



**MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
COORDENAÇÃO DE ENSINO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

ANA CATARINA ROMANO E SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM
ENXERTOS UTILIZADOS EM PACIENTES DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS
SUBMETIDOS À REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO**

RIO DE JANEIRO

2016

ANA CATARINA ROMANO E SILVA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM
ENXERTOS UTILIZADOS EM PACIENTES DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS
SUBMETIDOS À REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Cardiovasculares, do Instituto Nacional de
Cardiologia, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares.

Orientador: Dr. Daniel Arthur Barata Kasal

Co-orientador: Dr. Glauber Monteiro Dias

RIO DE JANEIRO

2016

ANA CATARINA ROMANO E SILVA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM
ENXERTOS UTILIZADOS EM PACIENTES DIABÉTICOS E NÃO DIABÉTICOS
SUBMETIDOS À REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências
Cardiovasculares, do Instituto Nacional de
Cardiologia, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciências
Cardiovasculares.

Aprovada em 17 de junho de 2016.

Antônio Carlos Campos de Carvalho, Dr., UFRJ

Alexandre Siciliano Colafranceschi, Dr., INC

Luiz Eduardo de Macedo Cardoso, Dr., UERJ

Bernardo Rangel Tura, Dr., INC (1º Suplente)

Wille Oigman, Dr., UERJ (2ª Suplente)

S586a Silva, Ana Catarina Romano e

Análise da expressão de biomarcadores inflamatórios em enxertos utilizados em pacientes diabéticos e não diabéticos submetidos à revascularização do miocárdio / Ana Catarina Romano e Silva. – Rio de Janeiro, 2016.

77 f.

Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências Cardiovasculares) Instituto Nacional de Cardiologia - INC

1. Aterosclerose. 2. Diabetes mellitus. 3. Enxerto arterial I. Título.

CDU- 616.1

Dedico esse trabalho à minha filha Ana Luiza, que ainda não nasceu, mas que já faz parte do meu mundo. Que você possa acreditar nas pessoas e na capacidade de evoluirmos cada dia mais.

Agradeço

Primeiramente a meus pais João Gilberto e Maria Regina que sempre me apoiaram em todos os momentos,

A meu marido Luiz Carlos, que esteve ao meu lado durante todo o tempo, aguentando meu mau humor, acolhendo meus medos e me incentivando de uma maneira doce só dele,

Aos meus orientadores Daniel e Glauber. Obrigada Daniel por me aceitar como orientada e me apresentar a este projeto que abracei de corpo e alma, por sua dedicação, disponibilidade e extrema paciência. Glauber, obrigada por encampar a ideia, pelos ensinamentos e puxões de orelha (todos foram válidos, mesmo quando eu fazia cara feia...)

Aos cirurgiões que colaboraram com o projeto Dr. Oscar Reis Brito, Dr Rodrigo Coelho Segalote, Dr. Carlos Eduardo Pereira Dantas e Dr. Ivan Antônio Machado de Paula, sempre disponíveis para coletar as amostras do estudo,

A minha chefe Fabiana, que é muito mais uma amiga e que me entende como uma irmã,

A Cleusa, que além de colega e amiga segurou muitas pontas para que eu conseguisse concluir esta etapa,

As minhas queridas amigas Cyntia, Alaíde, Anne e Rafaela que sempre estiveram disponíveis para tudo o que eu precisasse e que me emprestaram seus ombros e ouvidos nos muitos momentos de cansaço e desespero,

Aos professores e colegas de turma do mestrado, que tornaram esta jornada ainda mais especial,

Aos pacientes que aceitaram participar do estudo,

E a Dinara, que foi minha primeira orientadora, há muito tempo atrás, quando eu ainda era IC... Por ter me apresentado o mundo da farmácia e da pesquisa acreditando em mim e no meu potencial.

Finalmente agradeço aos membros da banca, os doutores Antônio Carlos Campos de Carvalho, Alexandre Siciliano, Luiz Eduardo de Macedo Cardoso, Wille Oigman e Bernardo Rangel Tura, por terem aceitado avaliar meu trabalho, engrandecendo-o com seus pareceres e sugestões.

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!

Mario Quintana

RESUMO

Introdução: Sabe-se que os pacientes diabéticos apresentam uma progressão da doença aterosclerótica mais acentuada que não-diabéticos. A inflamação, o estresse oxidativo e a deposição de matriz extracelular na parede do vaso são descritos como pontos-chave na fisiopatologia da aterosclerose, em pesquisas feitas principalmente com modelos animais. Existem poucos estudos analisando estes parâmetros em artérias de médio calibre de pacientes diabéticos e comparando com não-diabéticos.

