

CARLOS ALBERTO DA SILVA FRIAS NETO

**Correlação de biomarcadores inflamatórios com gravidade
da isquemia crônica ameaçadora de membro**

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

Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas
e Medicina Perioperatória

Área de concentração: Ciências Cirúrgicas

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Massazo Utiyama

**São Paulo
2022**

CARLOS ALBERTO DA SILVA FRIAS NETO

**Correlação de biomarcadores inflamatórios com gravidade
da isquemia crônica ameaçadora de membro**

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

Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas
e Medicina Perioperatória

Área de concentração: Ciências Cirúrgicas

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Massazo Utiyama

**São Paulo
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Frias Neto, Carlos Alberto da Silva
Correlação de biomarcadores inflamatórios com
gravidade da isquemia crônica ameaçadora de membro /
Carlos Alberto da Silva Frias Neto. -- São Paulo,
2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas
e Medicina Perioperatória. Área de Concentração:
Cirurgia Translacional.

Orientador: Edivaldo Massazo Utiyama.

Descritores: 1.Isquemia 2.Doença arterial
periférica 3.Inflamação 4.Biomarcadores

USP/FM/DBD-440/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esta tese aos pacientes da rede pública de saúde do Maranhão. Que possamos oferecer um atendimento de qualidade a essa população tão sofrida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa, amiga e parceira, Laura Carneiro por todo amor, paciência e insistência.

Agradeço a todos os médicos e equipe de enfermagem do Serviço de Hemodinâmica do Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra HUUFMA.

Agradeço ao meu orientador Edivaldo Massazo Utiyama, pelo apoio e paciência.

“Ninguém pode achar que falhou a sua missão neste mundo, se aliviou o fardo de outra pessoa.”

Charles Dickens

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de quadros	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	12
3 MÉTODOS	14
3.1 Desenho do Estudo	15
3.2 Razão Neutrófilos-Linfócitos e Plaquetas-Linfócitos.....	16
3.3 Escore Wifi	16
3.4 Escore GLASS	17
3.5 Análise Estatística	18
3.6 Aspectos Éticos	20
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Normalidade e Transformação das Variáveis Resposta.....	27
4.2 Razão Neutrófilo-Linfócito em Função do Escore Wifi	28
4.2.1 Pressupostos da ANOVA.....	29
4.3 Razão Plaqueta-Linfócito em Função do Escore Wifi	31
4.3.1 Pressupostos da ANOVA.....	32
4.4 Razão Neutrófilo-Linfócito em Função do Escore GLASS	34
4.4.1 Pressupostos da ANOVA.....	35
4.5 Razão Plaqueta-Linfócito em Função do Escore GLASS	37
4.5.1 Pressupostos da ANOVA.....	38
4.6 Comparação do Escore Wifi com GLASS.....	40
4.7 Análise de Variância de GLASS em Função do Wifi.....	40
5 DISCUSSÃO	47
5.1 A Respeito dos Resultados Obtidos	48
5.2 A Respeito das Limitações do Estudo	51
5.3 Perspectivas Futuras.....	52
6 CONCLUSÃO	53
7 ANEXO	55
8 REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFC	-	Artéria femoral comum
AFP	-	Femoral profunda
AI	-	Aortoilíaco
CLTI	-	Isquemia crônica ameaçadora de membro (<i>Chronic limb-threatening ischemia</i>)
FP	-	Femoropoplíteo
GLASS	-	Sistema Global de Estadiamento Anatômico (<i>Global Anatomic Staging System</i>)
GVG	-	<i>Global Vascular Guidelines</i>
HUUFMA	-	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
i.i.d.	-	Independentes e identicamente distribuídos
IM	-	Inframaleolar
IP	-	Infrapoplíteo
ITB	-	Índice tornozelo-braquial
RNL	-	Razão neutrófilo-linfócito
RPL	-	Razão plaqueta-linfócito
SVS	-	<i>Society for Vascular Surgery</i>
Wifi	-	<i>Wound, Ischemia, Foot Infection</i>

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação de Fontaine e Rutherford para doença arterial periférica	3
Quadro 2 - Resumo de sistemas de estadiamento utilizados na doença arterial periférica	4
Quadro 3 - Classificação Wifl	5
Quadro 4 - Classificação GLASS para doença em segmento femoropoplíteo e infrapoplíteo	8
Quadro 5 - Classificação GLASS para doença em segmento aortoilíaco	9

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Risco de amputação em um ano baseado na pontuação do escore Wifl.....	6
Figura 2 - Estimativa do benefício ou da necessidade de revascularização baseado na pontuação do escore Wifl.....	6
Figura 3 - Classificação do estágio clínico com base na pontuação do escore Wifl	6
Figura 4 - Critérios de inclusão e não inclusão	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes com base no escore Wifi	22
Tabela 2 - Estatísticas básicas dos dados para o escore Wifi.....	23
Tabela 3 - Dados demográficos dos pacientes com base no escore GLASS.....	25
Tabela 4 - Estatísticas básicas dos dados para o escore GLASS	25
Tabela 5 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicados aos dados originais, com 95% de confiança.....	27
Tabela 6 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicados aos dados transformados por Logaritmo Natural, com 95% de confiança	28
Tabela 7 - Estatísticas descritivas de RNL em função das categorias de Wifi e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança	29
Tabela 8 - Resultados do teste de Tukey HSD para o escore Wifi e RNL, a 95% de confiança	30
Tabela 9 - Estatísticas descritivas de RPL em função das categorias de Wifi e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança.....	32
Tabela 10 - Resultados do teste de Tukey HSD para o escore Wifi e RPL, a 95% de confiança	33
Tabela 11 - Estatísticas descritivas de RNL em função das categorias de GLASS e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança	35
Tabela 12 - Resultados do teste de Tukey HSD para o escore GLASS e RNL, a 95% de confiança	36
Tabela 13 - Estatísticas descritivas de RPL em função das categorias de GLASS e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança	38
Tabela 14 - Resultados do teste de Tukey HSD para o escore GLASS e RPL, a 95% de confiança.....	39

Tabela 15 - Tabela de frequência entre as categorias do escore Wifl e GLASS e resultado do teste Qui-quadrado a 95% de confiança	40
Tabela 16 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicados aos dados originais e aos transformados para as categorias 3 e 4 de Wifl, com 95% de confiança	41
Tabela 17 - Estatísticas descritivas de RNL e RPL em função das categorias de GLASS com os pacientes de escore Wifl 3 e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança.....	43
Tabela 18 - Estatísticas descritivas de RNL e RPL em função das categorias de GLASS com os pacientes de escore Wifl 4 e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança.....	44
Tabela 19 - Testes de normalidade e homocedasticidade dos modelos ANOVA dos pacientes Wifl 3 e 4	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Características dos pacientes para o escore Wifi	24
Gráfico 2 - Características dos pacientes para o escore GLASS	26
Gráfico 3 - Box-plot da razão neutrófilo-linfócito, original e transformado, nas categorias do escore Wifi.....	28
Gráfico 4 - Box-plot da razão plaqueta-linfócito, original e transformado, nas categorias do escore Wifi.....	31
Gráfico 5 - Box-plot da razão neutrófilo-linfócito, original e transformado, nas categorias do escore GLASS	34
Gráfico 6 - Box-plot da razão plaqueta-linfócito, original e transformado, nas categorias do escore GLASS	37

RESUMO

Frias Neto CAS. *Correlação de biomarcadores inflamatórios com gravidade da isquemia crônica ameaçadora de membro* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A isquemia crônica ameaçadora de membro representa o estágio mais avançado da doença arterial periférica crônica de membro inferior. Nesse estágio o paciente apresenta-se com grau de perfusão tão prejudicado a ponto de evoluir com dor em repouso ou ulceração da extremidade. Visando padronizar e modernizar os parâmetros de avaliação, a *Society for Vascular Surgery* (SVS) publicou dois novos escores, o Wlfi e o GLASS. O uso de biomarcadores inflamatórios para estimar gravidade e prognóstico do paciente também é uma ferramenta frequentemente utilizada. Dois marcadores baseados em dados do hemograma e com crescente relevância são a relação neutrófilo-linfócito (NLR) e a razão plaqueta-linfócito (PLR), que têm sido sugeridas para prever desfechos em múltiplas patologias. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho é avaliar os valores registrados dos biomarcadores inflamatórios e se correlacionam com estadiamento clínico (pelo escore Wlfi) e angiográfico (pelo escore GLASS). **Método:** Foi realizado um estudo transversal, avaliando 89 pacientes com isquemia crônica ameaçadora de membro inferior, encaminhados para realização de arteriografia de membro inferior no Serviço de Hemodinâmica do Hospital Universitário da Unidade Presidente Dutra. Uma vez atendidos os critérios de inclusão, foram tabulados os dados em ficha protocolo, avaliados os exames laboratoriais pré-operatórios (para avaliação de biomarcadores), realizado exame físico (com cálculo de escore Wlfi) e arteriografia de membro inferior (com posterior cálculo do escore GLASS). Os dados foram analisados separadamente para o escore Wlfi e para o escore GLASS. Para verificar diferenças entre as categorias de cada escore

foi utilizado o teste estatístico da ANOVA (One Way) seguido pelo pós-teste de Tukey para identificar quais categorias dos escores diferenciavam entre si. Foi realizado o teste Qui-Quadrado para verificar se as categorias de Wifi são independentes das de GLASS. **Resultados:** Para o escore Wifi foram 89 pacientes selecionados com média de idade de 69 anos. 51,7% dos pacientes foram mulheres e 43,8% de raça branca e 37,1% de raça negra. Foi observado associação entre os níveis mais altos da RNL com as categorias mais altas do escore Wifi e associação entre maiores níveis da RPL com as categorias mais altas do escore Wifi. Para o escore GLASS foram 74 pacientes selecionados, com média de idade de 69 anos. 51,4% dos pacientes foram mulheres e 44,6% de raça branca e 37,8% de raça negra. Não houve associação entre os níveis mais altos de RPL e RNL com as categorias mais altas do escore GLASS. Análise da relação de pacientes GLASS com os grupos Wifi não observou associações estatisticamente significativas. Análise da relação biomarcadores com escore GLASS dentro de subgrupo de pacientes Wifi 3 e 4 não observou associações estatisticamente significativas. **Conclusão:** Os biomarcadores inflamatórios calculados pelas razões neutrófilo-linfócito e plaqueta-linfócito apresentam elevação compatível com o estágio clínico da isquemia de membros inferiores.

Descritores: Isquemia; Doença arterial periférica; Inflamação; Biomarcadores

ABSTRACT

Frias Neto CAS. *Correlation of inflammatory biomarkers with the severity of chronic limb-threatening ischemia* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo; 2022.

Introduction: Chronic limb-threatening ischemia represents the most advanced stage of chronic peripheral arterial disease of the lower limb. At this stage, the patient presents with a degree of perfusion so impaired that he develops pain at rest or ulceration of the extremity. To standardize and modernize the evaluation parameters, the Society for Vascular Surgery (SVS) published two new scores, the Wifl, and the GLASS. The use of inflammatory biomarkers to estimate patient severity and prognosis is also a frequently used tool. Two markers based on blood count data and with increasing relevance are the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-lymphocyte ratio (PLR), which have been suggested to predict outcomes in multiple pathologies. **Objective:** The aim of this study is to evaluate the recorded values of inflammatory biomarkers and correlate them with clinical (by Wifl score) and angiographic staging (by GLASS score). **Method:** A cross-sectional study was conducted evaluating 89 patients with chronic limb-threatening ischemia referred for lower limb arteriography at the Hemodynamics Service of the Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra. Once the inclusion criteria were fulfilled, the data were tabulated in a protocol form, and the preoperative laboratory tests (for evaluation of biomarkers), physical examination (with the calculation of Wifl score), and arteriography of the lower limb (with subsequent GLASS score) were evaluated. The data were analyzed separately for the Wifl score and the GLASS score. To verify differences between the categories of each score, the Statistical Test of ANOVA (One Way) followed by the Tukey post-test was used to identify which categories of the scores differed from each other.

The Chi-Square test was performed to verify if Wifl categories are independent of GLASS. **Results:** For the Wifl score, 89 patients were selected with a mean age of 69 years. 51.7% of the patients were women and 43.8% were white and 37.1% were black. An association was observed between the highest levels of NLR with the highest categories of the Wifl score and an association between higher levels of PLR with the highest categories of the Wifl score. In the GLASS score, 74 patients were selected, with a mean age of 69 years. 51.4% of the patients were women and 44.6% were white and 37.8% were black. There was no association between the highest levels of PLR and NLR with the highest categories of the GLASS score. Analysis of the relationship of GLASS patients with the Wifl groups did not observe statistically significant associations. Analysis of the biomarker relationship with GLASS score within the subgroup of patients Wifl 3 and 4 did not observe statistically significant associations. **Conclusion:** Inflammatory biomarkers calculated by neutrophil-lymphocyte and platelet-lymphocyte ratios reveal elevation compatible with the clinical stage of lower-limb ischemia.

