cardíaca e Fisiologia do Exercício, quando eu ainda estava na graduação. Obrigado pelo incentivo e dicas durante a preparação para o aprimoramento.

As professoras, Dra. Maria Urbana Pinto Brandão Rondon, Dra. Ivani Credidio Trombetta e Me. Camila Paixão Jordão, pela recepção na Unidade de Reabilitação

Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor, por toda dedicação e paciência ao transmitir tantos conhecimentos, que se revelaram importantes durante a minha caminhada!

À minha turma de aprimoramento, Leslie, Leila, Diego, Tiago, Carlos, Ive, Rafaela, Renata e Flavia, por tantos momentos de cumplicidade e parceria. Vocês foram fundamentais para minha adaptação em São Paulo. Muito me orgulha ter feito parte dessa turma.

À equipe médica da Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor, Dra. Ana Maria Braga, Dra. Fabiana Hodas, Dr. Marcel Costa, Dra. Amanda Gonzales e Dra. Patrícia Oliveira por todo aprendizado e disponibilidade para me ajudar durante todos esses anos.

Às recepcionistas da Unidade Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor, Mônica Marques, Sandra Sino, Rosângela Aureliano, Fabiana Pereira, e mais recente, Patrick Noronha por toda ajuda institucional.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão, por me receber na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor e pelo grande aprendizado científico.

Aos amigos que a profissão de educação física me trouxe, Jayme Nunes e João Marcelo Miranda, por todas as indicações, ajuda e ensinamentos desde a decisão por qual faculdade escolher, passando pelos anos de graduação e os primeiros anos de graduado. Saibam que até hoje aprendo e me espelho em vocês.

À minha família de São Paulo, Paula Bruscaín, Marcos Miranda e Angelina Bruscaín Miranda, pelo infinito acolhimento, carinho, apoio, amor e muitos momentos de risada. Com toda certeza, conhecê-los foi o melhor acontecimento, desde que cheguei nessa cidade em 2014. Muito obrigado!

Ao médico, Dr. Marcelo Bueno pelo reconhecimento ao meu trabalho, pela confiança depositada em mim, e pela importantíssima oportunidade de trabalho concedida à época. Jamais esquecerei tamanha lealdade.

Aos amigos/irmãos, Junior Roxo; Pedro Alexandre Moreira; Pedro Henrique Moreira; Elbert Miranda; Tiago Cardim; Carlos Henrique; Cainã Mattos; Laion Costa; Ricardo Alexandre e as amigas/irmãs, Jeniffer Nascimento; Paula Pinheiro; Jamile Pino e Jessica Lima. Tenho vocês no mais alto grau de consideração, cada um me ensina diariamente a evoluir como ser humano. Todos são exemplos de caráter, honestidade e honra, admiro e nutro, o mais alto afeto por todos. Vocês me incentivaram, ajudaram de diversas formas, serviram de inspiração e como exemplos de força e obstinação. Muito obrigado por estarem ao meu lado todos esses anos!

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), ao Instituto do Coração (InCor) e à Fundação Zerbini pelo incrível aprimoramento que me proporcionaram.

“ Pense rapidamente em todos os gênios que você conhece e perceberá que sim, eles tinham uma mente privilegiada, mas, mais do que isso, eles eram trabalhadores incansáveis.

Se for difícil para você, faça por alguém.”

Pietro Mannarino

Normalização Adotada

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. Divisão 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, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2012.

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

Listas de Figuras

Listas de Tabelas

Listas de Abreviaturas

Listas de Siglas

Resumo

Abstract

1 Introdução	29
2 Revisão da Literatura	33
2.1 Insuficiência Cardíaca	34
2.2 Função Endotelial	36
2.3 Padrão de fluxo sanguíneo e seu distúrbio	40
2.4 Micropartículas Endoteliais	43
2 Objetivos	47
2.1 Testar as hipóteses:	48
3 Materiais e Métodos	49
3.1 Aprovação Ética	50
3.2 Amostra do Estudo	50
3.3 Desenho Experimental	50
3.4 Medidas e Procedimentos	52
3.4.1 Avaliação da Função Cardíaca	52
3.4.2 Avaliação da capacidade física	53
3.4.3 Avaliação da Função Endotelial	54
3.4.4 Avaliação do Padrão de Fluxo Sanguíneo	55
3.4.5 Intervenção para Induzir Distúrbio de Fluxo Sanguíneo	56
3.4.6 Avaliação e leitura de Micropartículas Endoteliais	56
3.4.7 Análise de Dados Vasculares e Hemodinâmicos	58
3.5 Análise Estatística	59
4 Resultados	61
4.1 Características Físicas e Clínicas	63
4.2 Padrão de fluxo sanguíneo, DMF e MPEs	64
4.3 Distúrbio de Fluxo Sanguíneo	66

4.4 Respostas endoteliais ao distúrbio de fluxo sanguíneo	68
4.5 Dilatação Mediada pelo Fluxo	70
5 Discussão	74
6 Limitações	79
7 Conclusão	81
8 Referências	83

Lista de Figuras

Figura 1. Padrão de fluxo sanguíneo arterial em condição fisiológica.....	40
Figura 2. Representação de possíveis mecanismos produzidos na formação de micropartículas endoteliais originadas a partir de apoptose ou de células endoteliais ativadas.....	44
Figura 3. A) Protocolo experimental e B) Setup experimental do estudo.....	52
Figura 4. Avaliação da função cardíaca, através do exame de ecocardiografia.....	53
Figura 5. Avaliação da capacidade funcional via teste ergoespiométrico.....	54
Figura 6. Avaliação da função endotelial através da técnica de DMF.....	55
Figura 7. Aparelho citometro de fluxo da marca BD FACSVerse utilizado para leitura de MPEs.....	57
Figura 8. Fluxograma de inclusão dos participantes no estudo. Grupo IC = grupo insuficiência cardíaca e grupo SD = grupo sedentário.....	62
Figura 9 A–D. Shear rate anterógrado (SR anterógrado, Painel A), retrógrado (SR retrógrado, Painel B), médio (SR médio, Painel C) e oscilatório (SR oscilatório, Painel D) durante a manobra para indução de SR retrógrado nos grupos insuficiência cardíaca (IC) e saudável (SD).....	68
Figura 10. Micropartículas endotelial (MPEs) em pacientes com insuficiência cardíaca (IC; Painel A) e indivíduos saudáveis (SD; Painel B) durante sessão experimental e sessão controle.....	69
Figura 11. Delta de micropartículas endoteliais (MPEs) em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos saudáveis durante sessão experimental e sessão controle....	69

Figura 12. Dilatação mediada pelo fluxo (DMF) pré e pós manobra para induzir distúrbio no padrão de fluxo em pacientes insuficiência cardíaca (IC) e sujeitos saudáveis durante as sessões experimental e controle. Resposta individual de DMF durante a sessão controle em pacientes IC (Painel B) e indivíduos SD (Painel D). Resposta individual de DMF durante a sessão experimental em pacientes IC (Painel C) e indivíduos SD (Painel F) 71

Figura 13. Delta de dilatação mediada pelo fluxo (DMF) em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) e indivíduos saudáveis (SD) durante sessão experimental e sessão controle..... 72

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características físicas e clínicas do grupo de pacientes com insuficiência e grupo de indivíduos saudáveis.....	64
Tabela 2. Padrão de fluxo sanguíneo, função endotelial, e micropartículas endoteliais de repouso.....	65
Tabela 3. Padrões de fluxo sanguíneo durante distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos saudáveis.	67
Tabela 4. Dilatação mediada pelo fluxo artéria braquial durante as sessões experimental e controle de pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos saudáveis.....	73

Lista de Abreviaturas

ANG II	Angiotensina II
AUC	Área sob a curva
BH4	Tetraidrobiopterina
CAM	Calmodulina
CD144	Grupo de diferenciação 144
CD31	Grupo de diferenciação 31
CD54	Grupo de diferenciação 54
CD62E	Grupo de diferenciação 62 E-Selectina
CF	Classe funcional
CV	Condutância vascular
DAC	Doença arterial coronariana
DDVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DM	Diabetes mellitus
DMF	Dilatação mediada pelo fluxo
DSVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
ECG	Eletrocardiograma
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNos	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
Eros	Espécies reativas de oxigênio
ET 1	Expressão de endotelina 1
FC	Frequência Cardíaca
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GTP	Guanosina trifosfato
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade

IC	Insuficiência cardíaca
ICAM 1	Moléculas de adesão intracelular
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MHz	Mega Hertz
Min	Minutos
ml	mililitros
mm Hg	Milímetros de mercúrio
MPEs	Micropartículas endoteliais
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH oxidase	Enzimas produtoras de espécies reativas de oxigênio
NF- κ B	Fator nuclear κ B
ON	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PECAM	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
RPM	Rotação por minuto
SC	Sessão controle
SD	Saudável
SE	Sessão Experimental
SOD	Superóxido desmutase
SR	Shear rate
SRAUC	Área sob a curva de shear rate
SUS	Sistema único de saúde
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VCAM 1	Moléculas de adesão celular vascular 1
VCO ₂	Volume de dióxido de carbono

VO₂

Consumo de oxigênio

Lista de Siglas

NYHA	New York Heart Association
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa
InCor	Instituto do Coração
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina do Estado de São Paulo
CAEE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
SDC	Sessão de Documentação Científica

Resumo

Oliveira, TC. *O impacto do distúrbio no padrão de fluxo na função, ativação e apoptose endotelial em pacientes com insuficiência cardíaca.* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (IC) é uma síndrome clínica caracterizada por intolerância ao esforço, devido ao comprometimento da perfusão vascular periférica de órgãos e tecidos, resultando em disfunção neurovascular. Esta disfunção pode provocar distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo, caracterizado pelo aumento de *shear rate* (SR) retrógrado e oscilatório. Esse aumento tem sido associado com aumento de micropartículas endoteliais, (MPEs) na circulação e redução da função endotélio-dependente. **Objetivo:** Testar as seguintes hipóteses: (1) Pacientes com IC em comparação a indivíduos SD apresentam maior SR retrógrado e SR oscilatório na artéria braquial em repouso; (2) Pacientes com IC em comparação a indivíduos SD apresentam reduzida função endotélio-dependente e elevados níveis de MPEs na circulação em repouso; (3) Aumento do SR retrógrado na artéria braquial, induzido de forma “exógena” via manobra fisiológica, provoca maior liberação de MPEs em pacientes com IC em comparação a indivíduos SD e; (4) Aumento do SR retrógrado provoca maior redução na função endotélio-dependente em pacientes com IC. **Métodos:** Dezoito pacientes com IC (idade: 55 anos) e 14 indivíduos SD (idade: 49 anos) foram submetidos, aleatoriamente, a duas sessões, uma experimental (Oclusão) e a outra controle (sem oclusão). A dilatação mediada pelo fluxo (DMF) da artéria braquial (*Doppler*) foi avaliada antes e após 10 minutos do distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo, o qual foi produzido por meio de um manguito pneumático (Hokanson) inflado a 75 mmHg no antebraço direito, por um período de 30 min. As amostras de sangue venoso foram coletadas em repouso, 15 e 30 min após o início do distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo, para a dosagem de MPEs (citometria de fluxo). **Resultados:** Em repouso, a DMF foi menor em pacientes com IC em comparação a indivíduos SD. Mas, o SR retrógrado, SR oscilatório e as MPEs não foram diferentes entre os grupos. Durante a manobra de indução de distúrbio no padrão de fluxo, na sessão experimental, houve um aumento semelhante da resposta do SR retrógrado e SR oscilatório ($p < 0,0001$) em ambos os grupos. Na sessão controle, nenhuma alteração foi observada. As MPEs durante o distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo foram maiores em pacientes com IC em comparação a indivíduos SD ($p = 0,05$). Nenhuma diferença foi observada na sessão controle. O distúrbio no padrão de fluxo diminuiu a DMF, de forma similar, em ambos os grupos ($p < 0,05$). **Conclusão:** Em repouso, pacientes com IC apresentaram menor DMF do que os SD, mas, nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada para o padrão de fluxo sanguíneo. O distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo, provocou redução da função endotelial de forma semelhante em ambos os grupos, todavia, somente os pacientes com IC apresentaram aumento nas MPEs.