Objetivos: Avaliar a presença dos marcadores inflamatórios fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1), fator nuclear kappa B (NF- κ B), as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e óxido nítrico sintase na forma induzida (iNOS) e do colágeno e fibras elásticas presentes na parede vascular, do enxerto utilizado na CRVM em DM e NDM buscando relações entre resultados obtidos com parâmetros-clínicos dos grupos estudados.

Metodologia: foram incluídas no estudo amostras de enxerto arterial de 23 pacientes masculinos que realizaram CRVM no Instituto Nacional de Cardiologia entre dezembro de 2014 e dezembro de 2015. As análises de expressão dos marcadores inflamatórios foram realizadas através de quantificação relativa por reação em cadeia da polimerase (qPCR) em tempo real e imunohistoquímica (IHQ). Foram realizadas ainda colorações para colágeno e fibras elásticas no tecido de enxerto.

Resultados: Os dados clínicos demonstraram que os grupos de DM e NDM eram clinicamente semelhantes, com exceção da existência de *diabetes mellitus*. A mediana da idade do grupo DM foi de 59 anos e do grupo NDM foi de 64,5 anos. Os pacientes diabéticos apresentaram maior elevação de troponina T no pós-operatório com mediana de 5,81 mg/dL enquanto o grupo NDM apresentou mediana de 2,62 mg/dL. Os resultados obtidos por qPCR não mostraram diferença estatística entre os grupos analisados, embora tenha havido um aumento na expressão de CAT de 84% no grupo de DM quando comparado com os NDM. Os marcadores NF- κ B, SOD e TGF- β apresentaram aumentos na expressão entre 12 e 33% no grupo DM. Em IHQ também não houve diferença estatística entre os grupos. O percentual da área do corte histológico marcada para o NF- κ B apresentou no grupo NDM uma mediana de 55,09% e nos DM 46,91%, o TGF- β com mediana de 45,46% para os NDM e 56,15% para os DM e o TNF- α com mediana de 54,95% para NDM e 68,88% para DM. A mediana da área do corte histológico marcada para o colágeno foi de 77,90% para NDM e 77,50% para DM, e as fibras elásticas tiveram mediana de 56,52% no grupo de NDM e 69,20% no grupo de DM.

Conclusões: A avaliação de marcadores relacionados com a inflamação e estresse oxidativo em fragmentos de artéria torácica interna, não apresentou diferenças ao compararmos pacientes coronariopatas diabéticos *versus* não-diabéticos. Acreditamos que o pequeno tamanho amostral analisado pode ter contribuído para a ausência de resultados com significância estatística.

Palavras-chave: Aterosclerose, *diabetes mellitus*, enxerto arterial, qPCR, imunohistoquímica, inflamação e estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: It is known that diabetic patients have a more severe progression of atherosclerotic disease than non-diabetics. Inflammation, oxidative stress and extracellular matrix deposition in the vessel wall are described as key points in the pathophysiology of atherosclerosis, particularly in research made with animal models. There are few studies analyzing these parameters in arteries of medium caliber and diabetic patients compared to non-diabetics.

Objectives: To assess the presence of inflammatory markers tumor- α necrosis factor (TNF- α), transformer- β 1 growth factor (TGF- β 1), nuclear factor kappa B (NF- κ B), the enzymes superoxide dismutase (SOD) catalase (CAT) and nitric oxide synthase in inducible form (iNOS) and of the collagen and elastic fibers present in the vascular wall in the graft used in CABG of DM and NDM searching for relationships between results obtained with clinical parameters of the studied groups.

Methodology: arterial graft samples from 23 male patients who underwent CABG at the National Institute of Cardiology between December 2014 and December 2015 were included in the study. The evaluation of inflammatory markers expression was performed using relative quantification by real time polymerase chain reaction (qPCR) and immunohistochemistry (IHC). Staining was performed for collagen and elastic fibers in the graft tissue.