Descriptors: Ischemia; Peripheral arterial disease; Inflammation; Biomarkers

1 INTRODUÇÃO

Isquemia crônica ameaçadora de membro (do inglês *chronic limb-threatening ischemia* - CLTI), manifestação da doença arterial periférica, é definida pela presença de dor isquêmica de repouso, ulceração ou gangrena (Kim *et al.*, 2021). A dor isquêmica de repouso e a perda tecidual na isquemia crônica ameaçadora devem estar presentes há pelo menos 2 semanas e devem ser acompanhadas de provas objetivas de doença arterial hemodinamicamente significativa. Esta definição exclui úlceras puramente neuropáticas, traumáticas ou venosas que não possuem qualquer componente isquêmico (Conte *et al.*, 2019).

A isquemia crônica ameaçadora de membro representa o estágio mais avançado da doença arterial periférica crônica de membro inferior. Neste ponto da doença o risco principal é de evolução para a perda do membro. Daí a necessidade de otimizar o tempo de tratamento e diminuir ao máximo as sequelas.

Diversas classificações já foram desenvolvidas para melhor avaliação da doença arterial periférica, definição da gravidade ou mesmo para estimar prognóstico. As classificações de Fontaine e Rutherford são as classificações mais famosas para estadiamento clínico e planejamento de conduta. A atual definição de isquêmica crônica ameaçadora de membro coincide com estágios III e IV da classificação de Fontaine e com as categorias 4, 5 e 6 de Rutherford (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação de Fontaine e Rutherford para doença arterial periférica

Fontaine		Rutherford			
Estágio	Quadro clínico	Grau	Categoria	Quadro clínico	Crítérios objetivos
I	Assintomático	0	0	Assintomático	–
IIa	CI leve		1	CI leve	Completa TE, PT após exercício > 50 mmHg, mas pelo menos 20 mmHg menor que repouso
IIb	CI moderada grave	I	2	CI moderada	Entre categorias 1 e 3
			3	CI grave	Não completa TE e PT após exercício < 50 mmHg
III	Dor em repouso	II	4	Dor em repouso	PT repouso < 40 mmHg e PP < 30 mmHg
			III	5	Perda tecidual pequena
IV	Ulceração ou gangrena	IV	6	Perda tecidual grande	Semelhante à categoria 5

AOP = aterosclerose obliterante periférica; CI = claudicação intermitente; TE = teste de esteira; PT = pressão tornozelo; PP = pressão pododáctilos.

Fonte: Maffei *et al.* (2016)

Outras classificações se propuseram a análise da doença arterial periférica com base em seu padrão angiográfico, como as de Bolinger, Graziani e a TASC (Beckman *et al.*, 2021). Recentemente, visando padronizar e modernizar os parâmetros de avaliação, a *Society for Vascular Surgery* (SVS) publicou dois novos escores, o *Wound, Ischemia, Foot Infection* (WIFI) e o GLASS (Quadro 2).

Quadro 2 - Resumo de sistemas de estadiamento utilizados na doença arterial periférica

Nome	Abrangência	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Sistemas de estadiamento clínico				
Fontaine	Todos estágios da doença arterial periférica	Quatro estágios clínicos amplos; engloba dos pacientes assintomáticos aos com perda tecidual	Simple para descrição e algoritmos clínicos básicos	Discriminação inadequada entre subgrupos importantes
Rutherford	Todos estágios da doença arterial periférica	Sete estágios clínicos (R0-R6); 3 para claudicação intermitente e 2 etapas que compreendem a isquemia crônica ameaçadora de membro (<i>chronic limb-threatening ischemia -CLTI</i>)	Uso de longa data em pesquisa clínica e ensaios clínicos	Discriminação inadequada dentro do espectro da CLTI (R5, R6)
SVS WIFI	Somente pacientes com CLTI	Esquema semelhante ao TNM baseado em ferida, isquemia, infecção no pé. As combinações são agrupadas em 4 estágios clínicos com base no risco de amputação esperado	Abraçante para o universo de pacientes com feridas nas extremidades, neuroisquemia	Complexo, novo, requer mais validação. Só abrange pacientes com CLTI
Sistemas de estadiamento anatômico				
Bollinger	Infrainguinal	13 segmentos individuais são pontuados, depois somados	Captura a extensão geral da doença; correlacionado com grandes eventos cardiovasculares e sobrevida	Não é útil para definir estratégias de revascularização
TASC II	Aortoiliaco e Infrainguinal	Complexidade da lesão classificada de A-D para cada segmento específico (AI, FP, IP)	Útil para comparar dispositivos/intervenções em um tipo específico de lesão ou segmento	Não combina segmentos para análise global da doença, portanto, menos útil para o planejamento de revascularização ou comparação entre estratégias
Graziani	Infrainguinal; focado em diabetes	7 padrões de doença descritos; focado em pacientes diabéticos com úlceras nos pés	A prevalência de padrões entre subgrupos pode ser comparada	Não facilmente aplicado ao planejamento de revascularização ou comparação de resultados
GLASS	Focado em Infrainguinal; focado em CLTI	Combina diferentes padrões de lesões acima e abaixo do joelho e resume em 3 estágios tendo como base a definição de uma via de artéria alvo primária (<i>primary target artery pathway - TAP</i>)	Diretamente relevante para o planejamento de revascularização, e para comparação entre estratégias em pacientes com CLTI	Não é bem validado. Atualmente não incorpora a doença inframaleolar

AI = aortoiliaco, FP = femoropoplíteo, IP = infrapoplíteo, CLTI = *chronic limb-threatening ischemia* (isquemia crônica ameaçadora de membro)

Fonte: Adaptado de Beckman *et al.* (2021)

O sistema de classificação Wifl, publicado em 2014, aborda os três principais parâmetros que colocam um membro em risco de amputação: ferida, isquemia e infecção do pé. A classificação Wifl da SVS atribui a cada letra ou parâmetro da sigla uma escala de 4 graus, que vai de 0 a 3, onde 0 representa ausente, 1 leve, 2 moderado, e 3 grave (Quadro 3). Após esse escalonamento, a pontuação atribuída a cada letra é combinada e analisada em duas tabelas: uma de estimativa do risco de amputação em 1 ano e outra de estimativa de necessidade/benefício com a revascularização (Figuras 1 e 2). Com base nos resultados encontrados, o membro é classificado para risco de amputação e necessidade de revascularização nos estágios clínicos 1, 2, 3 ou 4 da classificação: muito baixo, baixo, moderado e alto risco de amputação ou benefício com a revascularização, respectivamente. O estágio 5 representa um membro irrecuperável, mesmo com revascularização (Figura 3) (Cerqueira *et al.*, 2020).

Quadro 3 - Classificação Wifl

Componente	Graus	Descrição		
Ferida (W)	0	Sem úlcera ou gangrena (dor isquêmica em repouso)		
	1	Úlcera pequena ou superficial em perna ou pé, sem gangrena (ADS ou CP)		
	2	Úlcera profunda com exposição de osso, articulação ou tendão ± gangrena limitada a pododáctilos (MAD ou TMA padrão ± CP)		
	3	Úlcera profunda e extensa envolvendo antepé e/ou mediopé ± envolvimento do calcâneo ± gangrena extensa (RC do pé ou TMA não tradicional)		
Isquemia (I)		ITB	PAS do tornozelo	TP, TcPO₂
	0	≥ 0,80	> 100 mmHg	≥ 60 mmHg
	1	0,6-0,79	70-100 mmHg	40-59 mmHg
	2	0,4-0,59	50-70 mmHg	30-39 mmHg
3	≤ 0,39	< 50 mmHg	< 30 mmHg	
Infecção do pé (f)	0	Não infectado		
	1	Infecção local leve, envolvendo apenas pele e subcutâneo, eritema > 0,5 e ≤ 2 cm		
	2	Infecção local moderada, com eritema > 2 cm ou envolvendo estruturas mais profundas		
	3	Infecção local grave com os sinais de SIRS		

Wifl = *Wound, Ischemia and Foot infection*; ADS = amputação digital simples; CP = cobertura da pele; MAD = múltiplas amputações digitais; TMA = amputação transmetatársica; RC = reconstrução complexa; ITB = índice tornozelo-braquial; PAS = pressão arterial sistólica; TP = *toe pressure* (PAS do dedo do pé); TcPO₂ = *transcutaneous oxygen pressure* (pressão transcutânea de oxigênio); SIRS = *systemic inflammatory response syndrome* (síndrome da resposta inflamatória sistêmica).

Fonte: Cerqueira *et al.* (2020)

	Isquemia 0				Isquemia 1				Isquemia 2				Isquemia 3			
W0	VL	VL	L	M	VL	L	M	H	L	L	M	H	L	M	M	H
W1	VL	VL	L	M	VL	L	M	H	L	M	H	H	M	M	H	H
W2	L	L	M	H	M	M	H	H	M	H	H	H	H	H	H	H
W3	M	M	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3

W: wound, ferida. VL: very low, muito baixo. L: low, baixo. M: moderate, moderado. H: high, alto. FI: foot infection, infecção do pé. Adaptada de Mills et al.

Fonte: Santos (2021)

Figura 1 - Risco de amputação em um ano baseado na pontuação do escore Wifi

	Isquemia 0				Isquemia 1				Isquemia 2				Isquemia 3			
W0	VL	VL	VL	VL	VL	L	L	M	L	L	M	M	M	H	H	H
W1	VL	VL	VL	VL	L	M	M	M	M	H	H	H	H	H	H	H
W2	VL	VL	VL	VL	M	M	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
W3	VL	VL	VL	VL	M	M	M	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI	FI
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3

W: wound, ferida. VL: very low, muito baixo. L: low, baixo. M: moderate, moderado. H: high, alto. FI: foot infection, infecção do pé. Adaptada de Mills et al.

Fonte: Santos (2021)

Figura 2 - Estimativa do benefício ou da necessidade de revascularização baseado na pontuação do escore Wifi

Very Low (Muito baixo) = VL = estágio clínico 1
Low (Baixo) = L = estágio clínico 2
Moderate (Moderado) = M = estágio clínico 3
High (Alto) = H = estágio clínico 4
Estágio clínico 5 significaria um pé não-salvável

Fonte: adaptado de Mills et al. (2014)

Figura 3 - Classificação do estágio clínico com base na pontuação do escore Wifi

A *Global Vascular Guidelines* (GVG), publicadas em 2019, propuseram o Sistema Global de Estadiamento Anatômico ou *Global Anatomic Staging System* (ou GLASS), um novo sistema angiográfico de estadiamento para isquemia crônica ameaçadora de membro. O escore GLASS serve para estimar a chance de sucesso e patência da revascularização da via arterial com base na extensão e distribuição das

lesões ateroscleróticas, mas também permitir uma melhor estratificação do paciente em ensaios clínicos comparando novas estratégias de tratamento da isquemia crônica crítica (Wijnand *et al.*, 2021; Haga *et al.*, 2021).

Sendo a doença arterial um resultado de lesões em múltiplos segmentos, para o escore GLASS foi considerado segmento aortoilíaco, segmento femoropoplíteo (FP), segmento infrapoplíteo (IP) e segmento inframaleolar (IM). Na classificação GLASS, a artéria femoral comum (AFC) e artéria femoral profunda (AFP) são vistas como artérias de entrada, e o sistema infrainguinal começa na origem da artéria femoral superficial. Isso se justifica pelas distintas abordagens utilizadas no tratamento da doença de AFC e AFP e pelos resultados de longo prazo semelhantes aos das intervenções em sistema aortoilíaco. Devido a esquemas já existentes e considerados adequados, o foco da classificação foi na doença infrainguinal, sendo formulado um esquema simplificado para o segmento aortoilíaco para o GLASS (Quadro 5) (Conte *et al.*, 2019).

No território infrainguinal, o GLASS classifica (de 0 a 4) a gravidade e extensão da doença nos segmentos arterial femoropoplíteo (considerado da origem da artéria femoral superficial até origem da artéria tibial anterior/ final da artéria poplíteia) e infrapoplíteo (origem da artéria tibial anterior e do tronco tibiofibular até maléolo). Após essa análise, a pontuação de cada segmento é somada em tabela e o membro é classificado em estágios I, II ou III, que se correlacionam com a complexidade técnica (baixa, intermediária e alta) de revascularização (Quadro 4) (Conte *et al.*, 2019; Haga *et al.*, 2021).

Em relação à doença de segmento inframaleolar, a GLASS emprega um modificador de três níveis para descrever o estado das artérias que

cruzam o tornozelo (incluindo as divisões terminais da artéria fibular) e o arco plantar. Atualmente, o modificador da doença inframaleolar não é considerado dentro da atribuição primária de estágios de membros em GLASS, dada a ausência de fortes evidências sobre como afeta os resultados do tratamento (Conte *et al.*, 2019).