Palavras-chave: Distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo, micropartículas endoteliais, função endotélio-dependente e insuficiência cardíaca.

Abstract

Oliveira, TC. *The impact of disturbed blood flow on function, activation and apoptosis of endothelial cells in patients with heart failure.* [Dissertation]. Sao Paulo: Medical School, University of Sao Paulo; 2019.

Introduction: Heart failure with reduced ejection fraction (HF) is a clinic syndrome characterized by limitations to physical effort, which may be explained by great peripheral vasoconstriction, as result of a neurovascular dysfunction. This dysfunction may induce disturbed blood flow, characterized by high retrograde and oscillatory shear rate (SR). This response has been associated with augmentation on circulating endothelial microparticles (EMPs) and reduced endothelial-dependent function.

Objectives: To test the hypotheses: (1) Patients with HF in comparison to HS individuals present higher SR retrograde and oscillatory SR in resting brachial artery ;(2) Patients with HF in comparison to HS individuals have reduced endothelium-dependent function and high levels of resting EMPs; (3) Increased SR in the brachial artery, induced "exogenously" via physiological maneuver, causes greater release of EMPs in HF patients compared to HS and; (4) Increased retrograde SR causes greater reduction in endothelium-dependent function in patients with HF.

Methods: Eighteen HF patients (age: 55 years) and 14 healthy subjects (age: 49 years) randomly underwent to two sessions, experimental and control. Brachial artery FMD (Doppler) was evaluated before and 30 min after disturbed blood flow, which was produced via a pneumatic cuff (Hokanson) inflated to 75 mm Hg in forearm. Venous blood samples were collected at rest, 15 and 30 min of disturbed blood flow to assess circulating EMPs levels (CD42b-/CD31+; Flow cytometry).

Results: At rest, FMD was smaller in HF patients compared to HS. But, retrograde SR and oscillatory SR and EMPs were no difference between groups. During maneuver to induction of disturbed blood flow, experimental session, the retrograde SR and oscillatory SR similarly increased in both groups ($p<0.0001$). In control session, no change was observed. EMPs during disturbed blood flow was greater in HF patients compared to HS ($p=0.05$). No changes difference was found in control session. Disturbed blood flow similarly decreased FMD in both groups ($p<0.05$).

Conclusion: At rest, HF patients have smaller FMD compared to HS, but not difference was found for blood flow patterns between groups. Disturbed blood flow similarly decreased the endothelial function in both groups, but it increased EMPs only in HF patients.

Keywords: Disturbed blood flow, endothelial microparticles, endothelial-dependent function and heart failure.

1 Introdução

A insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (IC) é uma síndrome clínica caracterizada por intolerância ao esforço, devido ao comprometimento da perfusão vascular periférica de órgãos e tecidos, resultando em disfunção neurovascular[1, 2]. Ela representa uma das principais causas de mortalidade cardiovascular no mundo[3]. No Brasil, dados do sistema único saúde (SUS), relatam que esta síndrome é a causa mais frequente de internação por doenças cardiovasculares, levando ao aumento progressivo nas taxas de mortalidade em pacientes idosos[4, 5]. Este fato torna-se ainda mais alarmante, a medida que a população de idosos aumenta de forma exponencial.

A disfunção endotelial tem papel importante no desenvolvimento da IC, pois o endotélio é um órgão endócrino, capaz de sintetizar substâncias que participam ativamente do processo de modulação do tônus vascular[6], coagulação[7], angiogênese[8], remodelamento vascular[9] e inflamação[10]. Estudos prévios demonstram que pacientes com IC, independentemente da etiologia, apresentam redução na resposta vascular durante a infusão intra-arterial de acetilcolina[11-13] ou na dilatação mediada pelo fluxo(DMF), caracterizando a disfunção endotélio-dependente[11, 14] nesses pacientes. Foi demonstrado que pacientes com IC, apresentam hiperativação do sistema nervoso simpático[15, 16], o qual desencadeia vasoconstrição periférica crônica[17-19]. Em conjunto, essas disfunções, vascular e neuronal, podem provocar um distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo. Esse distúrbio se caracteriza por elevação de shear rate (SR), retrógrado e oscilatório, e redução do SR médio na circulação arterial periférica, em repouso, de pacientes com IC. Até o momento, todavia, essas alterações são pouco caracterizadas, sugerindo a necessidade de estudos adicionais.

Sabe-se que o SR possui um papel chave na estimulação de processos vasodilatadores dependentes do endotélio vascular, principalmente, na liberação do

óxido nítrico (NO)[20, 21]. Na presença de distúrbio no SR, no entanto, esses mecanismos vasodilatadores estão prejudicados e podem amplificar os processos inflamatórios. De fato regiões arteriais irregulares geometricamente, como bifurcações e curvaturas (exemplo: artérias coronária e femoral), estão expostas a distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial e por isso, apresentam grande suscetibilidade a formação de placa aterosclerótica[22]. Recentemente, diversos trabalhos têm mostrado que o aumento agudo no SR retrógrado em artéria periférica de condução, induzido por manobra fisiológica oclusiva parcial da circulação, provoca redução na função endotélio-dependente, via dilatação mediada pelo fluxo (DMF), em indivíduos saudáveis (SD)[23-27].

Adicionalmente, no âmbito celular, as micropartículas derivadas do endotélio (MPEs), que foi uma metodologia desenvolvida para quantificar o descolamento das células endoteliais maduras e de micropartículas derivadas do endotélio, as quais representam um marcador de dano vascular. As MPEs, portanto, são vesículas de membranas muito pequenas ($<1,0\ \mu\text{m}$), liberadas na circulação em resposta a injúria, ativação e apoptose endotelial[28-30]. Embora elas estejam amplamente aumentadas em diversas situações patológicas em condições basais, como IC[29], hipertensão[30], síndrome metabólica[31] e doença arterial coronariana[32], poucos estudos tem avaliado a quantificação e liberação das MPEs, em condições de distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial, principalmente em situações de doença crônica e disfunção endotelial [24, 33]. Nesses estudos, verificou-se que o aumento no SR retrógrado e oscilatório, por 20-30 minutos provoca aumento em MPEs na circulação de indivíduos SD e em pacientes com hipertensão arterial e doença pulmonar, reforçando o impacto deletério de distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial na integridade do endotélio vascular[24, 31, 33].

Considerando que na disfunção ventricular, alterações vasculares estruturais e

funcionais já estão presentes, é razoável especular-se que as respostas vasculares frente à manobra de indução de SR retrógrado e SR oscilatório, são mais amplas e prejudicadas em pacientes com IC do que nos indivíduos SD. Contudo, até o momento estas respostas não são conhecidas. Foi hipotetizado para esse estudo que um aumento no SR retrógrado, induzido de forma “exógena” via manobra de oclusão parcial, provoca maior liberação de MPEs em pacientes IC do que em indivíduos SD e essa resposta de MPEs, pode levar a maior redução na função endotelial nos pacientes com IC.

2 Revisão da Literatura

2.1 Insuficiência Cardíaca

A IC é uma síndrome complexa de caráter sistêmico, definida por disfunção cardíaca que ocasiona inadequada perfusão tecidual, isso é, uma incapacidade do coração de bombear sangue de forma adequada, para suprir as necessidades do organismo[1, 2]. Os sintomas iniciais da síndrome, característicos do comprometimento cardíaco, surge em situações de esforço físico moderado a intenso, contudo, com o seu agravamento há a manifestação de cansaço também em condições de repouso. Dessa forma, os sintomas mais comuns da disfunção ventricular são dispneia, fadiga e grandes limitações aos esforços físicos. Esses sintomas surgem e se tornam ainda mais intensos à medida que a síndrome progride ao longo dos anos. A insuficiência cardíaca, portanto, tornou-se um problema de saúde pública e tem sido considerada como uma nova epidemia em diversos países, inclusive desenvolvidos, incapacitando as atividades laborativas e também, devido às altas taxas de mortalidade e morbidade[1, 2].

Baseado em dados do *National Health and Nutrition Examination survey* e *National Heart, Lung and blood Institute* publicados na última atualização da *American Heart Association*, estima-se que 6,5 milhões de norte-americanos maiores de 20 anos tem IC[3]. A projeção aponta que a prevalência dessa síndrome aumentará em 46% entre 2012 e 2030, resultando em mais de 8 milhões de adultos acometidos por esta síndrome. No Brasil, dados do *BREATHE (Brazilian Registry of Acute Heart Failure)* revela que a má aderência a terapêutica básica é a principal causa de re-hospitalizações, somados a elevada taxa de mortalidade intra hospitalar, colocando o Brasil, como um dos países com os mais altos níveis de mortes por IC no mundo ocidental[34].

De acordo com a última diretriz europeia, a prevalência de IC é de

aproximadamente 1-2% da população adulta nos países desenvolvidos, aumentando para mais de 10% entre as pessoas maiores que 70 anos de idade. Entre as pessoas com mais de 65 anos de idade que apresentam falta de ar durante esforço, uma em cada seis terá IC. Segundo a diretriz europeia, a etiologia da IC é diversificada entre diferentes regiões no mundo. A associação de patologias diferentes, cardíaca ou não, podem desencadear a IC. A identificação dessas diferentes causas e diagnósticos, podem levar a terapêuticas específicas[3].

A fisiopatologia da IC é um processo complexo que envolve a ativação de diversos mecanismos, destacando-se a hiperativação neuro-humoral que desempenha um papel importante, pois é ativada para manter o débito cardíaco e a perfusão arterial periférica [17, 18]. Dentre os mecanismos humorais estão o aumento nos níveis de angiotensina I e II, renina, aldosterona e vasopressina, bem como a elevação de catecolaminas circulantes. Tais mecanismos têm sido associados à retenção de sódio e água que contribuem para a piora do estado clínico do paciente. A disfunção cardíaca, portanto, é responsável pelas alterações neurovasculares. Assim, a elevação inicial da atividade nervosa simpática, compensa o baixo débito cardíaco, aumentando a resistência vascular e melhorando, pelo menos em parte, a perfusão tecidual sistêmica. Porém, a disfunção cardíaca crônica a longo prazo, se torna extremamente deletéria, piorando a função endotelial e provocando redução adicional no fluxo sanguíneo para a irrigação de órgãos e tecidos [35-37], o que provoca a intensificação da queda da capacidade funcional progressivamente.

As principais etiologias que levam a IC são; isquêmica, hipertensiva, chagásica, alcoólica, periparto e dilatada ou idiopática. A IC de origem isquêmica que ocorre após infarto agudo de miocárdio ou, transitoriamente, na presença de angina instável é a causa mais comum [38]. A IC de causa hipertensiva se origina a partir do aumento crônico da pós carga (resistência vascular periférica elevada) sobrecarregando o

ventrículo esquerdo, a partir da hipertrofia cardíaca concêntrica, ativação de bomba de sódio/potássio, hipertrofia e desadaptação da função ventricular[39]. A miocardiopatia alcoólica ocorre devido ao abuso prolongado de bebidas alcoólicas, ativando cronicamente a aldosterona e ativação do simpático central para a via eferente [40]. A IC de origem chagásica, frequente no Brasil e América Latina é desencadeada pelo processo inflamatório desenvolvido pela contaminação do vetor “*tripanossoma cruzi*” o qual pode resultar em processo cicatricial do miocárdio e degeneração do sistema parassimpático e desbalanço autonômico cardíaco inigualável, alterando o esqueleto fibroso e o automatismo elétrico, levando então à disfunção contrátil dos ventrículos[41]. Por fim, a etiologia dilatada ou idiopática, e periparto, tem suas causas indefinidas, podendo ser multifatorial, a qual envolvem processos inflamatórios ou auto-imune, expressão fenotípica influenciados pela determinação da carga genética e herança familiar, dentre outros[3].