Results: Clinical data demonstrated that DM and NDM groups were clinically similar with the exception of the existence of diabetes mellitus. The median age of the DM group was 59 years and the NDM group was 64.5 years. Diabetic patients had higher troponin T elevation postoperatively with a median of 5.81 mg / dL while the NDM group had a median of 2.62 mg / dL. The results obtained by qPCR showed no statistical difference among the groups, although there was an increase in CAT expression of 84% in the DM group compared with NDM. The markers NF- κ B, SOD and TGF- β showed increases in expression between 12 and 33% in the DM group. In IHC we also did not find statistical difference between the groups. The percentage of the area marked in histologic sections for NF- κ B in NDM group showed a median of 55.09% and of 46.91% in DM, for TGF- β a median of 45.46% in NDM and 56.15 % in DM and TNF- α with a median of 54.95% in NDM and 68.88% in DM. The median of the histological section area marked for collagen was 77.90% and 77.50% for NDM and DM, respectively, and elastic fibers had a median of 56.52% in the NDM group and 69.20% in DM group.

Conclusions: The evaluation of markers related to inflammation and oxidative stress in internal thoracic artery fragments showed no differences when comparing diabetic coronary patients versus non-diabetics. We believe that the small sample size analyzed may have contributed to the lack of results with statistical significance.

Keywords: Atherosclerosis, diabetes mellitus, arterial graft, qPCR, immunohistochemistry, inflammation and oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabelas

Tabela 1. Mediadores inflamatórios derivados de células e suas participações na reação inflamatória	21
Tabela 2: sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados no estudo	37
Tabela 3: Eficiência calculada para as reações de amplificação	43
Tabela 4: Dados clínicos da população (variáveis numéricas) agrupados em não diabéticos (NDM) e diabéticos (DM)	49
Tabela 5: Dados clínicos da população (variáveis categóricas) agrupados em não diabéticos (NDM) e diabéticos (DM)	51
Tabela 6: Quantificação dos marcadores realizada por técnicas de IHQ e coloração	53

Figuras

Figura 1: Identificação das túnicas de artérias de grande e médio calibre	24
Figura 2: Esquema das camadas arteriais	25
Figura 3: fotografia de gel feito com o produto de amplificação dos iniciadores testados	38
Figura 4: Curva de eficiência de reação do iniciador para SOD	39
Figura 5: Curvas de eficiência de reação dos iniciadores para CAT, TNF- α e TGF- β	40
Figura 6: Curva de eficiência de reação do iniciador para NF-kB, iNOS e GAPDH.....	41
Figura 7: Gráficos para cálculo das eficiências e equação utilizadas	42
Figura 8: Diagrama de fluxo para captação de amostras	48
Figura 9: Comparativo entre as expressões dos marcadores analisados nos grupos de diabéticos (DM) e não diabéticos (NDM)	52
Figura10: Imagens dos campos de leitura das lâminas de pacientes DM e NDM processadas para o marcador TNF- α (núcleos corados com hematoxilina)	54
Figura11: Imagens dos campos de leitura das lâminas de pacientes DM e NDM processadas para o marcador NF-kB e TGF- β (núcleos corados com hematoxilina).....	54
Figura12: Imagens dos campos de leitura das lâminas de pacientes DM e NDM coradas para colágeno e fibras elásticas	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido Acetil Salicílico
ATI	Artéria Torácica Interna
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CAT	Catalase
cDNA	DNA Complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cl cr	<i>Clearance</i> de Creatinina
CN	Controle Negativo
CRP	<i>C-Reactive Protein</i> (Proteína C Reativa)
CRVM	Cirurgia de Revascularização do Miocárdio
CTC	Centro de Tecnologia Celular
DAB	Diaminobenzidina
DCV	Doenças Cardiovasculares
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIC	Doença Isquêmica do Coração
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo II
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxiribonucléico)
ECO FE	Fração de Ejeção por Ecocardiograma
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i> (Gliceraldeído 3 Fosfato Desidrogenase)
GPx	Glutationa Peroxidase
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HF	Histórico Familiar
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de Adesão Intercelular – 1)

IDL	<i>Intermediary Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Densidade Intermediária)
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
IHQ	Imunohistoquímica
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corporal
INC	Instituto Nacional de Cardiologia
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase Induzível)
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Baixa Densidade)
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> (Proteíno-quinases Ativadas por Mitógenos)
MEC	Matriz Extra Celular
miRNA	MicroRNA
N	Número Amostral
NDM	Paciente Não Diabético
NF-KB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i> (Fator de Transcrição Nuclear Kappa B)
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> (Óxido Nítrico Sintase)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
P.O	Pós-Operatório
qPCR	<i>Polimerase Chain Reaction quantitative</i> (Reação Quantitativa em Cadeia da Polimerase)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucléico)
RNU 48	RNA ribossomal 48
RT-PCR	PCR em Tempo Real
SOD	Superóxido Dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGC	Triglicerídeos
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i> (Fator de Transformação do Crescimento <i>beta</i>)

TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alfa</i> (Fator de Necrose Tumoral alfa)
usCRP	<i>Ultra-Sensitive C-Reactive Protein</i> (Proteína C Reativa Ultra Sensível)
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de Adesão Celular Vascular – 1)
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade)
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cell</i> (Células de Músculo Liso Vascular)
V.V	Concentração de Volume por Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HClO	Ácido hipocloroso
NO	Óxido Nítrico
NO_3^-	Peroxinitrito
$O_2^{\bullet -}$	Ânion Superóxido
OH^-	Radical Hidroxila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Doenças cardiovasculares no Brasil e no mundo	19
2.2. Fisiopatologia da Inflamação	19
2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e o Estresse Oxidativo	22
2.2.2 Estrutura dos vasos sanguíneos e seus constituintes	24
2.3 Fisiopatologia da aterosclerose	26
2.4 A cirurgia de revascularização do miocárdio	28
2.5 O paciente diabético submetido à CRVM	30
3. JUSTIFICATIVA	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo Geral	32
4.2 Objetivos Específicos	32
5. METODOLOGIA	33
5.1 Aspectos bioéticos	33
5.2 Desenho do estudo	33
5.3 Critérios de Inclusão	34
5.4 Critérios de Exclusão	34
5.5 Processamento das amostras e análises realizadas	34
5.6 Da extração de RNA à quantificação por qPCR	35
5.6.1 Extração do RNA	35
5.6.2 Síntese de cDNA	36
5.6.3 Teste de funcionalidade dos iniciadores	36
5.6.4 Definição da concentração de iniciadores	38
5.6.5 Cálculo da eficiência de cada reação	39
5.6.6 Quantificação por qPCR	43
5.7 Imunohistoquímica e coloração	45
5.8 Análise Estatística	46
6. RESULTADOS	47
6.1 Dados da população analisada	47
6.2 Resultados da análise por qPCR	52

6.3 Imunohistoquímica e coloração.....	53
7. DISCUSSÃO	56
8. CONCLUSÕES	59
9. REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICES.....	64
APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	65
APÊNDICE B: Formulário utilizado para captação das variáveis clínicas do paciente	67
APÊNDICE C: Descrição detalhada da técnica de IHQ utilizada para detecção e quantificação dos marcadores inflamatórios estudados	70
APÊNDICE D: Fluxograma das etapas da técnica de coloração para detecção de colágeno por Picro-sirius Red	71
APÊNDICE E: Fluxograma das etapas da técnica de coloração para detecção de fibra elástica por Resorcina + Fucsina Weigert	72
ANEXOS	73
Anexo I: Parecer Consubstanciado do CEP	74

1. INTRODUÇÃO

Pacientes diabéticos tendem a apresentar maiores índices de mortalidade a longo prazo, bem como maior risco de revascularizações de repetição quando o enxerto utilizado é o de safena (1) Entre os fatores que potencialmente contribuem para esta característica é o fato destes pacientes apresentarem um quadro de inflamação sistêmica mais acentuada do que pacientes não diabéticos (2).

Poucos estudos publicados até o momento enfocam possíveis diferenças na expressão de marcadores inflamatórios em vasos arteriais de médio calibre de pacientes diabéticos comparando com não diabéticos. O presente trabalho se propõe avaliar a presença de diferentes marcadores inflamatórios e pró-inflamatórios em fragmentos de artéria torácica interna (ATI) utilizada como enxerto na cirurgia de revascularização do miocárdio (CRVM) em pacientes diabéticos (DM) e não diabéticos (NDM).

A ATI é o enxerto de escolha para revascularização da artéria coronária descendente anterior esquerda. No entanto, enxertos de veia safena continuam sendo os mais comumente usados devido à disponibilidade e comprimento do vaso. Mesmo sabendo que a ATI possui taxas de oclusão e obsolescência muito inferiores aos enxertos de safena, a escolha por este tecido deve-se à similaridade estrutural com as coronárias (3). Acreditamos que as possíveis alterações moleculares que possam existir no fragmento estudado representem as alterações no sistema vascular podendo elucidar aspectos da fisiopatologia da aterosclerose no paciente diabético.

Estas informações podem, no futuro, auxiliar na elaboração de um prognóstico mais preciso para o paciente operado, podendo inclusive influenciar nas estratégias a serem empregadas com cada paciente.