Quadro 4 - Classificação GLASS para doença em segmento femoropoplíteo e infrapoplíteo

Classificação Femoropoplíteo (FP)	
0	Doença leve ou não significativa (<50%)
1	Extensão total da doença em AFS <1/3 (<10 cm); pode incluir oclusão total crônica focal única (<5 cm) desde que não seja oclusão na origem; artéria poplíteia com doença leve ou não significativa
2	Extensão total da doença em AFS 1/3-2/3 (10-20 cm); pode incluir oclusão total crônica totalizando <1/3 (10 cm), mas sem oclusão na origem; estenose da artéria poplíteia focal <2 cm, não envolvendo trifurcação
3	Extensão total da doença em AFS >2/3 (>20 cm); pode incluir qualquer oclusão na origem <20 cm ou oclusão total crônica de 10 a 20 cm de comprimento; estenose de artéria poplíteia curta de 2-5 cm, não envolvendo trifurcação
4	Extensão total da oclusão de AFS >20 cm; qualquer lesão de artéria poplíteia >5 cm ou estendendo-se para trifurcação; qualquer oclusão total crônica em artéria poplíteia
Classificação Infrapoplíteia (IP)	
0	Doença leve ou não significativa (<50%)
1	Estenose focal <3 cm sem incluir tronco tibiofibular
2	Extensão total da doença em artéria alvo <1/3 (<10 cm); oclusão total crônica focal única (<3 cm sem incluir o tronco tibiofibular ou a origem da artéria alvo)
3	Extensão total da doença em artéria alvo 1/3-2/3 (10-20 cm); oclusão total crônica 3-10 cm (pode incluir origem da artéria alvo, mas não tronco tibiofibular)
4	Extensão total da doença em artéria alvo >2/3 de comprimento; oclusão total crônica >1/3 (>10 cm) de comprimento (pode incluir origem da artéria alvo); qualquer oclusão total crônica do tronco tibiofibular

AFS = artéria femoral superficial

Classificação Femoropoplíteia (FP) - o envolvimento da trifurcação significa que a doença inclui a origem da artéria tibial anterior ou tronco tibiofibular. Calcificação severa (por exemplo, >50% de circunferência, placas difusas, volumosas ou "recifes de coral") dentro da via de artéria alvo (*target artery pathway* - TAP) aumenta o escore dentro daquele segmento em +1.

Classificação Infrapoplíteia (IP) - é aplicada apenas à artéria escolhida como artéria alvo. Calcificação severa (por exemplo, >50% de circunferência, placas difusas, volumosas ou "recifes de coral") dentro da TAP aumenta o escore dentro daquele segmento em +1. A doença do tronco tibiofibular só é incluída se a artéria alvo for a artéria tibial posterior ou artéria fibular.

Fonte: Adaptado de Wijnand *et al.* (2021)

Quadro 5 - Classificação GLASS para doença em segmento aortoiliaco

Estadiamento da doença Aortoiliaca (<i>inflow</i>) pelo GLASS	
I	Estenose da artéria ilíaca comum e/ou externa, oclusão total crônica da artéria ilíaca comum ou externa (não ambas), estenose da aorta infrarrenal; qualquer combinação destes
II	Oclusão total crônica da aorta; oclusão total crônica de artérias ilíacas comuns e externas; doença difusa grave e/ou artérias ilíacas comum e externa de pequeno calibre (<6 mm); doença do aneurismática concomitante; reestenose difusa grave intra-stent no segmento AI
Modificadores: A, ausência de doença significativa em AFC; B, doença significativa em AFC (>50% de estenose)	

AI = Aortoiliaco; AFC = artéria femoral comum.

Sugestão de um sistema de estadiamento simplificado para a doença de *inflow* (AI e AFC). Doença hemodinamicamente significativa (>50% de estenose) da AFC é considerado um modificador do estadiamento (A/B).

Fonte: Adaptado de Conte *et al.* (2019)

Os escores Wifl e GLASS são utilizados primariamente como preditores de risco de amputação do membro e de chances de revascularização. A classificação Wifl foi validada por diversos autores para estimar o risco de mortalidade e de outros desfechos de importância clínica (Hicks *et al.*, 2018; Vela-Orús, 2020; Hata *et al.*, 2021). A classificação GLASS demonstrou prever sucesso da revascularização arterial (Tokuda *et al.*, 2020; Yamada *et al.*, 2022), mas também demonstrou prever outros desfechos. Morisaki *et al.*, em 2021, observaram que não houve relação entre estágio GLASS e salvamento de membros ou cicatrização de feridas, porém a análise multivariada revelou relação do estágio GLASS com taxa de sobrevida em 2 anos.

O uso de biomarcadores inflamatórios para estimar gravidade e prognóstico do paciente também é uma ferramenta frequentemente utilizada. Vários biomarcadores de inflamação foram relatados, incluindo novos biomarcadores relacionados ao hemograma completo, dada a sua correlação já demonstrada com situações de gravidade em múltiplas

situações, ampla disponibilidade, custo e praticidade. Dois marcadores baseados em dados do hemograma e com crescente relevância são a razão neutrófilo-linfócito (RNL) e a razão plaqueta-linfócito (RPL).

As plaquetas estão envolvidas na aterosclerose, na ativação de citocinas pró-inflamatórias e, através da interação com o endotélio, provavelmente também estão relacionadas à quimiotaxia leucocitária e à inflamação da parede arterial. Os neutrófilos têm demonstrado um papel importante na disfunção endotelial, no desenvolvimento da aterosclerose e na desestabilização da placa. Neutrófilos ativados aderem e penetram facilmente na parede endotelial e estão envolvidos na geração e liberação de radicais livres, enzimas hidrolíticas e citocinas. A linfocitopenia está associada ao estresse fisiológico e imunodeficiência, complicações cardiovasculares e mortalidade (Valga *et al.*, 2020; Pereira-Neves *et al.*, 2021). A combinação desses índices reflete tanto um estado pró-inflamatório como pró-coagulante e pode fornecer informações adicionais tanto para a gravidade da doença quanto para a mortalidade (Yilmaz e Ozkul, 2018).

Estes biomarcadores têm sido sugeridos para prever desfechos em múltiplas patologias (Li *et al.*, 2017; Gasparyn *et al.*, 2019; Al-osami *et al.*, 2020; Boos *et al.*, 2021). No campo vascular, esses parâmetros têm sido associados ao aumento do risco de morte na dissecação de aorta tipo A (Bedel *et al.*, 2019), preditor de mortalidade após cirurgia aberta de aneurisma de aorta abdominal (Ko *et al.*, 2021), aumento do risco de morte e amputação do membro em pacientes submetidos a cirurgia de revascularização de membro (Coelho *et al.*, 2021).

Não foram encontradas pesquisas comparando os escores Wifl e GLASS a biomarcadores de reação inflamatória e de gravidade clínica do quadro e da isquemia do membro.

2 OBJETIVO

Avaliar os valores registrados dos biomarcadores inflamatórios, razão neutrófilo-linfócito e razão plaqueta-linfócito, e verificar se correlacionam com a avaliação da gravidade clínica da isquemia do membro (pelo score Wifl) e com o padrão anatômico (angiográfico) da doença arterial (pelo score GLASS).

3 MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

O trabalho foi desenvolvido no Serviço de Hemodinâmica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), na Unidade Presidente Dutra, na cidade de São Luís - MA.

Foi realizado um estudo transversal, durante os meses de maio de 2022 a setembro de 2022, avaliando 89 pacientes de forma consecutiva com isquemia crônica ameaçadora de membro inferior, encaminhados para realização de arteriografia de membro inferior no Serviço de Hemodinâmica do HUUFMA.

Após a admissão no setor pela equipe de enfermagem, pacientes foram avaliados para determinar se preenchiam critérios de inclusão no estudo.

Foram selecionados para esse estudo os pacientes que preencheram os seguintes critérios de inclusão: pacientes com classificação de Rutherford 4 a 6, com quadro de isquemia crônica ameaçadora de membro inferior conforme definição da SVS, com exames laboratoriais completos e que foram submetidos ao exame de arteriografia do membro inferior.

Não foram incluídos os indivíduos com isquemia de membro causada por outras razões que não aterosclerose; pacientes com sinais de infecção ativa causada por outras razões que não a úlcera de membro inferior; ou pacientes com cânceres ou doenças inflamatórias crônicas.

Uma vez atendidos os critérios de inclusão, foi aplicado o termo de consentimento com o paciente ou seu responsável. Em seguida, tabulados os dados em ficha protocolo, avaliados os exames laboratoriais pré-operatórios e realizado exame físico e arteriografia de membro inferior (Anexo A).

3.2 Razão Neutrófilos-Linfócitos e Plaquetas-Linfócitos

Os exames laboratoriais de interesse consistem nos valores de neutrófilos, linfócitos e plaquetas, obtidos do exame de hemograma completo. Para o cálculo da RPL, obteve-se a razão entre a contagem absoluta de plaquetas e a contagem absoluta de linfócitos na contagem sanguínea. Para obter a RNL, calculou-se a razão entre a contagem absoluta de neutrófilos e a contagem absoluta de linfócitos na contagem sanguínea.

3.3 Escore Wifi

O exame físico consiste na aplicação do teste de escore WiFi, já demonstrado. O exame consiste em avaliação da úlcera, da presença de infecção e do grau de isquemia. A avaliação da úlcera e da infecção se baseiam em critérios clínicos com base na inspeção e palpação do membro. A avaliação da isquemia é realizada com base no índice tornozelo-braquial (ITB). Os pacientes que apresentaram ITB elevado ($ITB > 1,4$) ou incompressível (pressão arterial sistólica maior que 250 mmHg) no tornozelo, foram excluídos da pesquisa.

3.4 Escore GLASS

As arteriografias foram realizadas conforme protocolos do setor de hemodinâmica, incluindo o uso de régua escanográfica (com marcação centimetrada e radiopaca) para mensuração das lesões quando necessário (a depender do aparelho de hemodinâmica utilizado no exame). A avaliação e gradação das lesões foi realizado com base no escore GLASS, já demonstrado. Pacientes com escore GLASS 0 (ou não aplicável) foram excluídos da pesquisa. Os pacientes com escore GLASS presente em segmento aortoilíaco não foram considerados para fins de análise da relação com escore Wifl e com biomarcadores; para esta análise foram considerados somente os escores GLASS infrainguinal.

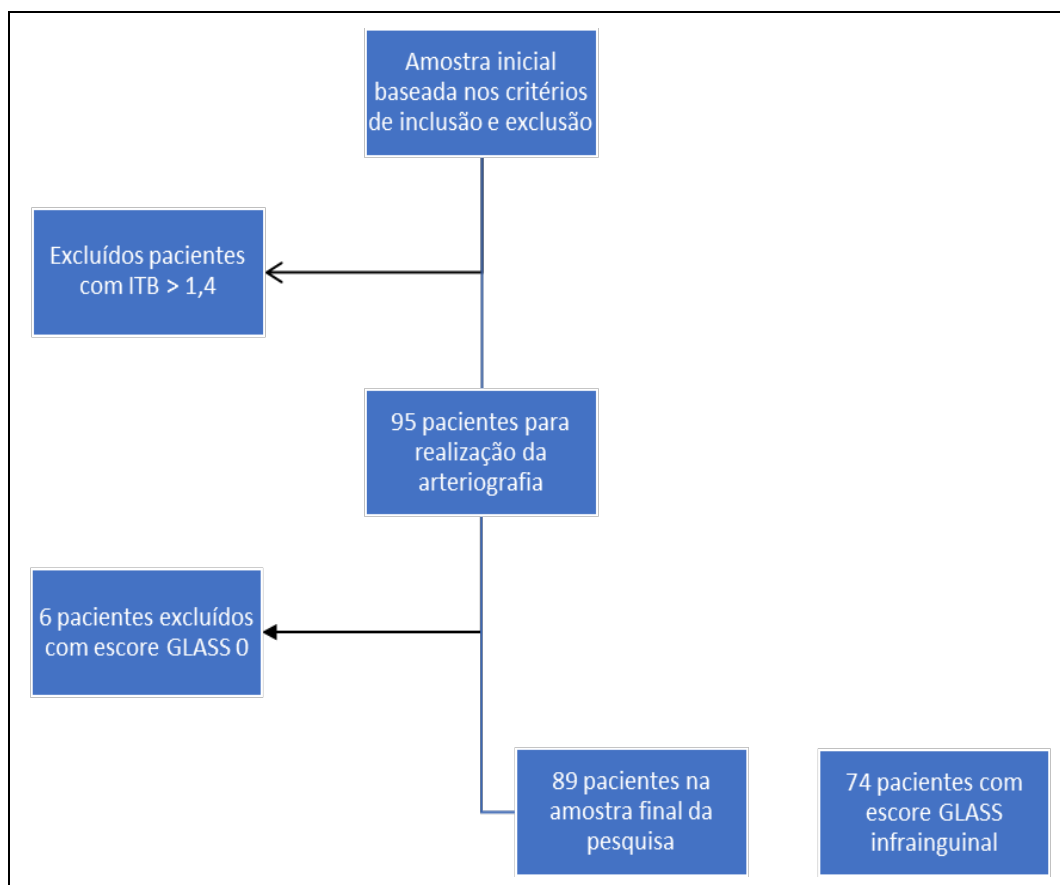


Figura 4 - Critérios de inclusão e não inclusão

Ao final da coleta de dados, foram avaliados 89 pacientes para análise das relações do escore Wifl com biomarcadores e 74 pacientes para avaliação entre escore Wifl, escore GLASS e biomarcadores (Figura 4). Os dados foram registrados em ficha protocolo: idade, sexo, raça, comorbidades, tabagismo, exames de hemograma, função renal e coagulograma, sinais vitais, classificação Wifl e classificação GLASS. Todos os dados foram inseridos em planilha Excel.