Os pacientes diagnosticados com IC são subdivididos em classes funcionais, de acordo com a intensidade dos sinais e sintomas relatados pelo paciente, e são distribuídos em 4 classes, segundo a *New York Heart Association* (NYHA) a classe I: caracterizada por ausência de sintomas durante atividades cotidianas, com limitação para esforços semelhante à esperada em indivíduos saudáveis; classe II: sintomas desencadeados por atividades cotidianas; classe III: sintomas desencadeados em atividades menos intensas que as cotidianas e; classe IV: sintomas em repouso[38].

2.2 Função Endotelial

Por muitos anos o endotélio foi considerado como uma simples barreira divisória à qual se atribuía a função de separar o sangue do músculo liso vascular e permitir a difusão de substâncias, enquanto que, a regulação do tônus vascular dentre outras

funções eram atribuídas, somente, ao sistema nervoso simpático e hormônios circulantes, respectivamente[42]. Atualmente, no entanto, sabe-se que o endotélio é o principal responsável por manter a homeostase cardiovascular, sendo considerado um órgão complexo com funções autócrina, parácrina e endócrina o qual é ativado em resposta a estímulos neurais, hormonais e mecânicos. O grande potencial do endotélio se deve a um conjunto de relevantes trabalhos publicados na década de 1980, com destaque fundamental para o trabalho de Furchgott e Zawadzki, que é considerado um marco histórico no avanço científico, até os dias atuais, para o entendimento de mecanismos fisiológicos cardiovasculares[43]. Nesses trabalhos, os autores, infundiram acetilcolina em anéis de aorta e arteríolas de coelhos com e sem endotélio e viram que na presença de células endoteliais, seja por ação mecânica ou bioquímica, ocorria uma vasodilatação, enquanto que na ausência das células endoteliais, seja por ação mecânica ou bioquímica, esta mesma resposta não foi observada.

Os fatores vasoativos derivados do endotélio podem ser divididos em dois grupos: 1- fatores que provocam relaxamento, e 2- fatores que provocam vasoconstrição. Alguns estímulos fisiológicos como a força de atrito que o fluxo de sangue exerce ao entrar em contato com a parede do vaso durante sua passagem é comumente denominado de tensão de cisalhamento ou *shear stress*, além de alterações no ambiente químico local, tal como a hipóxia tecidual, que promove a liberação de substâncias vasodilatadoras. A principal e mais potente substância vasodilatadora é o óxido nítrico (NO). Em condições normais, o NO modula funções protetoras para manter o equilíbrio vasomotor quando não há dano endotelial, prevenindo a adesão e agregação de plaquetas por meio do seu potencial antiaterogênico e tromboresistente[43-45].

A enzima precursora de NO, a óxido nítrico sintetase endotelial (eNOs) serve de intermediária para síntese de NO a partir da ação da L-arginina, que sofre a ação de

co-fatores como a tetrahydrobiopterina (BH4), calmodulina (CAM) e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADPH) para a sua formação. A eNOS se difunde com muita rapidez para as fibras musculares lisas, onde estimula guanilato ciclase solúvel, ativando a conversão da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc)[46]. O resultado dessa reação é a diminuição das concentrações de cálcio intracelular, promovendo o relaxamento da musculatura lisa. Além do NO, outras substâncias, tal como, as prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) tem papel importante na modulação da vasodilação.

Quanto aos fatores vasoconstritores, se destacam a endotelina (ET) e a angiotensina II (Ang II). A ET pode ser encontrada em quatro isoformas, mas, somente a isoforma ET-1 é liberada constitutivamente pelo endotélio, cuja função é contraregular o tônus vasomotor endógeno, que por sua vez, contribui para constrição persistente sobre as células da musculatura lisa dos vasos. A ET-1 é considerada a principal substância vasoconstritora, enquanto que o *shear stress* e a Ang II são os principais estímulos, físico e químico, respectivamente, que regulam a produção de ET-1[47]. O desbalanço na regulação de ET-1 tem sido ocasionado por diversas doenças cardiovasculares, na qual se destacam a IC[48], a hipertensão pulmonar[49] e as desordens metabólicas[50] e renais[51] .

A liberação de Ang II desencadeia vasoconstrição e ativação adicional de ET-1, juntas essas substâncias promovem um aumento na proliferação celular, hipertrofiando a camada média dos vasos sanguíneos e impedindo a ação mecânica do NO, que apesar dos níveis elevados na circulação é inativado biologicamente, pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), ocasionando um desbalanço entre forças vasodilatadoras e vasoconstritoras endoteliais. Vale a pena ressaltar, que a regulação da função endotelial é dependente da interação entre fatores miogênicos e o sistema nervoso autônomo[52, 53].

A presença de disfunção endotelial pode representar o surgimento ou progressão de um processo aterogênico ocasionado pela impermeabilidade do NO à vasodilatação, facilitando o aumento na circulação de catecolaminas e o processo de rolagem de partículas lipídicas para o sub-endotélio. A ativação desse processo inflamatório, gera proliferação celular e formação da placa ateromatosa piorando a disfunção endotelial[54, 55].

Classicamente, disfunção endotelial pode ser definida como o desequilíbrio na biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, em especial de NO, e o aumento na síntese de fatores vasoconstritores derivados do endotélio[48, 52]. Dessa forma, a disfunção endotélio-dependente centraliza os mecanismos desencadeantes da aterosclerose, que por sua vez, altera a resposta reativa vascular, ocasionando vasoespasmo, clinicamente exposto pelos quadros de angina, isquemia e infarto agudo do miocárdio. Certamente, a disfunção endotelial figura entre os principais mecanismos fisiopatológicos de doenças cardiovasculares, tais como diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS)[56], doença arterial coronariana (DAC)[57], dislipidemia e insuficiência cardíaca (IC). A presença de disfunção endotelial prediz de forma independente, a piora na sobrevida livre de eventos cardiovasculares maiores, como acidente vascular cerebral, infarto e morte súbita[58]. Indivíduos que apresentam esta condição apresentam risco duas vezes maior de evento cardiovascular adverso quando comparados a indivíduos sem essa condição[58].

Em paciente com IC, essas alterações na função e morfologia vascular, são observadas quando se identifica o aumento na espessura da parede do vaso, maior tônus vasomotor em repouso e uma diminuição nas respostas vasodilatadoras dependentes e independentes do endotélio aos estímulos físico-químicos. Contudo, estudos apontam que há superprodução de EROS e uma redução na biodisponibilidade do NO para o coração[57, 59, 60].

Enfim, um conjunto de agressões químicas, mecânicas e metabólicas sobre o vaso arterial podem levar à disfunção endotelial. A resposta vascular a estes agentes agressores envolve a interação de fatores imunológicos tais como; monócitos, linfócitos T, plaquetas e células musculares lisas dos vasos, disparando uma série de eventos que culminam com a formação da placa aterosclerótica [61].

2.3 Padrão de fluxo sanguíneo e seu distúrbio.

O fluxo sanguíneo em cada ciclo cardíaco é trifásico e caracterizado por um componente anterógrado maior (fluxo unidirecional) durante a sístole e um componente retrógrado menor, no início da diástole, seguido-se a uma fase anterógrada, do meio até o final da diástole (Figura 1) [62]. A relação entre fluxo anterógrado e retrógrado (fluxo bidirecional) denomina-se fluxo oscilatório[26, 33].

Figura 1. Padrão de fluxo sanguíneo arterial em condição fisiológica.

O aumento permanente do fluxo retrógrado e oscilatório paralelamente com diminuição do fluxo anterógrado e médio, denomina-se como distúrbio no padrão de

fluxo sanguíneo[10]. A referida condição está diretamente associada com o surgimento e o desenvolvimento de placas ateroscleróticas. Essa condição é frequentemente encontrada em artérias periféricas de condução que apresentam bifurcações e curvaturas, e que então, ficam mais suscetíveis à formação de aterosclerose[10]. Por outro lado, em regiões expostas ao fluxo laminar, predominantemente anterógrado, são mais protegidas do processo aterogênico[63].

De fato, estudos in vitro, demonstraram a associação entre distúrbio no padrão de fluxo e maior dano vascular. Nesses estudos, ficou evidenciado o papel inflamatório desencadeado pelo distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial, que pode levar à aterosclerose, por meio do aumento da expressão de ET-1, de moléculas de adesão inter-celular 1 (VCAM-1) e moléculas de adesão intracelular (ICAM-1), utilizando-se a cultura de células e de artérias de perfusão isoladas submetidas ao estresse de fluxo não laminar. Adicionalmente, o distúrbio de fluxo ocasiona uma diminuição na liberação de superóxido desmutase (SOD) e aumenta a expressão de enzimas produtoras de espécies reativas de oxigênio (EROS) tal como, a “*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase*” (NADPH oxidase). Da mesma forma, que diminui a expressão da eNOS (Figura 1). Em conjunto, o fluxo retrógrado e oscilatório aumentam a expressão de genes pró-aterogênicos e reduzem a expressão de genes anti-aterogênicos[63-65].

Na última década, essas respostas vasculares atípicas tem gerado interesse para a investigação científica em humanos. *Thijssen et al*, conduziram o primeiro estudo na literatura que investigou o efeito do distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo sobre a função endotelial. Os autores induziram um aumento no SR retrógrado após oclusão parcial da circulação do antebraço por 30 min em indivíduos SD. A oclusão foi induzida por meio da insuflação de um manguito de pressão arterial posicionada no antebraço, até 75 mmHg. Os autores verificaram uma redução significativa da função endotélio-dependente após esta manobra para indução de distúrbio no padrão de fluxo

sanguíneo [26].

Adicionalmente, essa resposta ficou mais evidente, quando se investigou o padrão de fluxo em indivíduos idosos saudáveis, os quais apresentaram um maior fluxo retrógrado, com baixo fluxo médio na artéria femoral, quando comparados a adultos jovens, evidenciando que o envelhecimento influencia na normalidade do fluxo laminar[66].

Por outro lado, os mecanismos associados as alterações no padrão de fluxo sanguíneo não estão totalmente elucidados. Dessa forma, a elevação da atividade simpática periférica, bem como o desequilíbrio da função endotelial parecem ser fatores importantes que contribuem para desencadear esse fenômeno [67, 68]. *Padilla et al.* demonstraram que aumento agudo na atividade nervosa simpática periférica, ocasionava um aumento no fluxo retrógrado e no fluxo oscilatório, avaliado na artéria braquial de indivíduos jovens saudáveis[67].

Corroborando com esses achados, mais recentemente, estudo conduzido por nosso grupo, demonstrou que a hiperativação do sistema nervoso simpático periférico, evidenciado em jovens usuários de esteroides anabolizantes, foi associado a um aumento no fluxo retrógrado e oscilatório, na artéria braquial desses indivíduos[68].

Outros grupos, também demonstraram que nessa condição, de alterações do fluxo sanguíneo, pode ocorrer uma redução na biodisponibilidade de NO, alterando o balanço vasomotor e intensificando o fluxo turbilhonar[66, 69].

Em pacientes com IC é bem descrito na literatura a presença de disfunção neurovascular, caracterizada pelo aumento progressivo da atividade nervosa simpática periférica e cardíaca, bem como, pela redução da função vascular endotélio-dependente[9, 70, 71]. Apesar desse fato ser bem conhecido, esses pacientes possivelmente apresentam distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo, tanto em repouso quanto durante manobra que induz alteração no padrão de fluxo sanguíneo, em

comparação a indivíduos saudáveis. Porém, até o presente momento essas respostas não foram descritas.