Os marcadores inflamatórios escolhidos para análise de expressão foram o fator de necrose tumoral- α (TNF- α ¹), o fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1²), o fator nuclear kappa B (NF- κ B³). Já o estresse oxidativo foi avaliado através da expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e óxido

¹ *Tumor necrosis factor alfa,*

² *Transforming growth factor beta 1,*

³ *Nuclear transcription factor kappa B,*

nítrico sintase na forma induzível (iNOS⁴). Estes alvos foram selecionados por atuarem em diferentes pontos das vias de sinalização celular associadas com a aterosclerose, participando de forma direta ou indireta das cascatas inflamatórias e disfunção endotelial. Adicionalmente, avaliamos o estado da matriz extracelular da parede do vaso, através da microscopia ótica e coloração para colágeno e fibras elásticas.

As técnicas utilizadas para determinação da expressão destes marcadores foram de quantificação relativa por reação em cadeia da polimerase (PCR⁵) em tempo real e imunohistoquímica (IHQ).

Pretendemos com este trabalho identificar se existem diferenças nas expressões dos marcadores selecionados, entre pacientes diabéticos e não diabéticos, nos fragmentos de enxertos de ATI utilizados em pacientes submetidos a CRVM.

⁴ *Inducible nitric oxide synthase*

⁵ *Polimerase Chain Reaction*

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças cardiovasculares no Brasil e no mundo

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no Brasil. A doença isquêmica do coração (DIC) destaca-se como a segunda mais frequente DCV em nosso país (4). Segundo dados extraídos do departamento de informática do Sistema Único de Saúde – DATASUS, a DIC representou no ano de 2012 mais de 50 internações a cada 10.000 habitantes com mais de 50 anos, apenas em hospitais públicos do Sistema Único de Saúde (SUS) (5).

Nos Estado Unidos da América (EUA), a taxa global de mortes atribuíveis às DCV em 2013 foi de 222,9 por 100 000 americanos chegando a quase 270 indivíduos para o sexo masculino. Apesar deste valor ter diminuído nos últimos 10 anos, em 2013 representou 30,8% de todas as mortes nos EUA. Destas, 35% ocorreram em pessoas com idade inferior a 75 anos (6).

Dentre as DIC, o infarto agudo do miocárdio (IAM) é a causa isolada de morte mais comum em homens e mulheres (7). Estima-se que a cada ano aproximadamente 660.000 americanos têm o primeiro IAM, e que aproximadamente 305.000 ter um infarto de repetição (6).

2.2. Fisiopatologia da Inflamação

Sabe-se que o IAM é precipitado, na maioria das vezes, pela formação de trombos intravasculares que surgem mediante a ruptura de placas de aterosclerose, ocluindo de forma aguda o lúmen das artérias coronárias (8). A aterosclerose é caracterizada como uma doença inflamatória crônica, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Sua origem é multifatorial, mas se inicia com a disfunção endotelial (9).

Para que se possa ter um entendimento mais profundo sobre a aterosclerose e os mecanismos desencadeados por ela é necessário compreender inicialmente os processos inflamatórios aos quais estamos sujeitos(10).

A inflamação é uma reação complexa que pode ocorrer em diferentes tecidos, sendo constituída por mecanismos moleculares e celulares que o organismo utiliza

para tentar controlar estímulos reconhecidos como agressores pelo organismo (11). Entre estes mecanismos encontram-se diversos mediadores, derivados de células ou proteínas plasmáticas (12), que atuam como indutores e inibidores no desenvolvimento e controle dos processos inflamatórios (13).

Sabendo que a aterosclerose corresponde a um estado de inflamação crônica, é importante identificar os fatores que estimulam o desenvolvimento e progressão desta patologia. A disfunção endotelial representa um passo-chave no desencadeamento e manutenção da aterosclerose (13).

A disfunção endotelial é um processo complexo caracterizado por vasoconstrição e favorecimento a trombose vascular. Contribuem para essa condição, entre outros mediadores, algumas citocinas, espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas de adesão celular e fatores de crescimento (11).

O TNF- α é uma das principais citocinas que modulam a inflamação, atuando concomitantemente com outros fatores. Seus efeitos no endotélio induzem uma série de mudanças no tecido, denominadas de ativação ou indução endotelial (11). O TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão celular, como a molécula de adesão da célula vascular (VCAM⁶) e a molécula de adesão intercelular (ICAM⁷), na superfície do endotélio vascular. O aumento na expressão destas moléculas de adesão também envolve a ativação do fator de transcrição NF-kB (13).

O TNF- α também reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) nas células endoteliais, prejudicando assim a vasodilatação endotélio-dependente e favorecendo a disfunção endotelial (14). O NO é um importante mediador vasoativo fundamental no controle do tônus vascular. Atua também como um potente mensageiro intercelular influenciando fortemente a cascata inflamatória (15).