3.5 Análise Estatística

A avaliação da relação entre os biomarcadores com a escala Wifl foi realizada em 89 pacientes e da relação com a escala GLASS em 74 pacientes.

Inicialmente foi realizada a análise descritiva das variáveis para entender o perfil dos pacientes submetidos ao estudo, apresentando gráficos e métricas estatística como média, desvio padrão, mínimo, mediana, máximo e coeficiente de variação.

Em seguida, foi aplicado um teste de comparação de médias a cada uma das categorias dos escores Wifl e GLASS a partir da RNL e RPL visando verificar se a variância dentro de cada categoria é pequena e menor do que a global e assim constatar se existe uma relação entre as variáveis. Encontrando significância, foi realizado um teste de comparação múltipla para determinar quais grupos estão diferindo dos outros.

Para isto, foi realizado o teste de Análise de Variância Simples (*One way ANOVA*) para verificar se as médias dos quatro grupos de Wifl e dos 3 de GLASS independentes diferem entre si tanto em relação a RNL como em

relação a RPL. A hipótese nula do teste da ANOVA é que as médias dos grupos ou tratamentos possuem igualdade entre si.

Para comparar as médias, testando dois grupos por vez fazendo valer a hipótese nula de igualdade de médias, foi aplicado o teste *HSD de Tukey* (Teste de Tukey da Diferença Honestamente Significativa).

Para que o teste de comparação de médias, por meio da ANOVA, seja válido, os resíduos do modelo devem ser independentes e identicamente distribuídos (i.i.d.). Desta maneira foi necessário aplicar os testes de Shapiro-Wilk e de Barlett para verificarmos se os resíduos são identicamente distribuídos. Nestes, são verificados se os resíduos do modelo são normais e homogêneos, respectivamente.

Ambos os testes são aplicados quando a variável resposta é contínua (Y) e a variável explanatória é categórica (X), além de exigir que a variável dependente possua distribuição normal, ou seja, são testes paramétricos.

Para verificar se a variável dependente possui distribuição normal aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk que testa a hipótese de os dados apresentarem distribuição normal.

Alternativamente, quando descumprida a normalidade dos dados, pode-se aplicar o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que possui hipótese nula equivalente à da ANOVA, contudo o teste de Kruskal-Wallis não contém nenhuma restrição acerca da independência e da distribuição idêntica dos dados.

Na ausência de normalidade dos dados foi aplicada uma transformação antes de realizar o teste da ANOVA. A transformação de

dados consiste em aplicar aos dados originais uma técnica específica de transformação, que neste estudo foi aplicada a do logaritmo natural (ou neperiano), visando obter normalidade dos dados. Vale destacar que para interpretação é necessário que a transformação seja desfeita e nestas circunstâncias a exponencial consegue resolver.

Além disso, foi realizado o teste Qui-Quadrado para verificar se as categorias de Wifi são independentes das de GLASS. O teste é realizado sob a hipótese nula de independência entre os fatores.

A decisão quanto a rejeição ou não da hipótese nula em todos os testes apresentados aqui foram tomadas com base no nível de significância de 5%.

Além disso, foram aplicados todos os procedimentos computacionais descritos acima por meio do Software Livre Python v. 3.0, por meio das bibliotecas: pandas, numpy, scipy, researchpy, statsmodels.

3.6 Aspectos Éticos

Este estudo foi realizado após aceitação e aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HUUFMA e Plataforma Brasil, sob o número de protocolo CAAE: 57680222.7.0000.5086. Foi garantida a confiabilidade das informações prestadas para todos os participantes que forneceram consentimento livre e esclarecido.

4 RESULTADOS

Para o escore Wifl foram 89 pacientes selecionados com média de idade de 69 anos. 51,7% dos pacientes foram mulheres e 43,8% de raça branca e 37,1% de raça negra. A média dos valores da RNL foi de 4,01 e da RPL foi de 231,65 (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes com base no escore Wifl

Característica	Valor (n=89)
Idade, mediana [Q1,Q3]	68,0 [62,0,78,0]
Feminino, n (%)	46 (51,7)
Raça Branca, n (%)	39 (43,8)
Hipertensão, n (%)	74 (83,1)
Dislipidemia, n (%)	14 (15,7)
Tabagismo, n (%)	19 (21,3)
Diabetes, n (%)	72 (80,9)
Ex-tabagista, n (%)	39 (43,8)
IRC, n (%)	26 (29,2)
DPOC, n (%)	1 (1,1)
Doença coronariana, n (%)	9 (10,1)
Doença cerebrovascular, n (%)	16 (18,0)
Razão neutrófilo-Linfócito, mediana [Q1,Q3]	3,3 [2,4,5,2]
Razão Plaqueta-Linfócito, mediana [Q1,Q3]	214,7 [145,5,302,6]
	1 4 (4,5)
	2 9 (10,1)
Escore Wifl, n (%)	3 25 (28,1)
	4 51 (57,3)

RNL: Razão neutrófilo-linfócito; RPL = Razão plaqueta-linfócito

Tabela 2 - Estatísticas básicas dos dados para o escore Wifi

Variável	N	Média	D.P.	Mín.	25%	50%	75%	Máx
Idade	89,00	69,60	11,02	44,00	62,00	68,00	78,00	92,00
RNL	89,00	4,01	2,42	1,10	2,43	3,34	5,25	14,13
RPL	89,00	231,65	110,36	78,24	145,50	214,70	302,60	546,60

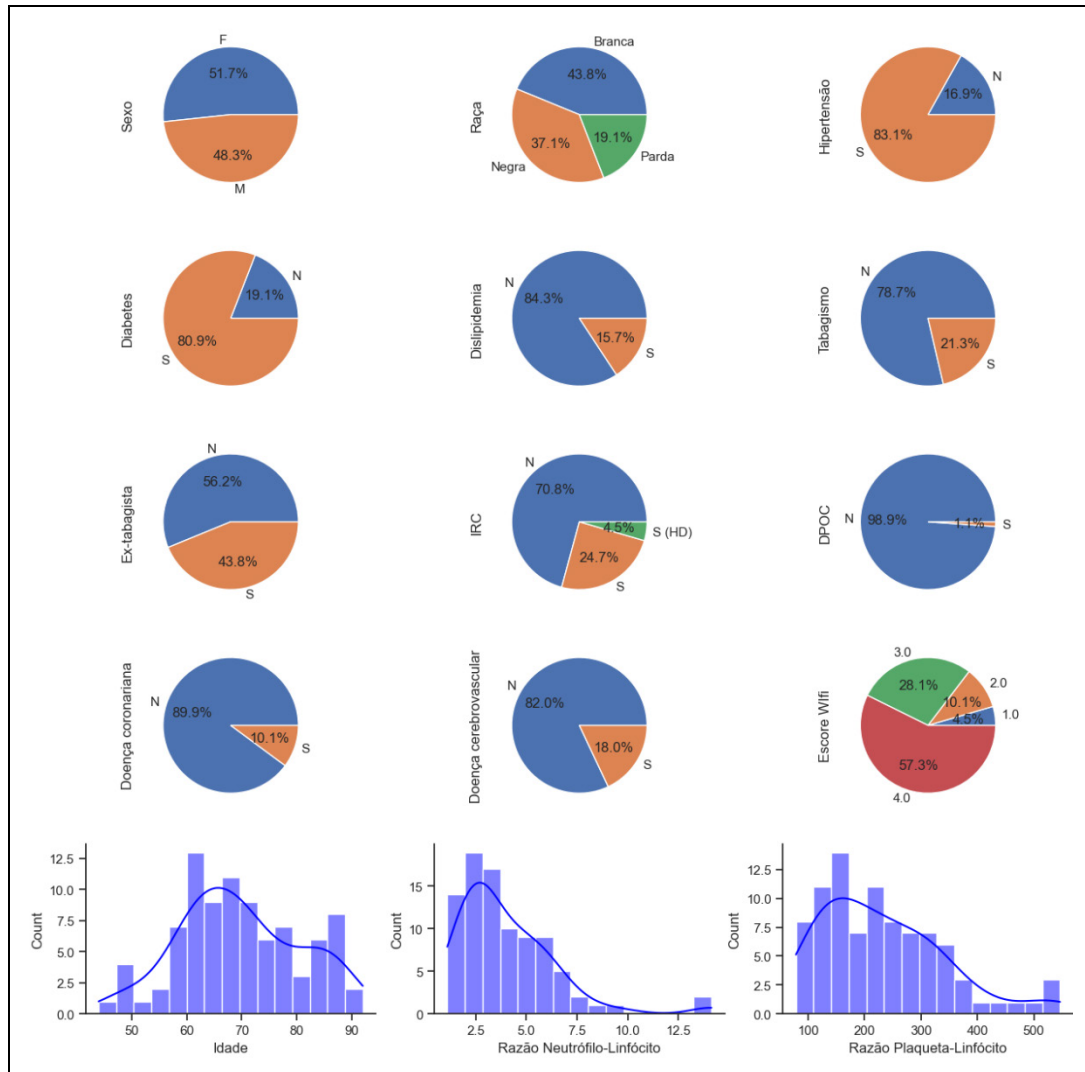
D.P.: desvio padrão, C.V.: coeficiente de variação, F: estatística de teste da ANOVA.

RNL: Razão neutrófilo-linfócito; RPL = Razão plaqueta-linfócito

Fonte: *Python*, módulo *describex*

Neste grupo de pacientes, apenas 21,3% dos pacientes eram tabagistas, contudo, 43,8% do total de pacientes já fora fumante em algum período da vida. 83,1% dos pacientes considerados apresentavam quadro de hipertensão, 80,9% diabetes. Outras características dos pacientes estão apresentadas na figura a seguir (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Características dos pacientes para o escore Wifi



Fonte: *Python*, módulo sns e plot.

Já para o escore GLASS foram 74 pacientes selecionados com média de idade de 69 anos. 51,4% dos pacientes foram mulheres e 44,6% de raça branca e 37,8% de raça negra. A média dos valores da RNL foi de 4,08 e da RPL foi de 238,11 (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 - Dados demográficos dos pacientes com base no escore GLASS

Característica	Valor (n=74)
Idade, mediana [Q1,Q3]	68,0 [63,0,78,8]
Feminino, n (%)	38 (51,4)
Raça Branca, n (%)	33 (44,6)
Hipertensão, n (%)	60 (81,1)
Dislipidemia, n (%)	12 (16,2)
Tabagismo, n (%)	12 (16,2)
Diabetes, n (%)	65 (87,8)
Ex-tabagista, n (%)	34 (45,9)
IRC, n (%)	25 (33,8)
DPOC, n (%)	74 (100,0)
Doença coronariana, n (%)	6 (8,1)
Doença cerebrovascular, n (%)	12 (16,2)
RNL, mediana [Q1,Q3]	3,3 [2,4,5,3]
RPL, mediana [Q1,Q3]	215,2 [148,2,306,3]
Escore GLASS, n (%)	
	I 15 (20,3)
	II 17 (23,0)
	III 42 (56,8)

RNL: Razão neutrófilo-linfócito; RLP = Razão plaqueta-linfócito

Tabela 4 - Estatísticas básicas dos dados para o escore GLASS

Variável	N	Média	D.P.	Mín.	25%	50%	75%	Máx
Idade	74,00	69,85	11,34	44,00	63,00	68,00	78,75	92,00
RNL	74,00	4,08	2,55	1,10	2,40	3,34	5,29	14,13
RPL	74,00	238,11	112,86	78,24	148,15	215,20	306,27	546,60