2.4 Micropartículas Endoteliais

Eventos pró-inflamatórios, dentre eles, o estresse da parede vascular, momento-a-momento, desencadeiam o processo de ativação da célula endotelial, que por sua vez, está associada com a perda de moléculas de superfície, aumento na expressão de componentes pró-trombóticos[72] ou ainda, no aumento da ligação de cofatores de coagulação[73, 74], tal como o fator tecidual, constitutivamente presente quando há lesão endotelial, ou por fragmentos de leucócitos e macrófagos livres na circulação que prejudicam a função vasodilatadora. As células endoteliais quando ativadas, caracterizam-se por lançar fragmentos de sua membrana plasmática para o espaço extracelular[75]. Esses fragmentos de membrana, de leucócitos, células endoteliais e plaquetas, são lançados no espaço intravascular e são denominados de “micropartículas” (Figura 2).

Essas micropartículas são definidas como uma população de vesículas originárias de diferentes tipos celulares, e possuem em sua composição, proteínas, ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e lipoproteínas[75]. Os tipos celulares mais conhecidos, se originam de células plaquetárias, endoteliais, eritrócitos, oligodendrócitos, dentre outras. As MPEs, são micropartículas derivadas do endotélio e são reconhecidas como um marcador independente de disfunção endotelial, pois refletem alterações da vasomotricidade que estão envolvidas no processo de desenvolvimento de doença cardiovascular, metabólica e inflamatória [28, 30, 76]

As MPEs são heterogêneas em tamanho (0,1-1 μ m), além de serem pequenas vesículas de membrana que são liberadas pelo endotélio como resultado de sua ativação, lesão ou apoptose de células endoteliais e, a maior liberação de MPEs no

espaço intravascular trazem significativa informação sobre o endotélio, mais especificamente sobre a condição homeostática de suas células, bem como, da função vascular. A presença de MPEs na corrente sanguínea foram descritas pela primeira vez em humanos em 1999[75] e as evidências sugeriram que as MPEs refletem um equilíbrio entre estimulação celular, proliferação e apoptose celular.

Figura 2. Representação de possíveis precusores envolvidos na produção e liberação de MPEs, e patogênese da disfunção endotelial. LPS = Lipopolissacarídeo; LDL = Lipoproteína de baixa densidade; NO = Óxido nítrico. Adaptado de Boulanger et al./Hypertension (2006)[77].

Essas respostas são reguladas positivamente através de estímulos inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral α ($TNF-\alpha$), quimiocinas e fatores quimiotáticos mediados pela ativação do fator nuclear kappa-B ($NF-\kappa B$). A produção de micropartículas ocorre por diversos processos, como a vesiculação da membrana celular, que pode estar associada aos níveis de estresse oxidativo. O mecanismo de vesiculação é considerado um importante e primordial processo indicativo de crescimento, ativação e proteção celular[78].

A camada externa da membrana plasmática das MPEs é composta de fosfatidilcolinas e esfingomielinas, por outro lado, a camada interna tem em sua composição fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina. Durante o processo de apoptose

endotelial, as concentrações de cálcio se elevam rapidamente por meio do retículo sarcoplasmático levando a membrana a se manter em repouso. Consequentemente, a fosfatidilserina, que tem função pró-coagulante, fica exposta, sugerindo e indicando que houve um aumento na liberação de MPEs e que estão diretamente relacionadas com a formação da placa de ateroma e trombogênese, influenciando, ainda mais, na piora do processo inflamatório, dano vascular e angiogênese[79].

A diferenciação entre as origens das micropartículas circulantes se dá por meio da caracterização de seus marcadores de superfície, dessa forma, micropartículas de diversas origens celulares apresentam características fenotípicas diferentes entre si. As MPEs são identificadas pela presença de diversos marcadores tais como; fosfatidilserina (marcado pela Anexina V), CD54 (molécula de adesão intracelular; ICAM-1), CD62E (E-selectina), CD144 (VE-caderina) e CD31 (molécula de adesão celular endotelial plaquetária; PECAM)[32]. A variabilidade dos marcadores de superfície, entretanto, parece estar relacionada ao tipo de estímulo para formação e liberação das MPEs. Adicionalmente, em se tratando de leitura e quantificação é bem utilizado o marcador plaquetário de CD42b, pois ele auxilia a detecção de MPEs de uma forma negativa, ou seja, considera-se como MPEs todos fragmentos de célula que ele não conseguir marcar [33, 80].

Estudos “*in vivo*” e em “*ex vivo*” mostraram que as MPEs originadas a partir de estímulos apoptóticos são mais propensas a expressar o CD31 que é um marcador celular endotelial inespecífico utilizado na análise metodológica, outrossim, as MPEs liberadas a partir da ativação endotelial expressam mais o fenótipo do CD62E, marcador específico de células endoteliais[30, 80].

Evidências da literatura sugerem que em pacientes com IC, as MPEs podem ter um valor prognóstico, haja vista que há a presença de disfunção endotelial nesses pacientes. De fato, Berezin A.E. *et al.* mostraram que elevados níveis de MPEs podem

predizer um maior risco de ocorrer eventos cardiovasculares em pacientes com IC crônica[28]. Adicionalmente, evidências apontam que a elevação de MPEs são primordiais na fisiopatogenia da IC[29].

Considerando os estudos citados e a importância das MPEs na estrutura e função vascular, em humanos, poucos estudos demonstraram a relação entre os níveis sanguíneos de MPEs e a presença de distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial.

Nesse sentido, Jenkins *et al.* destacam-se por demonstrar após indução de distúrbio no padrão de fluxo na artéria braquial (braço experimental) por 20 minutos em indivíduos jovens e sem doenças cardiovasculares, um aumento no fluxo retrógrado e na produção de MPEs na circulação, enquanto que no braço contralateral, utilizado como controle, não houve modificação no padrão de fluxo e no nível de micropartículas, durante todo o momento do experimento[33]. Assim, o resultado desse estudo evidencia claramente, o impacto deletério do distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial sobre o endotélio vascular.

Portanto, as MPEs são consideradas um marcador biológico importante para o diagnóstico de disfunção endotelial, atribuída a redução da biodisponibilidade de NO, ativação de fatores inflamatórios e pró-coagulantes, desencadeando a apoptose e estimulando fatores angiogênicos[78]. Nesse contexto, as MPEs podem ter importante valor na injúria às células vasculares e na promoção do processo aterosclerótico e trombogênico, principalmente em situações de doença cardiovascular e na presença de ativação crônica do sistema nervoso simpático, como no caso da insuficiência cardíaca.

2 Objetivos

2.1 Testar as hipóteses:

1 - Pacientes com IC em comparação a indivíduos SD apresentam maior SR retrógrado e SR oscilatório na artéria braquial em repouso;

2 - Pacientes com IC em comparação a indivíduos SD apresentam reduzida função endotélio-dependente e elevados níveis de MPEs na circulação em repouso;

3 - Aumento do SR retrógrado na artéria braquial, induzido de forma “exógena” via manobra fisiológica, provoca maior liberação de MPEs em pacientes com IC em comparação a indivíduos SD e;

4 - Aumento do SR retrógrado provoca maior redução na função endotélio-dependente em pacientes com IC.

3 Materiais e Métodos

3.1 Aprovação Ética

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [(SDC – 4374/16/040) e (CAEE 57991116.4.0000.0068)]. Todos os participantes foram devidamente informados e esclarecidos quanto aos procedimentos a serem realizados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Amostra do Estudo

Trinta e dois voluntários (18 pacientes com IC e 14 controles SD pareados por idade) foram incluídos no estudo. Todos os pacientes estavam em uso de medicações e IC estável por mais de 3 meses, FEVE $\leq 40\%$, classe funcional II-III, *New York Heart Association*, terapia médica ótima e consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) ≤ 20 mL kg⁻¹ por minuto. Os critérios de exclusão foram: infarto do miocárdio a pelo menos 3 meses, angina instável, IC aguda, marca-passo, doença pulmonar, doença renal crônica, neuropatia periférica, história de acidente vascular cerebral, hipo/hipertireoidismo não tratado ou índice de massa corporal (IMC) > 30 kg/m². A triagem para o estudo consistiu em um questionário com histórico médico completo, seguido de exame físico, que incluiu análise bioquímica do sangue, pressão arterial de repouso (esfigmomanometria), eletrocardiograma de repouso, antropometria (peso e altura), exame de função cardíaca e teste cardiopulmonar.

3.3 Desenho Experimental

O protocolo do estudo foi realizado em duas sessões, experimental e controle

(Figura 3, Painel A). A ordem de realização dessas sessões foi randomizada. Todas as sessões foram realizadas no período da tarde e com intervalo de até 7 dias. Antes de cada visita, os indivíduos absteram-se de álcool e cafeína por 24 horas e de atividades físicas intensas por 48 horas. Todos os pacientes foram instruídos a continuar com seus medicamentos durante o estudo, exceto diuréticos por razões práticas, antes de todas as medições.

Na sessão experimental, os sujeitos foram posicionados em decúbito dorsal, seguidos de um período de repouso de 10 min. A DMF da artéria braquial foi realizada no braço direito. Depois disso, um cateter intravenoso foi colocado na veia braquial do mesmo braço e amostras de sangue foram coletadas para avaliar as MPEs. Dois manguitos pneumáticos foram colocados no braço direito por 30 min, um manguito no antebraço, inflado a 75 mmHg para produzir distúrbio de fluxo sanguíneo e um manguito proximal posicionado a 3 cm distal da axila, inflado a 40 mmHg para oclusão venosa parcial do fluxo do braço, facilitando assim o aprisionamento de MPEs que seriam liberadas durante o experimento (Figura 3, Painel B). As sessões foram realizadas sempre entre o 1º e 5º dia do ciclo menstrual das mulheres participantes.

Amostras de sangue e o padrão de fluxo sanguíneo foram avaliados em três momentos, 0 (antes da insuflação dos manguitos), 15 e 30 min (durante a insuflação dos manguitos). Finalmente, após um intervalo de 10 min, a DMF foi realizada novamente. A sessão controle consistiu no mesmo protocolo; no entanto, os manguitos não foram inflados.

Figura 3. A) Protocolo experimental e B) Setup experimental do estudo.

3.4 Medidas e Procedimentos

3.4.1 Avaliação da Função Cardíaca

A FE ventricular esquerda (FEVE) foi determinada pela ecocardiografia bidimensional pelo método Simpson (Figura 4). Todos os parâmetros, FEVE, diâmetro diastólico final do VE (DDVE), diâmetro sistólico final do VE (DSVE), volume sistólico final do VE (VSVE) e volume diastólico final do VE (VDVE) foram avaliados por ecocardiografista experiente.

Figura 4. Avaliação da função cardíaca, através do exame de ecocardiografia.

3.4.2 Avaliação da capacidade física

A capacidade funcional dos pacientes foi avaliada através do teste cardiopulmonar em exercício, utilizando o protocolo de rampa, com incremento de 5 a 15 W por minuto, com base no estado clínico do paciente (Figura 5). O teste foi realizado em cicloergômetro para membros inferiores (Ergoline – Via Sprint 150 P). Os pacientes foram orientados a pedalar numa velocidade de 60 a 70 rpm. Durante o teste, a Frequência Cardíaca (FC) foi monitorada continuamente por eletrocardiograma (ECG) (Micromed – Cardio PC 13) e as variáveis ventilatórias e metabólicas, produção de dióxido de carbono (VCO_2) e consumo de oxigênio (VO_2), foram avaliadas respiração-a-respiração pelo analisador metabólico (SensorMedics – VmaxAnalyzer Assembly, Encore 29S). O VO_2 pico foi utilizado como indicador da capacidade funcional dos pacientes.