Outro mediador envolvido nos processos inflamatórios e de disfunção endotelial é o TGF- β . Este fator pertence a uma família de pelo menos 30 membros e o TGF- β 1 é o mais amplamente distribuído em mamíferos, podendo ser produzido por diferentes tipos celulares como plaquetas, células endoteliais, linfócitos e macrófagos (11).

O TGF- β 1 é um peptídeo multifuncional que desempenha, entre outras funções, importante papel na proliferação, migração celular e produção da matriz extracelular, o que indica um papel crítico na patogênese do remodelamento

⁶ *Vascular cell adhesion molecule*

⁷ *Intercellular adhesion molecule*

vascular que ocorre, por exemplo, na aterosclerose (16). Desempenha também o papel de importante agente fibrinogênico, estimulando a quimiotaxia dos fibroblastos e aumentando a produção de colágeno, fibronectinas e proteoglicanos ao mesmo que inibe a degradação de colágeno (11).

Outro fator que está envolvido na cascata inflamatória é o NF-kB. Sua via de sinalização regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e proteínas de adesão, incluindo TNF- α , interleucina-6 (IL-6) e ICAM-1, modulando a inflamação vascular, o recrutamento de células imunes e a formação de células espumosas (17).

O NF-kB desempenha o papel de integrador de sinalização nos processos de lesão vascular. É responsável por controlar a aderência de leucócitos e quimiotaxia, além de ativar monócitos através da indução da citocina IL-6 (18). O NF-kB pode ser ativado por ERO e então induzir a expressão do TNF- α nas células endoteliais (12).

Na Tabela 2 são apresentados alguns mediadores que são avaliados neste trabalho, suas principais fontes e ações que desempenham.

Tabela 1. Mediadores inflamatórios derivados de células e suas participações na reação inflamatória

Mediador	Principais Fontes	Ações
TNF- α	Macrófagos, células endoteliais, mastócitos	Ativação endotelial local (expressão de moléculas de adesão), resistência vascular diminuída (choque).
Espécies Reativas de Oxigênio	Leucócitos	Morte de microorganismos, dano tecidual.
Óxido Nítrico	Endotélio, macrófagos	Relaxamento da musculatura lisa vascular, morte de microrganismos.
TGF- β	Plaquetas, células endoteliais, linfócitos e macrófagos	Remodelamento vascular (proliferação e migração celular, síntese de colágeno).
NF-kB	Expressão universal	Integrador de sinal na lesão endotelial.

Fonte: Adaptação de Robbins & Conran, 8ª ed - (11)

2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio e o Estresse Oxidativo

Concentrações moderadas de ERO são importantes para as vias de sinalização de processos fisiológicos e a manutenção da homeostase redox, fundamental para a fisiologia celular. O aumento na concentração destas espécies gera o estresse oxidativo (19).

ERO são radicais livres derivados do oxigênio. Os radicais livres são, por definição, espécies químicas que possuem um elétron não pareado na sua órbita externa, capazes de desencadear reações autocatalíticas convertendo outras espécies também em radicais livres. Podem promover a peroxidação lipídica das membranas celulares, degradação de proteínas e causar danos ao DNA (11).

A principal fonte de geração de ERO é a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (19) durante a respiração celular e geração de energia (11), mas existem outras fontes destas moléculas reativas como enzimas oxiredutases, síntese do NO e metabolismo enzimático realizado pelo citocromo P450 (19), além de grandes quantidades produzidas por neutrófilos e macrófagos, para destruição de microrganismos, remoção de tecido necrótico ou outras substâncias indesejadas pelo organismo (11).

As ERO geradas incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o próprio NO, radicais lipídicos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) e o peroxinitrito (NO_3^{\cdot}) (20). O potente radical oxidante NO_3^{\cdot} , derivado da interação entre NO e o radical superóxido, contribui para o prejuízo da função endotelial (13, 21). Portanto a presença de ERO pode interferir rapidamente com a sinalização realizada pelo NO além de diminuir a biodisponibilidade deste importante vasodilatador (22).

O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS⁸), constitutivamente pela forma endotelial (eNOS⁹) e de forma induzida pela (iNOS¹⁰) (21). A isoforma iNOS não é detectada em condições basais no endotélio (23). Estudos recentes demonstraram aumento na expressão gênica da iNOS em células endoteliais humanas extraídas de cordão umbilical expostas a níveis elevados de glicose (21).