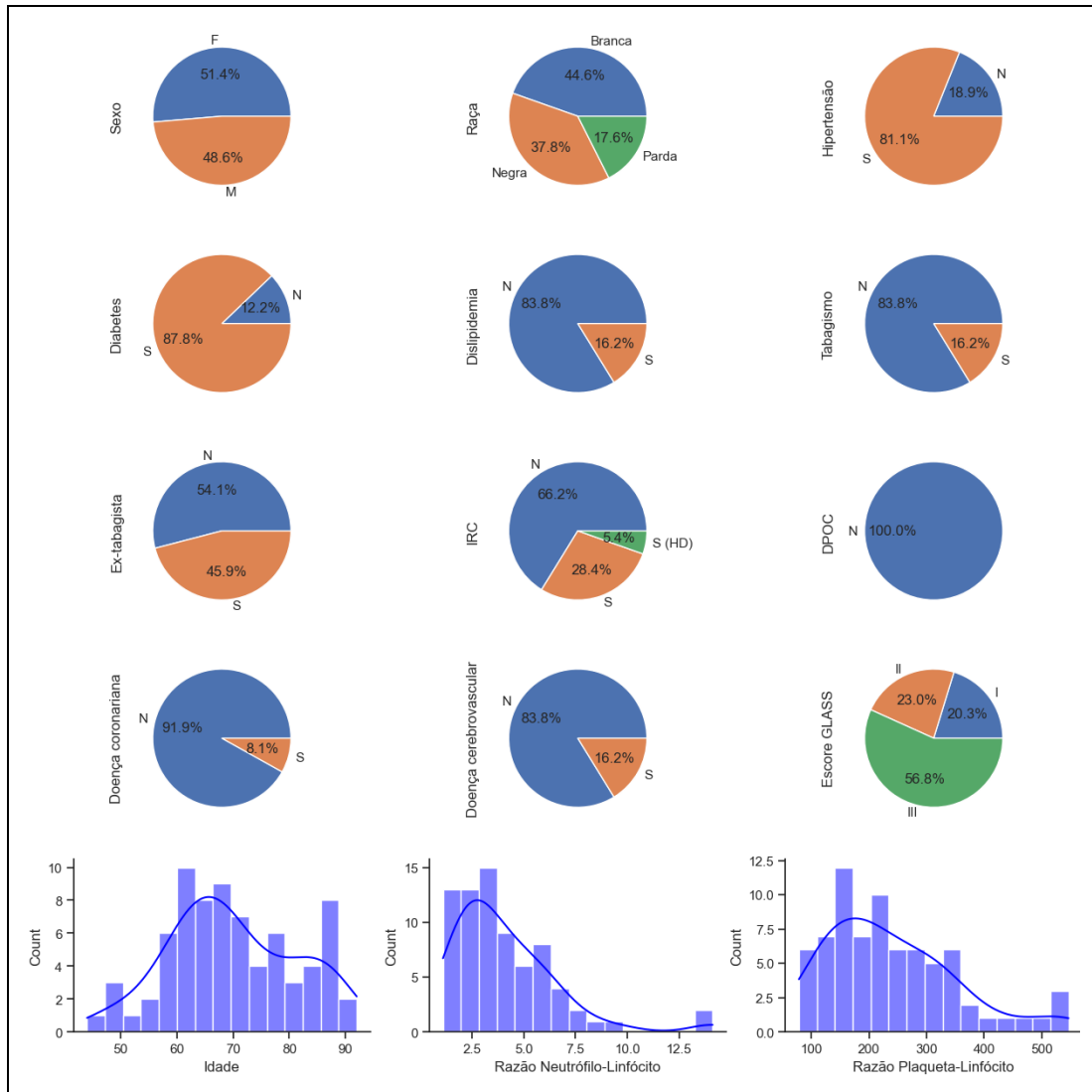
D.P.: desvio padrão, C.V.: coeficiente de variação, F: estatística de teste da ANOVA.

RNL: Razão neutrófilo-linfócito; RLP = Razão plaqueta-linfócito

Fonte: *Python* módulo describe

Neste grupo de pacientes, apenas 16,2% dos pacientes eram tabagistas, contudo, 45,9% do total de pacientes já fora fumante em algum período da vida. 81,1% dos pacientes considerados apresentavam quadro de hipertensão, 87,8% diabetes. Outras características dos pacientes estão apresentadas na figura a seguir (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Características dos pacientes para o escore GLASS



Fonte: Python, módulo sns e plot

4.1 Normalidade e Transformação das Variáveis Resposta

Quanto ao requisito de normalidade das variáveis de RNL e RPL, a seguir estão contidos os resultados do teste de Shapiro-Wilk (SW) para verificação se a distribuição dos dados é normal. Como foi verificado, ao nível de confiança de 95% ambas as variáveis (RNL e RPL) não seguem uma distribuição normal, tanto para o grupo de paciente do escore Wifi quanto para o GLASS (Tabela 5).

Tabela 5 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicados aos dados originais, com 95% de confiança

Grupo	Variável	Obs.	Shapiro-Wilk		
			SW Stats	p-valor	Normal?
Wifi	RNL	89	0,840	0,000	Não
	RPL	89	0,929	0,000	Não
GLASS	RNL	74	0,836	0,000	Não
	RPL	74	0,928	0,000	Não

Obs. Observação, RNL: Razão neutrófilo-linfócito, RLP = Razão plaqueta-linfócito.
 Fonte: *Python*, módulo *stats.shapiro*

Como a falta de normalidade inviabiliza a aplicação da ANOVA, foi aplicado o Logaritmo Natural nas variáveis RNL e RPL e assim o teste de Shapiro-Wilk demonstrou que a normalidade pode ser obtida em todas as variáveis aplicando este método de transformação (Tabela 6).

Tabela 6 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicados aos dados transformados por Logaritmo Natural, com 95% de confiança

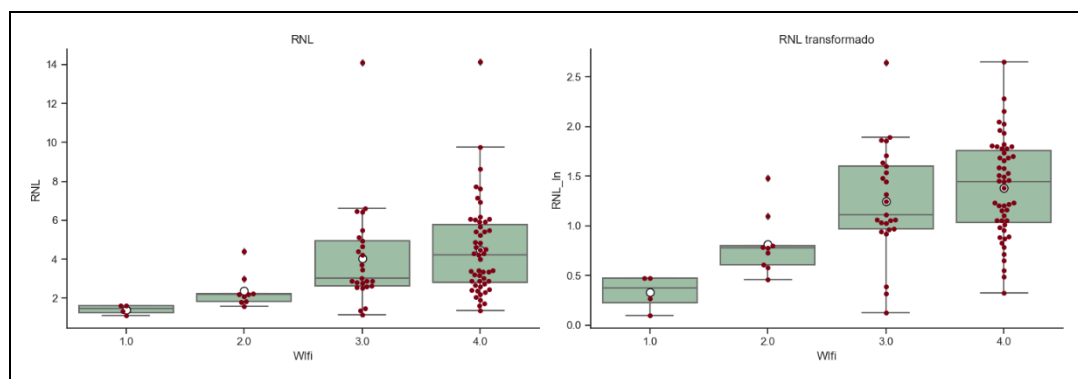
Grupo	Variável	Obs.	Shapiro-Wilk		Normal?
			SW Stats	p-valor	
Wifi	ln(RNL)	89	0,988	0,567	Sim
	ln(RPL)	89	0,983	0,293	Sim
GLASS	ln(RNL)	74	0,987	0,677	Sim
	ln(RPL)	74	0,986	0,573	Sim

Obs. Observação, RNL: Razão neutrófilo-linfócito, RPL = Razão plaqueta-linfócito.
 Fonte: Python, módulo *stats.shapiro* e *np.log*.

4.2 Razão Neutrófilo-Linfócito em Função do Escore Wifi

Foi possível verificar que a RNL variou entre 17,7% e 64,3% nas categorias do escore Wifi. As variâncias menores nas categorias podem indicar a possibilidade de associação entre elas. Foi possível notar *outliers* nos grupos 2, 3 e 4 sendo parcialmente corrigidos pela transformação (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Box-plot da razão neutrófilo-linfócito, original e transformado, nas categorias do escore Wifi



Fonte: Python, módulo *sns.boxplot*

Com base no teste da ANOVA, a 95% de confiança, pode-se afirmar que não houve igualdade das médias da RNL nas categorias do escore Wifi (p-valor: 0,00007). Ou seja, há associação entre os níveis mais altos da RNL com as categorias mais altas do escore Wifi (Tabela 7).

Tabela 7 - Estatísticas descritivas de RNL em função das categorias de Wifi e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança

Categorias	Estatísticas Descritivas							ANOVA		ANOVA (com ln)	
	N.	Média	D.P.	Mín.	Mediana	Máx.	C.V. (%)	F	p-valor	F	p-valor
1	4,00	1,41	0,25	1,10	1,46	1,61	17,69	3,975	0,011	8,275	0,00007
2	9,00	2,36	0,86	1,58	2,18	4,39	36,40				
3	25,00	4,05	2,61	1,13	3,04	14,09	64,35				
4	51,00	4,49	2,37	1,38	4,23	14,13	52,87				

D.P.: desvio padrão, C.V.: coeficiente de variação, F: estatística de teste da ANOVA.
Fonte: Python, módulo *groupby* e *ols*.

4.2.1 Pressupostos da ANOVA

Quanto a independência dos resíduos do modelo, é suficiente a suposição que as categorias são mutuamente exclusivas, ou seja, um indivíduo só pode pertencer a uma categoria. Além disso, os dados não são medidas repetidas (não coletadas ao longo do tempo), mas individualmente nos pacientes.

A suposição de normalidade também foi atendida, ao se aplicar o teste de Shapiro-Wilk ao modelo ANOVA com dados transformados, resultando em uma estatística de teste de 0,988 e p-valor de 0,574.

E a suposição de homogeneidade também foi atendida, ao se aplicar o teste de Bartlett que resultou em uma estatística de teste de 6,224 e p-

valor de 0,101, não rejeitando assim a hipótese de igualdade de variância entre as categorias.

Atendidas todas as suposições do modelo ANOVA realizado no item anterior, com os dados do valor RNL transformados, é possível então validar a hipótese encontrada e prosseguir para um teste de comparação múltipla de médias.

Foi realizado então o teste Tukey HSD para conhecimento de quais as categorias do escore Wifi que são estatisticamente diferentes dos demais dentro da RNL (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados do teste de Tukey HSD para o escore Wifi e RNL, a 95% de confiança

Grupo 1	Grupo 2	Diferença*	p-valor	Lim. Inf.*	Lim. Sup.*	Rejeitar H0
1	2	0,483	0,362	-0,288	1,255	Não
1	3	0,918	0,004	0,227	1,610	Sim
1	4	1,050	0,001	0,384	1,717	Sim
2	3	0,435	0,110	-0,064	0,934	Não
2	4	0,567	0,010	0,103	1,032	Sim
3	4	0,132	0,667	-0,181	0,446	Não

Lim. inf.: Limite inferior, Lim. Sup.: Limite superior.

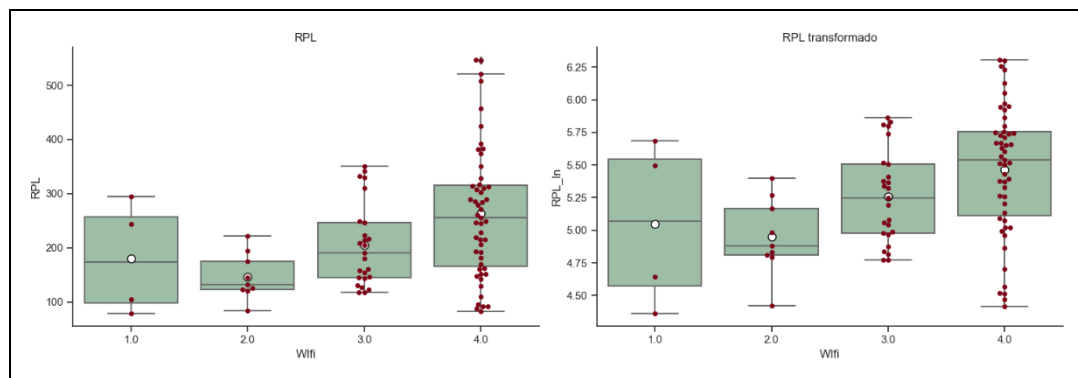
Fonte: Python, módulo *multi.MultiComparison.tukeyhsd*. *em termos do logaritmo natural

Os resultados do teste apontaram para a não diferença significativa da média do RNL das categorias 1 e 2, 2 e 3 e 3 e 4. Em termos práticos o valor médio RNL da categoria 1 difere das 3 e 4 e o da categoria 2 difere da 4.

4.3 Razão Plaqueta-Linfócito em Função do Escore Wifi

Foi possível verificar que a RPL variou entre 29,14% e 58,53% nas categorias do escore Wifi. As variâncias menores nas categorias podem indicar a possibilidade de associação entre elas. Antes da transformação, havia a presença de outliers na categoria 4 sendo corrigidos logo após (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Box-plot da razão plaqueta-linfócito, original e transformado, nas categorias do escore Wifi



Fonte: *Python*, módulo *sns.boxplot*

Com base no teste da ANOVA, a 95% de confiança, pode-se afirmar que pelo menos uma das médias da RPL nas categorias do escore Wifi (p -valor: 0,007) difere. Ou seja, há associação entre os níveis do valor RPL com as categorias mais altas do escore Wifi (Tabela 9).