Figura 5. Avaliação da capacidade funcional via teste ergoespirométrico.

3.4.3 Avaliação da Função Endotelial

A função vascular endotélio-dependente da artéria braquial foi avaliada por ultrassonografia, utilizando a técnica de dilatação mediada pelo fluxo (DMF) (Figura 6). Essa avaliação foi realizada com os pacientes na posição supina, braço abduzido a 80° em relação ao tronco e antebraço em pronação, semipronação ou supinação. A posição do antebraço foi escolhida de acordo com a qualidade da imagem. Um manguito pneumático de rápida insuflação/desinsuflação (E-20 Rapid Cuff Inflator, D.E. Hokanson) foi posicionado no antebraço, imediatamente após o processo olecraniano. As imagens da artéria braquial foram obtidas a partir do terço distal do braço (2 - 12 cm acima da fossa cubital) usando um transdutor linear multifrequencial, acoplado ao equipamento de ultrassom de alta resolução (Vivid E9, General Electric, Horten, Norway). As imagens de diâmetro e velocidade de passagem do sangue foram obtidas no modo duplex, à frequência de 12 e 6 MHz, respectivamente. A velocidade do sangue foi obtida com ângulo de inclinação $\geq 60^\circ$ e volume de amostra localizado no centro do vaso. O diâmetro e a velocidade de repouso foram coletados por 1 min. Em seguida, o manguito do antebraço foi insuflado a 200 mmHg por 5 min. Finalmente,

após este período, o manguito foi desinsuflado e as imagens de diâmetro e velocidade foram mensuradas continuamente durante 3 min.

Figura 6. Avaliação da função endotelial através da técnica de DMF.

3.4.4 Avaliação do Padrão de Fluxo Sanguíneo

O diâmetro e velocidade de passagem de sangue da artéria braquial foram avaliados durante todo protocolo experimental, através da técnica de ultrassonografia vascular. Essa avaliação foi realizada com os pacientes na posição supina, braço abduzido a aproximadamente 80° em relação ao tronco e antebraço em supinação. As imagens de diâmetro e velocidade de passagem do sangue foram avaliadas no modo duplex, via transdutor linear multifrequencial operando a uma frequência de 6 a 12 MHz. Este transdutor esteve conectado ao equipamento de ultrassom de alta resolução (Vivid E9, General Electric, Horten, Norway). Um sistema de ECG de três derivações acoplado a este equipamento foi utilizado para obter as fases do ciclo cardíaco. As imagens de velocidade foram obtidas com um ângulo de insonação igual a 60° e

volume de amostra localizado no centro do vaso. A localização do transdutor foi marcada na pele de cada paciente para que permitisse a reprodução da mesma posição durante todo período do estudo.

3.4.5 Intervenção para Induzir Distúrbio de Fluxo Sanguíneo

Após a primeira coleta de sangue para dosagem de MPEs, foi realizada uma intervenção de 30 minutos para induzir fluxo alterado ou manter o fluxo normal (controle). Para produzir fluxo turbilhonar, um manguito foi colocado ao redor do antebraço direito e inflado a 75 mm Hg e um segundo manguito proximal foi posicionado a 3 cm distal da axila e insuflado a 40 mm Hg para obstruir parcialmente o fluxo venoso do braço[26]. Trabalhos anteriores mostraram que esta manobra é extremamente eficiente para provocar alteração de fluxo nas artérias periféricas de condução[25, 26, 66]. Para fluxo normal, o manguito foi colocado no mesmo braço, mas não foi inflado. As médias de SR e o padrão de SR (anterógrado, retrógrado e oscilatório) foram registrados por 60 seg em três momentos diferentes (antes da insuflação dos manguitos), 15 e 30 min (durante a insuflação dos manguitos).

3.4.6 Avaliação e leitura de Micropartículas Endoteliais

As MPEs foram quantificadas, através da técnica de citometria de fluxo (figura 7) [33]. Inicialmente, foram coletados 9mL de sangue periférico em tubos de citrato, e em seguida, armazenados no freezer -80°C. Esta preparação, consistiu na centrifugação do sangue total a 2500g (3500 rpm), por 15 minutos e temperatura 20°C. Logo após, os 2/3 superiores de plasma (aproximadamente 1,5 ml) foram coletados e adicionados a um tubo falcon de 15 mL. Em seguida, ocorreu uma segunda centrifugação, idêntica a centrifugação anterior. O passo seguinte foi coletar os 2/3 superiores de plasma

(aproximadamente 1,5 mL). Depois disso, alíquotas de 500 µL do plasma pobre em plaquetas foram colocadas em 4 microtubos de 2 mL. Estes foram colocados imediatamente no nitrogênio líquido. Por fim, os microtubos foram retirados do nitrogênio e transferidos para o freezer a uma temperatura de -80°C até as análises.

Leitura e análise de MPE: Inicialmente, os tubos com alíquotas de 500 µL de plasma foram retirados do freezer -80°C e descongelados em temperatura ambiente. O plasma pobre em plaquetas contendo as MPE foi incubado com 8 µL de CD31-FITC (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, EUA), 8 µL de CD42b- APC (BD Biosciences; Franklin Lakes, NJ, EUA), por 30 minutos, no escuro a 4°C. Antes da aquisição às amostras no citômetro, cada amostra foi lavada com 900 µL de solução tampão fosfato-salino (PBS). Uma vez que o CD42b é um marcador específico de plaquetas, este pode ser utilizado para excluir as mesmas da análise. Foram utilizadas microesferas de látex de 1.1µm (Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) para determinação do tamanho dos eventos analisados. Dessa forma, apenas eventos inferiores a 1.1 µm foram analisados como sendo micropartículas. Foram utilizadas beads de poliestireno para a definição de tamanho das MPE (<1,0µm).

Figura 7. Aparelho citometro de fluxo da marca BD FACSVerse utilizado para leitura de MPEs.

Foram consideradas endoteliais as micropartículas negativas para CD42b e positivas para CD31. Além disso, tubos com “*Trucount beads*” (*recipiente*) foram utilizados para obtenção do valor absoluto das MPEs (MPE/ μ L), utilizando a seguinte fórmula: [(número de eventos da região contendo MP / número absoluto de *beads trucount*) $\times$ (número total de *beads trucount* por teste / volume total de amostra)].

3.4.7 Análise de Dados Vasculares e Hemodinâmicos

O diâmetro da artéria braquial para caracterização do padrão de fluxo em repouso, durante a manobra de distúrbio no padrão de fluxo e função endotélio-dependente, foram avaliados *off-line*, via *software* detector de borda, *Brachial analyzer* (Medical Imaging Applications, USA), conforme recomendação da literatura[81]. A velocidade de passagem do sangue foi avaliada pelo *software* de detecção de velocidade da própria máquina de ultrassom (Vivid E9, General Electric, Horten, Norway). A partir dos dados de diâmetro e velocidade foram calculados o fluxo sanguíneo e o SR (anterógrado, retrógrado, médio) e o índice oscilatório. O fluxo sanguíneo foi calculado pelo produto entre velocidade do sangue e área seccional do vaso ($\pi.r^2$) (Fluxo = velocidade $\times \pi.r^2$). A condutância vascular (CV) foi calculada pela razão entre fluxo sanguíneo e PAM multiplicado por 100 [CV = (Fluxo/PAM) $\times$ 100]. O SR foi estimado pela razão entre velocidade e diâmetro do vaso sanguíneo multiplicado pelo algarismo 4 [SR = (velocidade/diâmetro) $\times$ 4][66, 82-84]. Para o cálculo do fluxo e SR anterógrado e retrógrado, as velocidades anterógrada e retrógrada foram utilizadas. O SR oscilatório, uma variável que pode ser utilizada como um indicador da magnitude da oscilação foi calculada pela seguinte fórmula: [SR retrógrado/(SR anterógrado + SR retrógrado)]. Note que valores para oscilação podem ser de 0 a 0,5 em que o valor de 0 corresponde a SR laminar (unidirecional) durante o ciclo cardíaco, enquanto que 0,5 representa um índice de pura oscilação. O SR oscilatório foi expresso em unidades

arbitrárias (u.u.).

Para diminuir a possibilidade de influência do dia, da ansiedade ou de alguma outra variável que pudesse interferir nas repostas de SR de repouso dos grupos IC e SD na hipótese 1 do estudo, essas variáveis serão apresentadas como a média dos valores obtidos em dois dias diferentes.

A função endotélio-dependente foi calculada pelo delta absoluto (diâmetro de pico – diâmetro de rep) e delta percentual $[(\text{diâmetro de pico} - \text{diâmetro de rep}) / \text{diâmetro de rep}] * 100$. O SR da DMF foi calculado através da área sob a curva (AUC) até o pico de vasodilatação (pico de diâmetro), após liberação do manguito. Para diminuir possíveis influências da magnitude de aumento do SR na resposta endotelial durante a técnica de DMF, a função endotelial foi normalizada pelo SRAUC, a partir da razão entre DMF (%) / SRAUC. O coeficiente de correlação intraclasse foi de 0,91 ($p < 0,05$) e o coeficiente de variabilidade foi de 5,5%. As respostas vasculares e de MPEs das sessões experimentais foram apresentadas em repouso e manobra (o pico entre os pontos de tempo 15 e 30 min). O delta foi calculado entre a variável de pico - variável de repouso.

3.5 Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição dos dados e o teste de Mauchly para verificar a esfericidade. Os pressupostos de normalidade e esfericidade não foram ignorados. Teste t não pareado foi utilizado para comparar as variáveis de repouso entre os grupos. ANOVA de dois caminhos foi usada para comparar as MPEs, função endotelial e reposta de SR entre a sessão experimental e sessão controle. O teste post hoc de Fisher (LSD) foi aplicado quando valores

significativos de P foram encontrados. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ou percentual. A significância foi estabelecida em $P \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software STATISTICA 10.0. Coeficiente de correlação intraclassa foi utilizado para testar a reprodutibilidade das medidas de SR e DFM. Uma probabilidade menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$) foi considerada estatisticamente significativa em análises bicaudais.

4 Resultados

Na figura 9 é apresentado o fluxograma de triagem de pacientes. Foram triados para o estudo 29 pacientes com IC e 19 indivíduos SD. Todos os participantes foram submetidos às avaliações de admissão ao estudo. Após as avaliações, 18 pacientes foram incluídos no grupo IC e 14 indivíduos no grupo SD. No grupo IC, 11 pacientes foram excluídos: 8 pacientes por apresentarem VO₂ pico acima de 20 ml/kg/min, 3 por FEVE (%) > 40. No grupo SD, 5 indivíduos foram excluídos: 4 por desistência e 1 por hipercolesterolemia

Figura 8. Fluxograma de inclusão dos participantes no estudo. IC = grupo insuficiência cardíaca e SD = grupo sedentário.

4.1 Características Físicas e Clínicas

Ambos os grupos foram devidamente pareados para idade, sexo e outras características físicas (Tabela 1). Pacientes com IC apresentaram menor colesterol LDL, VO_2 e FEVE do que indivíduos SD ($p < 0,05$). Além disso, pacientes com IC apresentaram maior glicemia, DDVE e DSVE em comparação com indivíduos SD ($p < 0,05$). Todos os pacientes estavam clinicamente estáveis e euvolêmicos, com base na pressão venosa jugular normal, ausência de ortopneia, ganho de peso corporal, congestão pulmonar, hepatomegalia ou edema de membros inferiores. Os indivíduos SD não utilizavam nenhum tipo de medicamento e não eram tabagistas.