⁸ Nitric oxide synthase,

⁹ Endothelial nitric oxide synthase,

¹⁰ Inducible nitric oxide synthase

O TNF- α afeta a biodisponibilidade do NO através dos seguintes processos: aumento da atividade da enzima NADPH-oxidase (que produz radical superóxido), regulação negativa da eNOS e indução da expressão da forma patológica iNOS (24).

Entretanto o tecido vascular é dotado de mecanismos de defesa antioxidante para neutralizar os efeitos prejudiciais das ERO. As enzimas SOD, CAT e glutathione peroxidase (GP_x) atuam diretamente sobre as ERO, transformando-as em espécies menos reativas (20). Estas três enzimas fazem parte da primeira linha de defesa contra ERO e uma diminuição na sua atividade contribui para a elevação do estresse oxidativo celular, estando associada com a ocorrência de DAC em estudos clínicos (25).

As SODs representam a mais importante linha enzimática de defesa antioxidante contra ERO, catalisando a conversão do ânion superóxido para H₂O₂ e O₂. Três isoformas distintas de SOD foram identificadas no tecido vascular: SOD1, localizada no citoplasma, SOD2, nas mitocôndrias e SOD3, nos peroxissomos (20).

Para comprovar a importância destas enzimas antioxidantes na fisiologia normal, estudos realizados com ratos completamente deficientes em SOD2 mostram letalidade na fase embrionária, ou em algumas semanas após o nascimento (22).

A CAT é uma enzima catalítica altamente eficaz que atua de forma complementar à SOD. Localiza-se principalmente em peroxissomos, mas também funciona no citosol, atua catalisando a conversão de H₂O₂ em água após a dismutação do radical superóxido pela SOD. Estudos indicam que uma deficiência hereditária na função da CAT está associada a elevado risco cardiovascular e aumento da incidência de diabetes *mellitus* (20).

Quando estes mecanismos de defesa não são suficientes para controlar a ação dos radicais livres, entre eles as ERO, e manter um equilíbrio adequado entre as atividades pró e antioxidantes, ocorre estresse oxidativo e a disfunção endotelial (19, 22).

É importante acrescentar que citocinas inflamatórias, incluindo o TNF- α , induzem significativamente o aumento na produção de ERO em doenças inflamatórias. O TNF- α é capaz de aumentar a atividade de enzimas oxidativas elevando a síntese de superóxido por neutrófilos e células endoteliais (13).

As ERO, especialmente as provenientes do metabolismo mitocondrial, estimulam a ativação de moléculas mediadoras de sinalização como o NF- κ B, que por sua vez vai regular a produção de citocinas inflamatórias como o TNF- α , mediadores como iNOS (19) e moléculas de adesão endotelial (13).

Esse mecanismo de estímulo interdependente entre as ERO e alguns fatores inflamatórios contribui para disfunção endotelial e manutenção da aterosclerose.

2.2.2 Estrutura dos vasos sanguíneos e seus constituintes

Os vasos são constituídos por células endoteliais, células musculares lisas e matriz extracelular (MEC), composta principalmente por elastina, colágeno e proteoglicanos (11). Nos vasos sanguíneos, o colágeno é responsável por conferir resistência à pressão exercida pelo fluxo sanguíneo. Já as fibras elásticas, compostas por microfibrilas e elastina conferem flexibilidade aos vasos, permitindo que haja expansão e retração dos mesmos conforme necessidade (26)

É possível distinguir em vasos de grande e médio calibre, particularmente em artérias, três camadas concêntricas denominadas de túnicas íntima, média e adventícia (figura 1).