Tabela 9 - Estatísticas descritivas de RPL em função das categorias de Wifi e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança

Categorias	Estatísticas Descritivas							ANOVA		ANOVA (com ln)	
	N.	Média	D.P.	Mín.	Mediana	Máx.	C.V. (%)	F	p-valor	F	p-valor
1	4,00	180,21	105,48	78,24	173,90	294,80	58,53	4,487	0,006	4,308	0,007
2	9,00	146,59	42,72	83,20	131,70	221,30	29,14				
3	25,00	204,83	76,13	118,00	190,40	351,10	37,17				
4	51,00	263,84	121,51	82,60	254,90	546,60	46,05				

D.P.: desvio padrão, C.V.: coeficiente de variação, F: estatística de teste da ANOVA.
Fonte: *Python*, módulo *groupby* e *ols*.

4.3.1 Pressupostos da ANOVA

Quanto a independência dos resíduos do modelo, é suficiente a suposição que as categorias são mutuamente exclusivas, ou seja, um indivíduo só pode pertencer a uma categoria. Além disso, os dados não são medidas repetidas (não coletadas ao longo do tempo), mas individualmente nos pacientes.

A suposição de normalidade também foi atendida, ao se aplicar o teste de Shapiro-Wilk ao modelo ANOVA com dados transformados, resultando em uma estatística de teste de 0,982 e p-valor de 0,269.

E a suposição de homogeneidade também foi atendida, ao se aplicar o teste de Bartlett que resultou em uma estatística de teste de 6,143 e p-valor de 0,105, não rejeitando assim a hipótese de igualdade de variância entre as categorias.

Atendidas todas as suposições do modelo ANOVA realizado no item anterior, com os dados da RPL transformados, é possível então validar a hipótese encontrada e prosseguir para um teste de comparação múltipla de médias.

Foi realizado então o teste Tukey HSD para conhecimento de quais as categorias do escore Wifi que são estatisticamente diferentes dos demais dentro da RPL (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados do teste de Tukey HSD para o escore Wifi e RPL, a 95% de confiança

Grupo 1	Grupo 2	Diferença*	p-valor	Lim. Inf.*	Lim. Sup.*	Rejeitar H0
1	2	-0,097	0,900	-0,809	0,615	Não
1	3	0,213	0,795	-0,425	0,851	Não
1	4	0,416	0,294	-0,200	1,032	Não
2	3	0,310	0,299	-0,151	0,771	Não
2	4	0,513	0,012	0,085	0,942	Sim
3	4	0,203	0,262	-0,086	0,493	Não

Lim. inf.: Limite inferior, Lim. Sup.: Limite superior

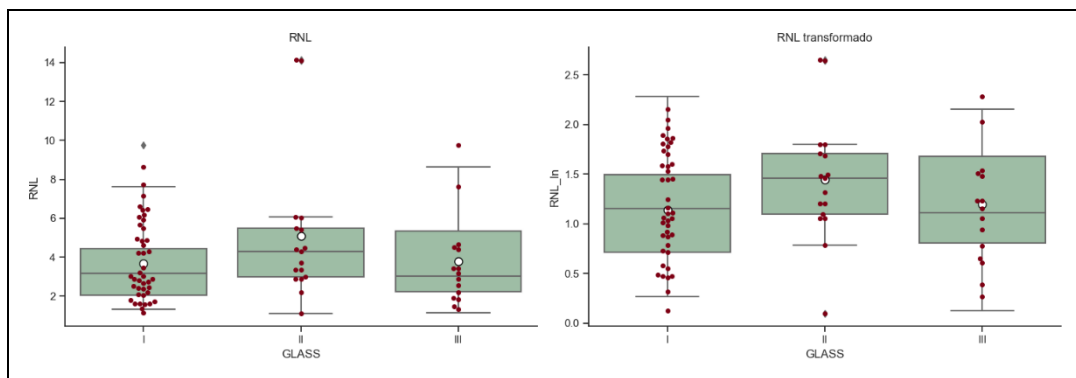
Fonte: Python, módulo *multi.MultiComparison.tukeyhsd*. *em termos do logaritmo natural

Os resultados do teste apontaram para a não diferença significativa da média das RPL da categoria 1 com as categorias 2, 3 e 4. A única diferença significativa foi encontrada entre as categorias 2 e 4. Logo, os valores médios da RPL das categorias 2 e 4 do escore Wifi apresentam diferenças, sendo possível afirmar que os valores mais altos do escore Wifi correspondem aos mais altos da RPL.

4.4 Razão Neutrófilo-Linfócito em Função do Escore GLASS

Foi possível verificar que a RNL variou entre 52% e 71% nas categorias do escore GLASS. As variâncias altas dentro das categorias podem indicar a possibilidade que não exista associação. Conforme a figura a seguir, os dados possuem a presença de *outliers* nos grupos II e III sendo corrigidos pela transformação na categoria III, mas não na II (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Box-plot da razão neutrófilo-linfócito, original e transformado, nas categorias do escore GLASS



Fonte: Python, módulo *sns.boxplot*

Com base no teste da ANOVA, a 95% de confiança, não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade das médias da RNL nas categorias do escore GLASS (p -valor: 0,241). Ou seja, não houve associação entre os níveis mais altos da RNL com as categorias mais altas do escore GLASS (Tabela 11).

Tabela 11 - Estatísticas descritivas de RNL em função das categorias de GLASS e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança

Categorias	Estatísticas Descritivas							ANOVA		ANOVA (com ln)	
	N.	Média	D.P.	Mín.	Mediana	Máx.	C.V. (%)	F	p-valor	F	p-valor
I	15,00	3,67	2,33	1,31	3,16	9,77	63,55	1,866	0,162	1,451	0,241
II	17,00	5,11	3,65	1,10	4,29	14,13	71,39				
III	42,00	3,80	1,99	1,13	3,03	8,65	52,28				

Fonte: *Python*, módulo *groupby* e *ols*.

D.P.: desvio padrão, C.V.: coeficiente de variação, F: estatística de teste da ANOVA.

Como a ANOVA não apresentou significância entre as categorias de GLASS para a RNL, foi realizado, nos dados originais de RNL, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com a finalidade de descartar de vez a hipótese. A estatística do teste Kruskal-Wallis foi de 2,335 e o p-valor de 0,311 o que comprova por este que as médias não apresentaram diferenças significantes.

4.4.1 Pressupostos da ANOVA

Quanto a independência dos resíduos do modelo, é suficiente a suposição que as categorias são mutuamente exclusivas, ou seja, um indivíduo só pode pertencer a uma categoria. Além disso, os dados não são medidas repetidas (não coletadas ao longo do tempo), mas individualmente nos pacientes.

A suposição de normalidade também foi atendida, ao se aplicar o teste de Shapiro-Wilk ao modelo ANOVA com dados transformados, resultando em uma estatística de teste de 0,990 e p-valor de 0,837.

E a suposição de homogeneidade também foi atendida, ao se aplicar o teste de Bartlett que resultou em uma estatística de teste de 0,406 e p-valor de 0,816, não rejeitando assim a hipótese de igualdade de variância entre as categorias.

Atendidas todas as suposições do modelo ANOVA realizado no item anterior, com os dados da RNL transformados, é possível então validar a hipótese encontrada e prosseguir para um teste de comparação múltipla de médias.

Mesmo não tendo encontrado significância estatísticas para rejeição da hipótese de igualdade de médias, foi realizado o teste de Tukey HSD para constatação final que as médias não diferem entre si (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados do teste de Tukey HSD para o escore GLASS e RNL, a 95% de confiança

Grupo 1	Grupo 2	Diferença*	p-valor	Lim. Inf.*	Lim. Sup.*	Rejeitar H0
I	II	0,302	0,293	-0,177	0,780	Não
I	III	0,056	0,900	-0,351	0,462	Não
II	III	-0,246	0,289	-0,634	0,142	Não

Lim. inf.: Limite inferior, Lim. Sup.: Limite superior

Fonte: Python, módulo *multi.MultiComparison.tukeyhsd*. *em termos do logaritmo natural

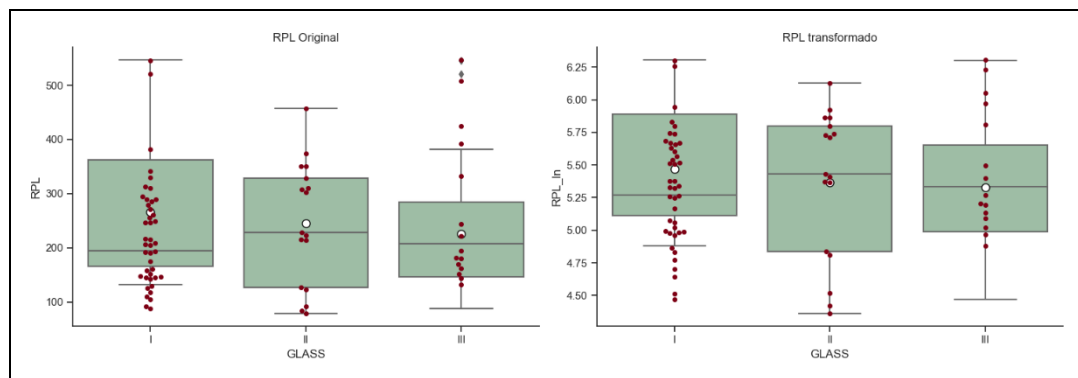
Os resultados do teste HSD de Tukey apontou que não existe diferença significativa da média da RNL entre as categorias I, II e III, com 95% de confiança.

Desta forma, não é possível afirmar que as categorias mais elevadas do escore GLASS são suficientes para representar os valores mais altos dos escores de neutrófilos-linfócitos.

4.5 Razão Plaqueta-Linfócito em Função do Escore GLASS

Foi possível verificar que a RPL variou entre 45% e 52% nas categorias do escore GLASS. As variâncias altas dentro das categorias podem indicar a possibilidade que não exista associação. Conforme a figura a seguir, os dados possuem a presença de *outliers* no grupo sendo corrigidos pela transformação (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Box-plot da razão plaqueta-linfócito, original e transformado, nas categorias do escore GLASS



Fonte: *Python*, módulo *sns.boxplot*

Com base no teste da ANOVA, a 95% de confiança, não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade das médias da RPL nas categorias do escore GLASS (p -valor: 0,616). Ou seja, não houve associação entre os níveis mais altos da RPL com as categorias mais altas do escore GLASS (Tabela 13).

Tabela 13 - Estatísticas descritivas de RPL em função das categorias de GLASS e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança

Categorias	Estatísticas Descritivas							ANOVA		ANOVA (com ln)	
	N.	Média	D.P.	Mín.	Mediana	Máx.	C.V. (%)	F	p-valor	F	p-valor
I	15,00	265,60	139,27	131,70	194,30	546,60	52,44	0,731	0,485	0,488	0,616
II	17,00	244,91	115,11	78,24	228,10	457,10	47,00				
III	42,00	225,55	102,12	87,40	207,30	545,10	45,28				

D.P.: desvio padrão, C.V.: coeficiente de variação, F: estatística de teste da ANOVA.
 Fonte: *Python*, módulo *groupby* e *ols*.

Como a ANOVA não apresentou significância entre as categorias de GLASS para a RPL, foi realizado, nos dados originais deste, o teste de Kruskal-Walis que resultou em uma estatística de teste de 0,967 e p-valor de 0,617 e, portanto, corrobora a hipótese que as médias não apresentaram diferenças significativas.

4.5.1 Pressupostos da ANOVA

Quanto a independência dos resíduos do modelo, é suficiente a suposição que as categorias são mutuamente exclusivas, ou seja, um indivíduo só pode pertencer a uma categoria. Além disso, os dados não são medidas repetidas (não coletadas ao longo do tempo), mas individualmente nos pacientes.

A suposição de normalidade também foi atendida, ao se aplicar o teste de Shapiro-Wilk ao modelo ANOVA com dados transformados, resultando em uma estatística de teste de 0,983 e p-valor de 0,426.

E a suposição de homogeneidade também foi atendida, ao se aplicar

o teste de Bartlett que resultou em uma estatística de teste de 1,735 e p-valor de 0,420, não rejeitando assim a hipótese de igualdade de variância entre as categorias.

Atendidas todas as suposições do modelo ANOVA realizado no item anterior, com os dados da RPL transformados, é possível então validar a hipótese encontrada e prosseguir para um teste de comparação múltipla.

Mesmo não tendo encontrado significância estatísticas para rejeição da hipótese de igualdade de médias, foi realizado o teste Tukey HSD para constatação final que as médias não diferem entre si (Tabela 14).