Tabela 1- Características físicas e clínicas do grupo de pacientes com insuficiência cardíaca e grupo de indivíduos saudáveis

Variáveis	IC		SD		Valor de <i>P</i>
<i>N</i>	18		14		
Idade (anos)	54,72	± 1,72	49,00	± 2,53	0,07
Gênero (M/F)	16/2		12/2		0,53
IMC (Kg/m²)	25,50	± 0,94	30,85	± 5,44	0,28
VO ₂ pico, (ml/Kg/min)	15,90	± 0,84	37,78	± 5,08	<0,0001
Colesterol TOTAL (mg/dl)	168,27	± 9,50	196,40	± 14,36	0,10
Colesterol HDL (mg/dl)	47,05	± 2,90	50,73	± 3,77	0,44
Colesterol LDL (mg/dl)	93,27	± 8,89	129,10	± 11,78	0,02
Glicemia (mg/dl)	124,30	± 11,23	93,72	± 2,14	0,04
Triglicerídes (mg/dl)	131,61	± 13,30	102,40	± 13,35	0,15
Classe Funcional (II/III)	7/11		--		
FEVE (%)	26,05	± 1,36	65,00	± 0,98	<0,0001
DDVE (mm)	69,72	± 1,79	47,21	± 0,63	<0,0001
DSVE (mm)	62,61	± 2,06	30,57	± 0,65	<0,0001
Etiologia da IC, n (%)					
Idiopática	10		--		
Isquêmica	35		--		
Hipertensiva	15		--		
Chagásica	30		--		
Alcoólica	10		--		
Medicações, n (%)					
Beta-Bloqueador	100		--		
IECA/BRA	95		--		
Espironolactona	90		--		
Diuréticos	90		--		

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. IMC = Índice de massa corporal; HDL = lipoproteína de alta densidade; LDL = lipoproteína de baixa densidade; NYHA = *New York Heart Association*.; FEVE = Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DDVE = Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE = Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. IC = Insuficiência Cardíaca; SD = Saudáveis

4.2 Padrão de fluxo sanguíneo, DMF e MPEs

Na tabela 2 são apresentados os dados de padrão de fluxo sanguíneo, DMF, MPEs e hemodinâmicos em repouso. Pode-se observar que pacientes com IC

comparados a indivíduos SD não apresentaram diferenças significativas em relação ao diâmetro, velocidade anterógrada, velocidade retrógrada, velocidade média, SR anterógrada, SR retrógrada, SR médio e índice de SR oscilatório (para todas as variáveis, $p > 0,05$). Além disso, a DMF da artéria braquial foi menor em pacientes com IC em comparação com indivíduos SD ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre os grupos para MPEs ($p > 0,05$). Os grupos não apresentaram diferenças quanto às variáveis hemodinâmicas de PAS, PAD, PAM, FC e CV.

Tabela 2. Padrão de fluxo sanguíneo, função endotelial, e micropartículas endoteliais de repouso

Variáveis	IC (n=18)			SD (n=14)		P valor
Diametro (cm)	4,70	±	0,02	4,10	± 0,03	0,28
Vel. Anterógrada (cm/s)	8,08	±	0,54	7,82	± 1,23	0,61
Vel. Retrógrado (cm/s)	-4,02	±	0,66	-2,50	± 0,53	0,12
Vel Média (s ⁻¹)	4,06	±	0,60	5,15	± 1,34	0,20
SR Anterógrado (s ⁻¹)	71,51	±	5,12	80,26	± 7,53	0,34
SR Retrógrado (s ⁻¹)	-33,40	±	5,44	-27,90	± 3,96	0,45
SR Médio (s ⁻¹)	35,92	±	4,96	55,49	± 14,13	0,17
Índice SR Oscilatório (uu)	0,29		0,03	0,27	0,03	0,61
DMF%	3,24	±	0,27	5,01	± 0,41	0,001
MPEs (MP/UL plasma)	236,09	±	33,45	201,09	± 36,79	0,52
PAS (mm Hg)	120,71	±	10,15	122,70	± 9,50	0,35
PAD (mm Hg)	71,49	±	9,12	73,24	± 11,20	0,28
PAM (mm Hg)	83,25	±	10,40	90,01	± 6,93	0,15
FC (bpm)	70,12	±	15,03	63,80	± 5,28	0,40
CV (mL.min mm Hg)	110,02	±	30,08	128,70	± 24,27	0,54

Dados apresentados como média ± desvio padrão. Vel anterógrada = velocidade anterógrada; Vel retrógrada = velocidade retrógrada; Velocidade média = velocidade média; SR anterógrado = shear rate anterógrado; SR retrógrado = shear rate retrógrado; SR médio = shear rate médio; SR Oscilatório = shear rate oscilatório; DMF = dilatação mediada por fluxo; e MPEs = micropartículas endoteliais; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca; CV = condutância vascular.

4.3 Distúrbio de Fluxo Sanguíneo

Como esperado, a insuflação do manguito no antebraço aumentou significativamente o SR retrógrado e o índice de SR oscilatório durante a sessão experimental em pacientes com IC e indivíduos SD (Tabela 3). É importante notar que essas respostas foram semelhantes entre os grupos. SR retrógrado e oscilatório não apresentaram mudanças durante a sessão controle em ambos os grupos (Tabela 3) e (Figura: 10C e 10D). Surpreendentemente, SR anterógrado aumentou durante a sessão experimental em pacientes com IC e indivíduos SD (Tabela 3)]. Contudo, este aumento não foi diferente entre os grupos (Figura 10A)]. A comparação entre as sessões e os grupos mostrou que a média das SR não mudou (Tabela 3) e (Figura 10C).

Tabela 3. Padrões de fluxo sanguíneo durante distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos saudáveis.

Variables	IC (n=18)						SD (n=14)					
	0			Pico			0			Pico		
Diamêtro (mm)												
SE	4,67	±	0,19	4,77	±	0,20	4,40	±	0,13	4,41	±	0,13
SC	4,68	±	0,18	4,69	±	0,19	4,42	±	0,12	4,40	±	0,13
Vel. Anterógrada (cm/s)												
SE	8,08	±	0,50	14,00	±	1,50*†	8,78	±	1,41	15,20	±	1,40*†
SC	8,29	±	0,61	8,56	±	0,72	8,73	±	0,68	8,87	±	0,70
Vel. Retrógrada (cm/s)												
SE	-4,01	±	0,66	-9,69	±	0,93*†	-2,68	±	0,38	-10,44	±	0,97*†
SC	-3,63	±	0,61	-3,51	±	0,58	-3,29	±	0,49	-2,83	±	0,49
Vel. Média (cm/s)												
SE	4,06	±	0,55	3,54	±	0,42	6,09	±	1,62	3,39	±	0,59
SC	4,66	±	0,57	4,55	±	0,47	5,44	±	0,9	5,56	±	1,10
SR Anterógrado (s ⁻¹)												
SE	71,01	±	5,62	121,43	±	11,15*†	80,75	±	12,91	139,92	±	11,08*†
SC	72,00	±	5,59	74,84	±	6,71	79,77	±	6,55	83,31	±	6,56
SR Retrógrado (s ⁻¹)												
SE	-35,09	±	5,93	-83,41	±	8,69*†	-25,26	±	3,96	-95,40	±	9,44*†
SC	-31,70	±	5,67	-30,82	±	6,50	-30,54	±	4,83	-26,45	±	4,81
SR Médio (s ⁻¹)												
SE	35,91	±	5,10	27,33	±	3,64	55,44	±	14,66	31,26	±	5,69
SC	40,30	±	4,74	39,51	±	4,15	49,29	±	8,25	44,65	±	9,29
Índice SR Oscilatório (uu)												
Exp	0,30	±	0,03	0,45	±	0,01*†	0,26	±	0,03	0,46	±	0,06*†
CTL	0,27	±	0,02	0,30	±	0,03	0,27	±	0,04	0,29	±	0,04

Dados apresentados como média ± desvio padrão. SE = Sessão experimental; SC = Sessão controle; Vel anterógrada = velocidade anterógrada; Vel retrógrada = velocidade retrógrada; Vel. média = velocidade média; SR anterógrado = taxa de cisalhamento anterógrado; SR retrógrado = taxa de cisalhamento retrógrado; média SR = taxa média de cisalhamento; e Índice de SR Oscilatório = índice de taxa de cisalhamento oscilatório. p <0,05 vs. Repouso (REP) de SE e † vs. pós de SC.

Figura 9. A - D. Shear rate anterógrado (SR anterógrado, Painei A), retrógrado (SR retrógrado, Painei B), médio (SR médio, Painei C) e oscilatório (SR oscilatório, Painei D) durante a manobra para indução de SR retrógrado nos grupos insuficiência cardíaca (IC) e saudável (SD).

4.4 Respostas endoteliais ao distúrbio de fluxo sanguíneo

A fim de investigar se o distúrbio de fluxo sanguíneo induz dano endotelial, os níveis circulantes de MPEs foram medidos durante as sessões experimental e controle em ambos os grupos. MPEs aumentaram significativamente na sessão experimental

em pacientes com IC (Figura 9A)], enquanto que nos indivíduos SD não houve diferenças para essa variável (Figura 9B)]. Estes resultados foram claramente confirmados como delta. Adicionalmente, as MPEs foram maior na sessão experimental de pacientes com IC em comparação com a sessão experimental de indivíduos SD (Figura 10).

Figura 10. Micropartículas endoteliais (MPEs) em pacientes com insuficiência cardíaca (IC; Painel A) e indivíduos saudáveis (SD; Painel B) durante sessão experiemetal e sessão controle.

Figura 11. Delta de micropartículas endoteliais (MPEs) em pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos saudáveis durante sessão experiemetal e sessão controle.

4.5 Dilatação Mediada pelo Fluxo

Nossa análise revelou que a alteração no fluxo sanguíneo reduz similarmente a DMF (%) da artéria braquial em ambos os grupos. Porém, nenhuma alteração foi observada na DMF (%) na sessão controle (Figura 13 A-F). A análise delta mostrou que a magnitude da redução na DMF(%) induzida pelo distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo foi semelhante entre os grupos (Figura 14). O diâmetro arterial de repouso, SR AUC e tempo de pico não foram diferentes entre as sessões experimentais e controle, e entre os grupos (Tabela 4). Além disso, o distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo diminuiu a DMF (%) em ambos os grupos (Tabela 4). Nenhuma mudança foi observada nesta variável na sessão controle.

Figura 12. Dilatação mediada pelo fluxo (DMF) pré e pós manobra para induzir distúrbio no padrão de fluxo em pacientes insuficiência cardíaca (IC) e sujeitos saudáveis durante as sessões experimental e controle. Resposta individual de DMF durante a sessão controle em pacientes IC (Painel B) e indivíduos SD (Painel D). Resposta individual de DMF durante a sessão experimental em pacientes IC (Painel C) e indivíduos SD (Painel F).

Figura 13. Delta de dilatação mediada pelo fluxo (DMF) em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) e indivíduos saudáveis (SD) durante sessão experimental e sessão controle.

Tabela 4. Dilatação mediada pelo fluxo artéria braquial durante as sessões experimental e controle de pacientes com insuficiência cardíaca e indivíduos saudáveis.

Variáveis	IC (n=18)		SD (n=14)	
	Pre	Pos	Pre	Pos
Diâmetro Rep (mm)				
SE	4,71 ± 0,19	4,68 ± 0,19	4,37 ± 0,14	4,39 ± 0,12
SC	4,70 ± 0,18	4,68 ± 0,18	4,44 ± 0,13	4,45 ± 0,13
Diâmetro Pico (mm)				
SE	4,84 ± 0,20	4,76 ± 1,90	4,58 ± 0,14	4,51 ± 0,12
SC	4,84 ± 0,19	4,82 ± 0,19	4,68 ± 0,13	4,66 ± 0,13
DMF (mm)				
SE	0,16 ± 0,01	0,07 ± 0,04*†	0,20 ± 0,01	0,11 ± 0,01*†
SC	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,02
SR AUC10 ⁻⁵ , (s ⁻¹)				
SE	5,76 ± 0,65	7,64 ± 1,37	6,96 ± 0,99	7,37 ± 13,30
SC	5,89 ± 0,75	5,93 ± 0,74	6,83 ± 0,78	6,18 ± 10,92
Tempo de Pico (seg)				
SE	68,65 ± 12,55	89,61 ± 9,40	70,64 ± 9,46	80,07 ± 13,12
SC	79,83 ± 13,25	68,38 ± 9,86	53,14 ± 5,79	65,92 ± 11,55

Dados apresentados como media ± desvio padrão. SE = Sessão experimental; SC = Sessão controle; DMF = Dilatação mediada pelo fluxo. $p < 0.05$ vs. pre da SE em Insuficiência cardíaca (IC) ou Saudável (SD), e † vs. pós de SC em IC ou SD.

5 Discussão

O objetivo desse estudo foi investigar o impacto agudo do distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial sobre a liberação de MPEs circulantes, e sobre a DMF da artéria braquial em pacientes com IC e em indivíduos SD. O principal achado desse estudo mostra que a elevação aguda no SR retrógrado e oscilatório provoca um aumento nos níveis circulantes de MPEs em pacientes com IC, mas não em indivíduos SD. Além disso, foi observado que durante a elevação aguda no SR retrógrado e oscilatório, houve uma redução da DMF na artéria braquial em ambos os grupos. Apesar de não ter havido diferença entre os grupos, esse resultado revela pela primeira vez em pacientes com IC, o impacto do distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial na função endotelial.

Dessa forma, pode-se postular que o distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial está associado à disfunção endotelial[85, 86]. De fato, é de conhecimento na literatura que regiões arteriais expostas a alterações no fluxo sanguíneo arterial, como bifurcações e curvaturas, são extremamente vulneráveis ao desenvolvimento de aterosclerose, enquanto regiões expostas a SR laminar são protegidas[22, 85, 86]. Foi demonstrado em estudo anterior que idosos saudáveis apresentam uma resposta exacerbada de SR retrógrado e oscilatório em condição de repouso, na artéria braquial, quando comparados a indivíduos SD. Esse fenômeno pode ser explicado pelo aumento da atividade nervosa simpática[87] e redução da função endotelial[66] que ocorre naturalmente pelo processo de envelhecimento do sistema circulatório. Corroborando com esses achados, nosso grupo recentemente mostrou que o distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo na artéria braquial, em jovens usuários de esteroides anabolizantes está associado a um aumento da atividade nervosa simpática periférica quando comparado aos não usuários[68]. Por outro lado, a disfunção neurovascular é bem descrita na literatura como parte do processo fisiopatológico na progressão da IC[37].

Nós não encontramos diferença no padrão de fluxo sanguíneo entre pacientes com IC e indivíduos SD em repouso, todavia, uma possível explicação para esse achado, deve-se ao fato de que o nosso grupo de pacientes com IC encontravam-se com tratamento clínico otimizado e estáveis, (ver tabela 1). Dessa forma, é possível sugerir que esses pacientes, não apresentavam um grande aumento na atividade nervosa simpática periférica em repouso, e portanto, não tinham um desequilíbrio neurovascular pronunciado.

As MPEs são pequenas vesículas ($<1,0\ \mu\text{m}$) liberadas do endotélio para a circulação em resposta à ativação ou apoptose de células endoteliais [88]. Recentemente, as MPEs têm sido usadas como um marcador clínico de aumento de risco de doença cardiovascular, tanto local quanto sistêmico[89]. Elevados níveis de MPEs circulantes foram associados a pior prognóstico em pacientes com IC. Surpreendentemente, os resultados do presente estudo não mostraram diferenças nos níveis circulantes de MPEs em repouso entre pacientes com IC e indivíduos SD. Uma possível explicação pode estar associada ao uso da estatina, uma vez que grande parte dos pacientes com IC estavam sendo tratados com estatinas. Recentemente, foi demonstrado que o tratamento farmacológico com estatina melhora a função endotelial e reduz as MPEs na doença cardiovascular[90, 91].

No presente estudo, de forma inédita, induzimos o distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial em pacientes com IC, por meio da manobra de insuflação de um manguito localizado no antebraço a uma pressão de 75 mmHg, por 30 minutos. Essa manobra tem sido amplamente utilizada para alterar o padrão de SR nas artérias periféricas de condução[92-94]. Nossos resultados mostraram que a manobra em questão, provocou um aumento no SR retrógrado e oscilatório na artéria braquial em pacientes com IC e em indivíduos SD, de forma semelhante. Por outro lado, as MPEs

aumentaram de forma significativa apenas em pacientes com IC. Assim, essa resposta pode refletir uma suscetibilidade aumentada para provocar dano vascular e disfunção endotelial na IC, sugerindo que, apesar desses pacientes apresentarem uma redução na função endotelial, ainda assim, pode ser suscetível a uma deterioração vascular adicional.

Jenkins et al. conduziram o primeiro estudo que avaliou os efeitos do distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial sobre a liberação de MPEs, em humanos[33]. Nessa investigação, os autores mostraram que 20 min de elevação no SR oscilatório, claramente aumenta os níveis de MPEs na circulação do braço. Contrariamente, no presente estudo, nossos resultados não mostraram aumento dos níveis de MPEs em indivíduos SD. Uma possível explicação pode ser atribuída ao protocolo experimental. Enquanto o estudo do Jenkins induziu distúrbio no padrão de fluxo com um manguito inflado no punho a 200 mm Hg, nosso estudo usou um manguito no antebraço a 75 mmHg.

Sabe-se que pacientes com IC apresentam disfunção endotelial, e para melhor elucidação dos fenômenos descritos na literatura referente as alterações de fluxo laminar normal, este foi o primeiro estudo a testar os efeitos de elevações agudas no SR retrógrado e oscilatório em pacientes com IC. Como esperado, nossos dados mostraram que pacientes com IC, em comparação a indivíduos SD, apresentaram reduzida função endotélio dependente da artéria braquial em repouso. Quanto ao distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo, ficou evidente em nosso estudo que ocorre uma diminuição na DMF da artéria braquial em pacientes com IC, após elevações agudas de SR retrógrado e oscilatório, os quais não estão de acordo com os achados anteriores, onde se observou em indivíduos idosos uma maior redução na função endotelial. Provavelmente, esses resultados devem-se a presença de um platô na

elevação do SR retrógrado e oscilatório, para promover a redução da função endotelial, uma vez que em nosso estudo utilizamos um manguito insuflado a uma pressão de 75 mm Hg, diferente do estudo anterior em idosos, que usaram uma pressão menor de 60 mm Hg[25, 94].

6 Limitações

Esse estudo apresenta algumas limitações. Primeiro, o tamanho da amostra do nosso estudo foi relativamente modesta, mas os resultados foram consistentes, entre e dentro dos grupos de indivíduos. A nítida relação dose-resposta entre as variáveis, independentes e dependentes, fornecem evidências convincentes de que nossos resultados são robustos. Portanto, recrutar um número maior de sujeitos não teria mudado de maneira importante os achados do estudo. Segundo, nós não avaliamos a função independente do endotélio, por meio de um vasodilatador muscarínico, tal como a nitroglicerina, um doador exógeno de NO. Evidências anteriores mostraram que estímulos reflexos, como por exemplo, estresse mental e exercício físico, não alteram a função independente do endotélio[95, 96]. Dessa forma, o aumento agudo de SR retrógrado não deve prejudicar a função independente do endotélio em nossa casuística. Terceiro, avaliamos a DMF em artéria de membro superior, no caso a artéria braquial, que é um leito vascular resistente à aterosclerose [85, 86]. Assim, não podemos extrapolar esses resultados para as artérias do membro inferior, que são mais propensas à aterosclerose (por exemplo, artérias femoral e poplítea). Finalmente, a amostra do nosso estudo, em ambos os grupos, foi predominantemente composta por homens. Assim, não podemos extrapolar esses resultados para o gênero feminino. Estudos adicionais serão necessários para se avaliar o impacto do gênero nas respostas de distúrbio de fluxo, MPEs e DMF em pacientes com IC.

7 Conclusão

Em repouso, pacientes com IC em comparação a indivíduos SD apresentam reduzida função endotelial. Contudo, o SR retrógrado e SR oscilatório na artéria braquial, bem como, os níveis de MPEs na circulação, não foram diferentes entre os grupos.

O distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo arterial aumentou as MPEs e diminuiu a função endotelial em pacientes com IC. Por outro lado, nos indivíduos SD, o distúrbio no padrão de fluxo sanguíneo não provocou aumento em MPEs, mas, provocou redução da função endotelial. Esses dados sugerem que o endotélio vascular dos pacientes com IC, apresenta vulnerabilidade aos distúrbios no padrão de fluxo sanguíneo arterial.

8 Referências

---

1. Roger, V.L., *Epidemiology of heart failure*. Circ Res, 2013. **113**(6): p. 646-59.
2. Lymperopoulos, A., G. Rengo, and W.J. Koch, *Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy*. Circ Res, 2013. **113**(6): p. 739-53.
3. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2017. **135**(10): p. e146-e603.
4. Bocchi, E.A., et al., *[Updating of the Brazilian guideline for chronic heart failure - 2012]*. Arq Bras Cardiol, 2012. **98**(1 Suppl 1): p. 1-33.
5. Montera, M.W., et al., *Summary of the II Brazilian Guideline update on Acute Heart Failure 2009/2011*. Arq Bras Cardiol, 2012. **98**(5): p. 375-83.
6. Yang, O., J. Li, and J. Kong, *The Endothelium as a Target for the Treatment of Heart Failure*. Cell Biochem Biophys, 2015. **72**(3): p. 751-6.
7. Landmesser, U. and H. Drexler, *The clinical significance of endothelial dysfunction*. Curr Opin Cardiol, 2005. **20**(6): p. 547-51.
8. Berezin, A.E., et al., *The signature of circulating microparticles in heart failure patients with metabolic syndrome*. J Circ Biomark, 2016. **5**: p. 1849454416663659.
9. Custodis, F., et al., *Vascular pathophysiology in response to increased heart rate*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(24): p. 1973-83.
10. Cunningham, K.S. and A.I. Gotlieb, *The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis*. Lab Invest, 2005. **85**(1): p. 9-23.
11. Morgan, D.R., et al., *Impaired endothelium-dependent and -independent vasodilation in elderly patients with chronic heart failure*. Eur J Heart Fail, 2004. **6**(7): p. 901-8.
12. Linke, A., et al., *Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: systemic effects of lower-limb exercise training*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(2): p. 392-7.
13. Hambrecht, R., et al., *Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 706-13.
14. Marechaux, S., et al., *Vascular and Microvascular Endothelial Function in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction*. J Card Fail, 2016. **22**(1): p. 3-11.
15. Gronda, E., et al., *Chronic baroreflex activation effects on sympathetic nerve traffic, baroreflex function, and cardiac haemodynamics in heart failure: a proof-of-concept study*. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(9): p. 977-83.
16. Braga, A.M., et al., *[Predictive value of ventilatory and metabolic variables for risk of death in patients with cardiac failure]*. Arq Bras Cardiol, 2006. **86**(6): p. 451-8.
17. Barretto, A.C., et al., *Increased muscle sympathetic nerve activity predicts mortality in heart failure patients*. Int J Cardiol, 2009. **135**(3): p. 302-7.
18. Nazare Nunes Alves, M.J., et al., *Mechanisms of blunted muscle vasodilation during peripheral chemoreceptor stimulation in heart failure patients*. Hypertension, 2012. **60**(3): p. 669-76.
19. Di Vanna, A., et al., *Blunted muscle vasodilatation during chemoreceptor stimulation in patients with heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H846-52.
20. Engelke, K.A., et al., *Contribution of nitric oxide and prostaglandins to reactive hyperemia in human forearm*. J Appl Physiol (1985), 1996. **81**(4): p. 1807-14.
21. Vallance, P., J. Collier, and S. Moncada, *Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man*. Lancet, 1989. **2**(8670): p. 997-1000.
22. Chatzizisis, Y.S., et al., *Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(25): p. 2379-93.
23. Ade, C.J., et al., *Anterograde and retrograde blood velocity profiles in the intact human cardiovascular system*. Exp Physiol, 2012. **97**(7): p. 849-60.
24. Barak, O.F., et al., *Disturbed blood flow worsens endothelial dysfunction in moderate-severe chronic obstructive pulmonary disease*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 16929.
25. Schreuder, T.H., et al., *Impact of retrograde shear rate on brachial and superficial femoral artery flow-mediated dilation in older subjects*. Atherosclerosis, 2015. **241**(1): p. 199-204.
26. Thijssen, D.H., et al., *Retrograde flow and shear rate acutely impair endothelial function*