Tabela 14 - Resultados do teste de Tukey HSD para o escore GLASS e RPL, a 95% de confiança

Grupo 1	Grupo 2	Diferença*	p-valor	Lim. Inf.*	Lim. Sup.*	Rejeitar H0
I	II	-0,100	0,808	-0,504	0,305	Não
I	III	-0,142	0,581	-0,485	0,202	Não
II	III	-0,042	0,900	-0,371	0,286	Não

Lim. inf.: Limite inferior, Lim. Sup.: Limite superior

Fonte: Python, módulo *multi.MultiComparison.tukeyhsd*. *em termos do logaritmo natural

Os resultados do teste HSD de Tukey apontou que não existe diferença significativa da média da RPL entre as categorias I, II e III, com 95% de confiança.

Desta forma, não foi possível afirmar que as categorias mais elevadas do escore GLASS são suficientes para representar os valores mais altos dos escores de plaqueta-linfócito.

4.6 Comparação do Escore Wifi com GLASS

Foi realizado o teste qui-quadrado para verificar se há associação entre as categorias do escore GLASS com as do Wifi. Com 95% de confiança, com estatística do teste qui-quadrado de 2,27, 6 graus de liberdade e p-valor de 0,893, não é possível rejeitar a hipótese nula de independência entre as categorias. Desta maneira, o aumento no valor do escore GLASS não está associado ao aumento no valor do escore Wifi (Tabela 15).

Tabela 15 - Tabela de frequência entre as categorias do escore Wifi e GLASS e resultado do teste Qui-quadrado a 95% de confiança

Wifi	GLASS			Total	Qui-Quadrado		
	I	II	III		X	G.L.	p-valor
1	1	1	2	4	2,270	6	0,893
2	3	2	3	8			
3	3	5	12	20			
4	8	9	25	42			
Total	15	17	42	74			

Fonte: Python, módulo *scipy.stats.chi2_contingency* e *pd.crosstab*
G.L.: graus de liberdade, X: estatística de teste da Qui-quadrado

4.7 Análise de Variância de GLASS em Função do Wifi

Além disso, foi realizada a análise de variância com base nas categorias do escore Wifi para o escore GLASS. Procedeu-se a filtragem dos pacientes, pelos quais continha 4, 8, 20, 42 pacientes com escores Wifi 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Portanto, foram utilizadas apenas as categorias 3 e 4 por apresentarem mais indivíduos na amostra.

Antes de realizar a ANOVA foi verificada a presença de normalidade das variáveis RNL e RPL. Com 95% de confiança o valor RNL não apresentou normalidade quanto a categoria 3 do escore Wifi, assim como na categoria 4. Já o valor RPL obteve normalidade quando utilizada a categoria 3, mas inversamente ocorreu na categoria 4. Desta forma, foi necessária a aplicação da transformação de dados, sendo suficiente a do logaritmo natural (Tabela 16).

Tabela 16 - Teste de normalidade de Shapiro-Wilk aplicados aos dados originais e aos transformados para as categorias 3 e 4 de Wifi, com 95% de confiança

Transformação	Categoria Wifi	Variável	Obs.	Shapiro-Wilk		
				SW Stats	p-valor	Normal?
Dados Originais	3	RNL	20	0,791	0,001	Não
		RPL		0,914	0,074	Sim
	4	RNL	42	0,863	0,000	Não
		RPL		0,941	0,031	Não
Dados Transformados	3	ln(RNL)	20	0,969	0,725	Sim
		ln(RPL)		0,943	0,272	Sim
	4	ln(RNL)	42	0,983	0,792	Sim
		ln(RPL)		0,972	0,377	Sim

RNL: Razão neutrófilo-linfócito, RPL = Razão plaqueta-linfócito.

Fonte: *Python*, módulo *stats.shapiro*

Com os dados já transformados e constatada a presença de normalidade na variável resposta, foi aplicada então a ANOVA de tal modo que não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade das médias dos valores de RNL e RPL nas categorias do escore GLASS (p-valor: 0,249 e 0,789, respectivamente) para os pacientes de escore Wifi 3. Ou seja, dentre os

pacientes Wifl 3 não houve associação entre os níveis mais altos da RNL com as categorias mais altas do escore GLASS, mesmo comportamento na RPL (Tabela 17).

Também foi aplicada então a ANOVA para os pacientes com escore Wifl 4 de tal modo que não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade das médias dos valores de RNL e RPL nas categorias do escore GLASS (p-valor: 0,379 e 0,342, respectivamente). Ou seja, dentre os pacientes Wifl 4 não houve associação entre os níveis mais altos da RNL com as categorias mais altas do escore GLASS, mesmo comportamento na RPL (Tabela 18).

Tabela 17 - Estatísticas descritivas de RNL e RPL em função das categorias de GLASS com os pacientes de escore Wifi 3 e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança

Escore	Categorias GLASS	Estatísticas Descritivas							ANOVA		ANOVA (com ln)	
		N.	Média	D.P.	Mín.	Mediana	Máx.	C.V. (%)	F	p-valor	F	p-valor
RNL	I	3,00	2,90	1,61	1,47	2,57	4,65	55,75	1,651	0,221	1,508	0,249
	II	5,00	6,12	4,56	2,87	4,39	14,09	74,56				
	III	12,00	3,83	1,92	1,13	3,26	6,63	50,18				
RPL	I	3,00	218,47	100,22	143,50	179,60	332,30	45,87	0,295	0,748	0,240	0,789
	II	5,00	244,90	88,27	126,10	223,10	351,10	36,04				
	III	12,00	212,84	70,25	118,20	206,65	341,20	33,01				

D.P.: desvio padrão, C.V.: coeficiente de variação, F: estatística de teste da ANOVA, RNL: Razão neutrófilo-linfócito, RPL = Razão plaqueta-linfócito.

Fonte: *Python*, módulo *groupby* e *ols*

Tabela 18 - Estatísticas descritivas de RNL e RPL em função das categorias de GLASS com os pacientes de escore Wifi 4 e resultado do teste da ANOVA a 95% de confiança

Escore	Categorias GLASS	Estatísticas Descritivas							ANOVA		ANOVA (com ln)	
		N.	Média	D.P.	Mín.	Mediana	Máx.	C.V. (%)	F	p-valor	F	p-valor
RNL	I	8,00	4,59	2,69	1,91	3,43	9,77	58,76	0,975	0,386	0,995	0,379
	II	9,00	5,55	3,42	2,88	4,47	14,13	61,68				
	III	25,00	4,20	2,00	1,63	4,23	8,65	47,50				
RPL	I	8,00	317,19	168,21	151,60	286,90	546,60	53,03	1,323	0,278	1,103	0,342
	II	9,00	295,00	105,69	91,40	307,50	457,10	35,83				
	III	25,00	242,98	116,39	87,40	246,90	545,10	47,90				

D.P.: desvio padrão, C.V.: coeficiente de variação, F: estatística de teste da ANOVA, RNL: Razão neutrófilo-linfócito, RPL = Razão plaqueta-linfócito.
 Fonte: *Python*, módulo *groupby* e *ols*

Para finalizar, foi preciso verificar se os modelos de ANOVA, apresentados neste tópico, atendem as suposições que o teste necessita. Os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, para normalidade e homocedasticidade, demonstraram que os modelos executados conforme as Tabelas 17 e 18 atendem aos requisitos da ANOVA (Tabela 19).

Tabela 19 - Testes de normalidade e homocedasticidade dos modelos ANOVA dos pacientes Wifi 3 e 4

Wifi	Modelo ANOVA	Teste de Shapiro-Wilk		Teste Bartlett	
		Stat	p-valor	Stat	p-valor
3	ln(NL) ~ GLASS	0,975	0,857	0,018	0,991
	ln(PL) ~ GLASS	0,960	0,551	0,400	0,819
4	ln(NL) ~ GLASS	0,972	0,388	0,102	0,950
	ln(PL) ~ GLASS	0,975	0,482	0,312	0,856

Fonte: Python, módulo *stats.shapiro* e *np.log*

Devido não ter ocorrido associação no sentido de as médias das categorias do escore GLASS nos grupos de pacientes Wifi 3 e 4 serem equivalentes, não foi necessário aplicar o teste de HSD de Tukey.

A aplicação da ANOVA aos dados originais, sem transformação, não atende os pressupostos que o modelo necessita, logo não deve ser utilizada. Entretanto, se aplicada a transformação do logaritmo natural aos dados das variáveis respostas, as mesmas desenvolveram distribuição normal, e assim, pôde ser aplicada a ANOVA. Além disso, o modelo atendeu aos pressupostos.

Dito isto, é possível afirmar que ao aumentar as categorias do escore Wifi também corresponde um aumento no valor tanto do razão neutrófilo-linfócito e da razão plaqueta-linfócito, isto com 95% de confiança pela análise de variância (ANOVA).

Já o escore GLASS não apresentou diferença de médias significativas o suficiente para rejeitar hipótese de igualdade das médias tanto para a RNL quanto para a RPL. Desta forma, não se pode afirmar que as categorias mais elevadas do escore GLASS correspondem aos valores altos apresentados pelas RNL e RPL.

Não houve indícios suficientes para associar os escores Wifi e GLASS dos pacientes deste estudo. Tanto o teste Qui-quadrado, quanto a separação das categorias Wifi (3 e 4) e aplicação da ANOVA não demonstraram a presença de relação forte entre os escores.

5 DISCUSSÃO

5.1 A Respeito dos Resultados Obtidos

Os dados avaliados demonstram associação dos escores Wifl com marcadores de reação inflamatória. Estes marcadores são baseados em exames prontamente disponíveis, de fácil aplicação e já foram validados como marcadores eficazes de reação inflamatória.

Yoon *et al.* (2013) relatam que o RNL e o RPL mostraram-se melhores marcadores de avaliação da gravidade de bacteremia comparado ao exame de proteína C reativa (PCR), contagem total de leucócitos ou contagem absoluta de neutrófilos. Li *et al.* (2017) relatam que a RNL é um biomarcador facilmente calculado a partir da contagem diferencial do leucograma, mais estável para medição do que a contagem individual de parâmetros isolados do leucograma, menos afetado por condições que poderiam alterar a contagem individual de células e tem uma previsibilidade maior do que a contagem total de leucócitos ou neutrófilos como marcador em doenças cardiovasculares.

O uso desses biomarcadores como referência para situação inflamatória é então justificado, já que demonstraram sua validação, seu valor e mesmo a precocidade dos seus resultados, sendo, portanto, úteis para reconhecimento antecipado da gravidade do quadro.

Este trabalho demonstrou elevação significativas dos valores de

acordo com os grupos Wifl. Valores de corte destes biomarcadores, porém, ainda não se encontram padronizados. Bedel *et al.* (2019) avaliaram biomarcadores inflamatórios no momento da admissão de pacientes admitidos para tratamento de dissecção aórtica tipo A e considerou que o melhor valor de corte de RNL para prever a mortalidade hospitalar foi de 9,74, com sensibilidade de 70,6% e especificidade de 76,8%, enquanto o melhor valor de corte de RPL foi de 195,8, com sensibilidade de 76,5% e especificidade de 78,1%. Lecumberri *et al.* (2021) demonstraram que RNL > 3 pode ajudar a identificar pacientes com uma taxa de sobrevivência menor após reparo de aneurisma de aorta abdominal. Luo *et al.* (2015) observaram que a relação neutrófilo-linfócito pós-tratamento conservador é um fator preditivo independente para amputação em pacientes com isquemia crítica de membros. Pacientes com proporção de neutrófilo-linfócito pós-tratamento > 3.8 apresentaram maior incidência de amputação.

Taçoğlu *et al.* (2014) relataram que, na admissão de pacientes com isquemia crítica de membro inferior em tratamento conservador devido impossibilidade de terapêutica cirúrgica, níveis de RNL >3,2 e de RPL >160 eram fortes preditores de amputação. Gary *et al.* (2013) estudaram pacientes com doença arterial periférica e observou que evolução para isquemia crítica foi mais frequente em pacientes com RPL > 150 pacientes (410(45,9%)) em comparação com o RPL <150 (270(22,0%)) (p.0,001). Swamy *et al.* (2019) observaram que um RPL > 150 associado a um valor de razão monócito-neutrófilo < 5 se associou a um aumento da incidência da perda de membros em pacientes com doença arterial periférica.

Neste trabalho os valores médios da RNL nos grupos Wifl foi de 1,41 no grupo 1, 2,36 no grupo 2, 4,05 no grupo 3 e 4,49 no grupo 4. Os valores médios da RPL nos grupos Wifl foi de 180,2 no grupo 1, 146,5 no grupo 2, 204,8 no grupo 3 e 263,8 no grupo 4.

O escore WIFl calcula itens com maior pontuação considerando o risco de perda de membro aumentado quando tal fator se encontra presente, porém itens com mesma pontuação não implicam em resposta inflamatória similar. Uma úlcera extensa e profunda, com ITB de 0,4 e sem sinais de infecção, não representa necessariamente a mesma resposta que uma outra úlcera menor e superficial, com o mesmo ITB de 0,4 mas com sinais infecciosos graves. Porém, ambas pontuam na classificação Wifl como 4.

Essa variabilidade dentro de um mesmo escore poderia torná-lo inadequado para uma parametrização clínica do paciente, porém os dados demonstram elevação dos valores de forma proporcional a elevação dos biomarcadores inflamatórios.