- in humans*. Hypertension, 2009. **53**(6): p. 986-92.
27. Totosy de Zepetnek, J.O., et al., *Impact of shear rate pattern on upper and lower limb conduit artery endothelial function in both spinal cord-injured and able-bodied men*. Exp Physiol, 2015. **100**(10): p. 1107-17.
  28. Berezin, A., et al., *Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases*. Clin Biochem, 2015. **48**(9): p. 562-8.
  29. Berezin, A.E., et al., *The predictive role of circulating microparticles in patients with chronic heart failure*. BBA Clin, 2015. **3**: p. 18-24.
  30. Jimenez, J.J., et al., *Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis*. Thromb Res, 2003. **109**(4): p. 175-80.
  31. Preston, R.A., et al., *Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles*. Hypertension, 2003. **41**(2): p. 211-7.
  32. Arteaga, R.B., et al., *Endothelial microparticles and platelet and leukocyte activation in patients with the metabolic syndrome*. Am J Cardiol, 2006. **98**(1): p. 70-4.
  33. Jenkins, N.T., et al., *Disturbed blood flow acutely induces activation and apoptosis of the human vascular endothelium*. Hypertension, 2013. **61**(3): p. 615-21.
  34. Albuquerque, D.C., et al., *I Brazilian Registry of Heart Failure - Clinical Aspects, Care Quality and Hospitalization Outcomes*. Arq Bras Cardiol, 2015. **104**(6): p. 433-42.
  35. Braunwald, E. and M.R. Bristow, *Congestive heart failure: fifty years of progress*. Circulation, 2000. **102**(20 Suppl 4): p. IV14-23.
  36. Esler, M. and D. Kaye, *Measurement of sympathetic nervous system activity in heart failure: the role of norepinephrine kinetics*. Heart Fail Rev, 2000. **5**(1): p. 17-25.
  37. Negrao, C.E. and H.R. Middlekauff, *Adaptations in autonomic function during exercise training in heart failure*. Heart Fail Rev, 2008. **13**(1): p. 51-60.
  38. Fihn, S.D., et al., *2012 ACCF/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS Guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American College of Physicians, American Association for Thoracic Surgery, Preventive Cardiovascular Nurses Association, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(24): p. e44-e164.
  39. Viau, D.M., et al., *The pathophysiology of hypertensive acute heart failure*. Heart, 2015. **101**(23): p. 1861-7.
  40. Laonigro, I., et al., *Alcohol abuse and heart failure*. Eur J Heart Fail, 2009. **11**(5): p. 453-62.
  41. Costa, S.A., et al., *Prognostic Factors in Severe Chagasic Heart Failure*. Arq Bras Cardiol, 2017. **108**(3): p. 246-254.
  42. Welt, K., et al., *[Vascular endothelium (review). I. General morphology. 2A: histogenesis of the vascular endothelium]*. Gegenbaurs Morphol Jahrb, 1990. **136**(2): p. 163-99.
  43. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
  44. Furchgott, R.F., et al., *Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries*. J Cardiovasc Pharmacol, 1984. **6 Suppl 2**: p. S336-43.
  45. Furchgott, R.F., D. Jothianandan, and P.D. Cherry, *Endothelium-dependent responses: the last three years*. Bibl Cardiol, 1984(38): p. 1-15.
  46. Moro, M.A., et al., *cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(4): p. 1480-5.
  47. Marasciulo, F.L., M. Montagnani, and M.A. Potenza, *Endothelin-1: the yin and yang on vascular function*. Curr Med Chem, 2006. **13**(14): p. 1655-65.
  48. Landmesser, U., et al., *Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3073-8.
  49. Li, J.S., W. Schurch, and E.L. Schiffrin, *Renal and vascular effects of chronic endothelin receptor antagonism in malignant hypertensive rats*. Am J Hypertens, 1996. **9**(8): p. 803-

- 11.
50. Baron, A.D., et al., *Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation contributes to both insulin sensitivity and responsiveness in lean humans*. J Clin Invest, 1995. **96**(2): p. 786-92.
51. Deng, L.Y., R. Day, and E.L. Schiffrin, *Localization of sites of enhanced expression of endothelin-1 in the kidney of DOCA-salt hypertensive rats*. J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(8): p. 1158-64.
52. Galley, H.F. and N.R. Webster, *Physiology of the endothelium*. Br J Anaesth, 2004. **93**(1): p. 105-13.
53. Vane, J.R., E.E. Anggard, and R.M. Botting, *Regulatory functions of the vascular endothelium*. N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 27-36.
54. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 168-75.
55. Targonski, P.V., et al., *Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events*. Circulation, 2003. **107**(22): p. 2805-9.
56. Konukoglu, D. and H. Uzun, *Endothelial Dysfunction and Hypertension*. Adv Exp Med Biol, 2017. **956**: p. 511-540.
57. Heitzer, T., et al., *Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. Circulation, 2001. **104**(22): p. 2673-8.
58. Widlansky, M.E., et al., *The clinical implications of endothelial dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(7): p. 1149-60.
59. Rabelo, E.R., et al., *Venous endothelial function in heart failure: comparison with healthy controls and effect of clinical compensation*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(8): p. 758-64.
60. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1986. **315**(17): p. 1046-51.
61. Lynch, M., et al., *Adipokines, psoriasis, systemic inflammation, and endothelial dysfunction*. Int J Dermatol, 2017. **56**(11): p. 1103-1118.
62. Blackshear, W.M., Jr., D.J. Phillips, and D.E. Strandness, Jr., *Pulsed Doppler assessment of normal human femoral artery velocity patterns*. J Surg Res, 1979. **27**(2): p. 73-83.
63. Ziegler, T., et al., *Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 686-92.
64. McNally, J.S., et al., *Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(6): p. H2290-7.
65. Traub, O. and B.C. Berk, *Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 677-85.
66. Padilla, J., et al., *Impact of aging on conduit artery retrograde and oscillatory shear at rest and during exercise: role of nitric oxide*. Hypertension, 2011. **57**(3): p. 484-9.
67. Padilla, J., et al., *Increased muscle sympathetic nerve activity acutely alters conduit artery shear rate patterns*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(4): p. H1128-35.
68. de Souza, F.R., et al., *Retrograde and oscillatory shear rate in young anabolic androgenic steroid users*. Scand J Med Sci Sports, 2019. **29**(3): p. 422-429.
69. Thijssen, D.H., et al., *Sympathetic nervous system activation, arterial shear rate, and flow-mediated dilation*. J Appl Physiol (1985), 2014. **116**(10): p. 1300-7.
70. Benda, N.M., et al., *Heart failure patients demonstrate impaired changes in brachial artery blood flow and shear rate pattern during moderate-intensity cycle exercise*. Exp Physiol, 2015. **100**(4): p. 463-74.
71. Nanchen, D., et al., *Resting heart rate and incident heart failure and cardiovascular mortality in older adults: role of inflammation and endothelial dysfunction: the PROSPER study*. Eur J Heart Fail, 2013. **15**(5): p. 581-8.
72. Crossman, D.C., et al., *The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester*. J Biol Chem, 1990. **265**(17): p. 9782-7.

73. Rodgers, G.M., *Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells*. FASEB J, 1988. **2**(2): p. 116-23.
74. Moore, K.L., C.T. Esmon, and N.L. Esmon, *Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture*. Blood, 1989. **73**(1): p. 159-65.
75. Combes, V., et al., *In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 93-102.
76. Chironi, G.N., et al., *Endothelial microparticles in diseases*. Cell Tissue Res, 2009. **335**(1): p. 143-51.
77. Boulanger, C.M., et al., *In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 902-8.
78. Burger, D., et al., *Microparticles: biomarkers and beyond*. Clin Sci (Lond), 2013. **124**(7): p. 423-41.
79. Yuana, Y., A. Sturk, and R. Nieuwland, *Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions*. Blood Rev, 2013. **27**(1): p. 31-9.
80. Abid Hussein, M.N., et al., *Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(11): p. 2434-43.
81. Thijssen, D.H., et al., *Assessment of flow-mediated dilation in humans: a methodological and physiological guideline*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(1): p. H2-12.
82. Padilla, J., et al., *Brachial artery vasodilatation during prolonged lower limb exercise: role of shear rate*. Exp Physiol, 2011. **96**(10): p. 1019-27.
83. Simmons, G.H., et al., *Increased brachial artery retrograde shear rate at exercise onset is abolished during prolonged cycling: role of thermoregulatory vasodilation*. J Appl Physiol (1985), 2011. **110**(2): p. 389-97.
84. Newcomer, S.C., et al., *Effects of posture on shear rates in human brachial and superficial femoral arteries*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(4): p. H1833-9.
85. Davies, P.F., et al., *The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(2): p. 315-27.
86. Chiu, J.J. and S. Chien, *Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 327-87.
87. Casey, D.P., J. Padilla, and M.J. Joyner, *alpha-adrenergic vasoconstriction contributes to the age-related increase in conduit artery retrograde and oscillatory shear*. Hypertension, 2012. **60**(4): p. 1016-22.
88. Dignat-George, F. and C.M. Boulanger, *The many faces of endothelial microparticles*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 27-33.
89. Schiro, A., et al., *Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease*. Atherosclerosis, 2014. **234**(2): p. 295-302.
90. Huang, B., et al., *Effect of 40 mg versus 10 mg of atorvastatin on oxidized low-density lipoprotein, high-sensitivity C-reactive protein, circulating endothelial-derived microparticles, and endothelial progenitor cells in patients with ischemic cardiomyopathy*. Clin Cardiol, 2012. **35**(2): p. 125-30.
91. Lins, L.C., et al., *Effects of ezetimibe on endothelial progenitor cells and microparticles in high-risk patients*. Cell Biochem Biophys, 2014. **70**(1): p. 687-96.
92. Carter, H.H., et al., *Effect of SR manipulation on conduit artery dilation in humans*. Hypertension, 2013. **61**(1): p. 143-50.
93. Schreuder, T.H., et al., *Acute impact of retrograde shear rate on brachial and superficial femoral artery flow-mediated dilation in humans*. Physiol Rep, 2014. **2**(1): p. e00193.
94. Thijssen, D.H., et al., *Impact of 2-Weeks Continuous Increase in Retrograde Shear Stress on Brachial Artery Vasomotor Function in Young and Older Men*. J Am Heart Assoc, 2015. **4**(10): p. e001968.
95. Spieker, L.E., et al., *Mental stress induces prolonged endothelial dysfunction via endothelin-A receptors*. Circulation, 2002. **105**(24): p. 2817-20.
96. Vuckovic, K.M., M.R. Piano, and S.A. Phillips, *Effects of exercise interventions on*

peripheral vascular endothelial vasoreactivity in patients with heart failure with reduced ejection fraction. Heart Lung Circ, 2013. **22**(5): p. 328-40.