Já o escore GLASS, representa uma análise da extensão das lesões na árvore arterial e consegue fazer recomendações adequadas a respeito das melhores modalidades de revascularização para cada caso. A extensão da lesão arterial no membro isquêmico, analisada de forma isolada, não demonstrou associação com os biomarcadores inflamatórios.

Uma proposta da pesquisa foi, dentro de um mesmo grupo de classificação Wifl (e, portanto, agrupando os pacientes com quadro clínico e gravidade similar), separar os pacientes por escore GLASS, para uma análise de subgrupos e determinar se o GLASS isoladamente poderia se

associar com os biomarcadores. Ou seja, se a extensão da lesão na árvore arterial se relaciona diretamente com aumento no quadro inflamatório e nos valores dos biomarcadores. Devido ao tamanho da amostra, tal análise só foi possível dentro do grupo de pacientes com escore Wifl 3 e 4, porém não foi observado relação entre essas variáveis.

5.2 A Respeito das Limitações do Estudo

O estudo apresenta como uma de suas limitações o tamanho de amostra. Apesar do grande volume de pacientes admitidos no setor de hemodinâmica do HUUFMA com isquemia crônica ameaçadora de membro inferior, uma amostra maior foi impossibilitada principalmente pela perda de grande número de casos por ITB incompressível ou acima de 1,4. Métodos mais modernos de avaliação da perfusão como pressão transcutânea de oxigênio, pressão arterial no hálux e pletismografia não se encontram disponíveis em nossa realidade para avaliação dessa parcela de pacientes. Métodos alternativos de análise, como medida do tempo de aceleração da artéria plantar pelo ecodoppler (Santos, 2021), não se encontram ainda validados. Uma parcela menor dos casos apresentava outras patologias associadas que os incluíam nos fatores de exclusão.

Outra limitação foi a impossibilidade de somar as lesões de segmento aortoilíaco do escore GLASS com as lesões infrainguinais, devido ao uso de dois escores separados, portanto, estes pacientes acabaram por ser analisados de forma separada.

5.3 Perspectivas Futuras

Os resultados sugerem relação importante que se pode realizar entre os parâmetros estudados e que o uso da razão neutrófilo-linfócito e razão plaqueta-linfócito pode ser utilizada como ferramenta auxiliar para avaliação clínica dos pacientes com isquemia ameaçadora de membro.

Novas pesquisas devem padronizar valores de corte para este grupo de pacientes para que seu uso possa ser aplicado na rotina clínica. O trabalho atual, junto com pesquisas prévias, sugere que uma razão neutrófilo-linfócito acima de 3 e razão plaqueta-linfócito acima de 150, podem funcionar como preditores eficientes de gravidade e de prognóstico.

6 CONCLUSÃO

Os biomarcadores inflamatórios calculados pelas razões neutrófilo-linfócito e plaqueta-linfócito apresentam elevação compatível com o estágio clínico da isquemia de membros inferiores.

7 ANEXO

Anexo A - Ficha protocolo

Hospital Universitário Unidade Presidente Dutra
Serviço de Hemodinâmica

Protocolo de Pesquisa Isquemia de Membro

Nome: _____

Reg: _____ Raça: _____ Idade: _____ Sexo: M F

Telefone: _____

Tempo de Doença Isquêmica: _____

HPP: Tabagismo atual Ex-tabagista HAS DLP
 DM IRC Doença coronariana
 DPOC Outros: _____

Resultados de exames laboratoriais:

Hemograma			Outros exames
Eritrócitos: mi/mm ³	Leucócitos: /mm ³	Plaquetas: /mm ³	Ureia:
Hemoglobina: g/dl	Neutrófilos: /mm ³	VPM: fL	Creatinina:
Hematócrito: %	Eosinófilos: /mm ³		Sódio:
VCM: fL	Basófilos: /mm ³		Potássio:
HCM: pg	Linfócitos: /mm ³		INR:
CHCM: g/dL	Monócitos: /mm ³		TAP:
RDW: %			TTPa:

Escores no pré-operatório:

Neutrófilo-Linfócito _____

Plaqueta-Linfócito _____

SSVV: FC = _____ FR = _____ TAX = _____ PA = _____

Valores do Escore WiFi

Úlcera	Isquemia	Infecção

Estágio WiFi: 1 2 3 4

Valores do Escore GLASS

Segmento femoropoplíteo	Segmento infrapoplíteo

Escore GLASS: I II III

8 REFERÊNCIAS

Al-Osami MH, Awadh NI, Khalid KB, Awadh AI. Neutrophil/lymphocyte and platelet/lymphocyte ratios as potential markers of disease activity in patients with Ankylosing spondylitis: a case-control study. *Adv Rheumatol*. 2020;60(1):13.

Beckman JA, Schneider PA, Conte MS. Advances in revascularization for peripheral artery disease: revascularization in PAD. *Circ Res*. 2021;128(12):1885-912

Bedel C, Selvi F. Association of platelet to lymphocyte and neutrophil to lymphocyte ratios with in-hospital mortality in patients with type a acute aortic dissection. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2019;34(6):694-8

Boos CJ, Toon LT, Almahdi H. The relationship between ambulatory arterial stiffness, inflammation, blood pressure dipping and cardiovascular outcomes. *BMC Cardiovasc Disord*. 2021;21(1):139

Cerqueira LO, Duarte EG, Barros ALS, Cerqueira JR, de Araújo WJB. Wifl classification: the Society for Vascular Surgery lower extremity threatened limb classification system, a literature review. *J Vasc Bras*. 2020;19:e20190070.

Coelho NH, Coelho A, Augusto R, Semião C, Peixoto J, Fernandes L, Martins V, Canedo A, Gregório T. Pre-operative neutrophil to lymphocyte ratio is associated with 30 day death or amputation after revascularisation for acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2021;62(1):74-80.

Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, White JV, Dick F, Fitridge R, Mills JL, et al. Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2019;58(1S):S1-S109.e33.

Gary T, Pichler M, Belaj K, Hafner F, Gerger A, Froehlich H, Eller P, Rief P, Hackl G, Pilger E, Brodmann M. Platelet-to-lymphocyte ratio: a novel marker for critical limb ischemia in peripheral arterial occlusive disease patients. *PLoS One.* 2013;8(7):e67688.

Gasparyan AY, Ayvazyan L, Mukanova U, Yessirkepov M, Kitas GD. The Platelet-to-Lymphocyte Ratio as an Inflammatory Marker in Rheumatic Diseases. *Ann Lab Med.* 2019;39(4):345-57

Haga M, Shindo S, Motohashi S, Nishiyama A, Kimura M, Inoue H, Akasaka J. Early evaluation of the infrainguinal revascularization strategy selection tool of the Global Vascular Guidelines for chronic limb-threatening ischemia patients. *J Vasc Surg.* 2021;74(4):1253-60.e2.

Hata Y, Iida O, Asai M, Masuda M, Okamoto S, Ishihara T, Nanto K, Kanda T, Tsujumura T, Okuno S, Matsuda Y, Takahara M, Mano T. Risk stratification for 2-year mortality in patients with chronic limb-threatening ischemia undergoing endovascular therapy. *J Atheroscler Thromb.* 2021;28(5):477-82.

Hicks CW, Canner JK, Karagozlu H, Mathioudakis N, Sherman RL, Black JH 3rd, Abularrage CJ. The Society for Vascular Surgery Wound, Ischemia, and foot Infection (WIFI) classification system correlates with cost of care for diabetic foot ulcers treated in a multidisciplinary setting. *J Vasc Surg.* 2018;67(5):1455-62.

Kim TI, Vartanian SS, Schneider PA. A Review and Proposed Classification System for the no-option patient with chronic limb-threatening ischemia. *J Endovasc Ther.* 2021;28(2):183-93.

Ko DE, Yoon HJ, Nam SB, Song SW, Lee G, Ham SY. Preoperative Neutrophil to Lymphocyte Ratio, Platelet to Lymphocyte Ratio, and Mean Platelet Volume as Predictors of 1-Year Mortality in Patients Undergoing an Open Repair of Abdominal Aortic Aneurysms: A Retrospective Study. *J Clin Med.* 2021;10(22):5410.

Lecumberri E, Ruiz-Carmona C, Mateos E, Galarza A, Subirana I, Clara A. Prognostic value of inflammatory biomarkers in 5-year survival after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms in a predominantly male cohort: implications for practice. *World J Surg.* 2021;45(6):1949-55.

Li H, Lu X, Xiong R, Wang S. High neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts cardiovascular mortality in chronic hemodialysis patients. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9327136.

Luo H, Yuan D, Yang H, Yukui M, Huang B, Yang Y, Xiong F, Zeng G, Wu Z, Chen X, Wang T, Luo H, Zhao J. Post-treatment neutrophil-lymphocyte ratio independently predicts amputation in critical limb ischemia without operation. *Clinics (Sao Paulo)*. 2015;70(4):273-7.

Maffei FH, Lastória S, Yoshida WB, Rollo HA, Giannini M, Moura R. *Doenças vasculares periféricas*, 5ª ed.. São Paulo: Gen/Guanabara, 2016.

Mills JL Sr, Conte MS, Armstrong DG, Pomposelli FB, Schanzer A, Sidawy AN, Andros G; Society for Vascular Surgery Lower Extremity Guidelines Committee. The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification System: risk stratification based on wound, ischemia, and foot infection (WIFI). *J Vasc Surg*. 2014;59(1):220-34.e1-2.

Morisaki K, Matsubara Y, Yoshino S, Kurose S, Yamashita S, Furuyama T, Mori M. Validation of the GLASS Staging Systems in Patients With Chronic Limb-Threatening Ischemia Undergoing De Novo Infrainguinal Revascularization. *Ann Vasc Surg*. 2022;81:378-86.

Pereira-Neves A, Fragão-Marques M, Rocha-Neves J, Gamas L, Oliveira-Pinto J, Cerqueira A, Andrade J, Fernando-Teixeira J. The impact of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in carotid artery disease. *Port J Card Thorac Vasc Surg*. 2021;28(1):45-51.

Santos, Guilherme de Castro. *Correlação entre o tempo de aceleração plantar, o índice tornozelo braquial e os escores svf-wifi em pacientes com isquemia crônica ameaçadora do membro* [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2021.

Swamy V, Raksha R, Rajagopalan S. Comparative study between lymphocyte-monocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio: novel markers for critical limb ischemia in peripheral arterial disease. *Int Surg J*. 2019;6(10):3638-42.

Taşoğlu İ, Sert D, Colak N, Uzun A, Songur M, Ecevit A. Neutrophil-lymphocyte ratio and the platelet-lymphocyte ratio predict the limb survival in critical limb ischemia. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2014;20(6):645-50.

Tokuda T, Oba Y, Koshida R, Suzuki Y, Murata A, Ito T. Prediction of the technical success of endovascular therapy in patients with critical limb threatening ischaemia using the global limb anatomical staging system. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2020;60(5):696-702.

Valga F, Monzón T, Henriquez F, Santana-Del-Pino A, Antón-Pérez G. Platelet-to-lymphocyte and neutrophil-to-lymphocyte ratios as markers of erythropoietin resistance in chronic haemodialysis patients: a multicentre cross-sectional study. *Nefrologia (Engl Ed)*. 2020;40(3):320-7.

Vela-Orús MP, Gaztambide-Sáenz MS,. Chronic limb-threatening ischemia (CLTI) in diabetic patients: looking at the big picture beyond wound, ischemia and foot infection (WIFI) Classification System. In: Grigsby J, Derbel F. editors. *The eye and foot in diabetes*. London: IntechOpen; [Internet]. 2020 [citado em 2022 out 2022]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/71882>

Wijnand JGJ, Zarkowsky D, Wu B, van Haelst STW, Vonken EPA, Sorrentino TA, Pallister Z, Chung J, Mills JL, Teraa M, Verhaar MC, de Borst GJ, Conte MS. The Global Limb Anatomic Staging System (GLASS) for CLTI: Improving Inter-Observer Agreement. *J Clin Med*. 2021;10(16):3454.

Yamada T, Shibahara T, Nagase M, Ono D, Tanabe G, Suzuki K, Yamaura M, Ido T, Nakashima T, Takahashi S, Aoyama T. Validation of the correlation between angiosome-based target arterial path, mid-term limb-based patency, and the global limb anatomical staging system. *Heart Vessels*. 2022;37(3):496-504.

Yilmaz A, Ozkul A. Admission neutrophil to lymphocyte and platelet to lymphocyte ratio as a predictor of mortality in patients with Subarachnoid Hemorrhage. *Turkish J Cerebrovasc Dis*. 2018;24(1):19-25.

Yoon NB, Son C, Um SJ. Role of the neutrophil-lymphocyte count ratio in the differential diagnosis between pulmonary tuberculosis and bacterial community-acquired pneumonia. *Ann Lab Med*. 2013;33(2):105-10.