Figura 1: Identificação das túnicas de artérias de grande e médio calibre

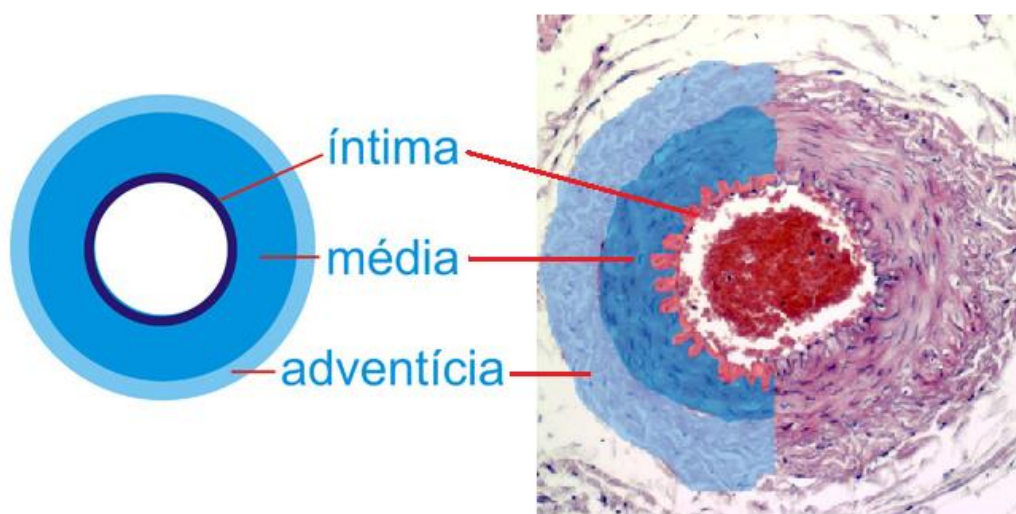
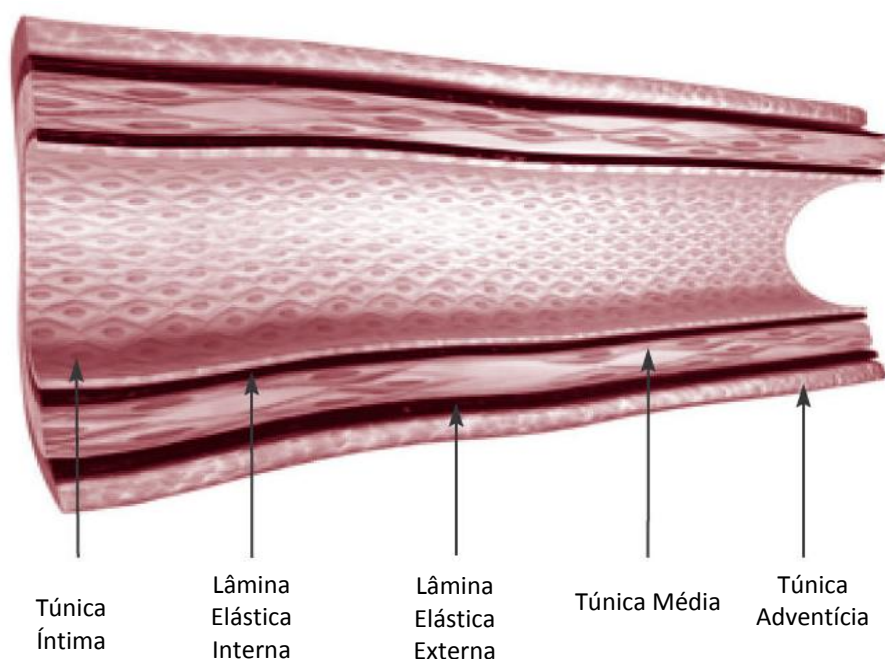


Foto: artéria de médio calibre corada com H&E (hematoxilina e eosina), fotografada em pequeno aumento [não especificado]. Fonte: Adaptação de MOL: Microscopia On Line – Guia Interativo de Histologia (<http://www.icb.usp.br/mol/> acessado em 27/03/2016)

Em artérias normais, a camada íntima consiste de uma única camada de células endoteliais com um mínimo de tecido conjuntivo subjacente. Ela é separada da túnica média por uma densa membrana elástica chamada de lâmina elástica interna. No limite externo da lâmina média, da maioria das artérias, existe uma lâmina elástica bem definida e, externamente a ela, é localizada a túnica adventícia (figura 2) (11).

Figura 2: Esquema das camadas arteriais



Fonte: Ashley EA, Niebauer J. Cardiology Explained. [Adaptado]. London: Remedica; 2004. Figura 11. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2216/figure/A348/>. Acessado em 13/07/2016.

As artérias utilizadas neste estudo são classificadas como artérias elásticas de médio calibre, com diâmetro variando entre 1,9 e 2,6mm, em adultos, e espessura de parede de 180 a 430 microns. Distúrbios vasculares, como aterosclerose, acometem este tipo vascular com frequência muito inferior aos enxertos provenientes de safena (27). Contudo, fragmentos de ATI obtidos durante a CRVM oferecem a uma oportunidade ainda pouco explorada de avaliar tecido vascular humano estruturalmente semelhante às artérias coronárias de pacientes.

Estudos realizados com fragmentos dissecados de aorta ascendente de pacientes com aterosclerose grave caracterizaram uma alteração na microestrutura do vaso causada por uma modificação no teor de elastina e redução das fibras de elastina interlaminares, bem como tendência de aumento do colágeno tipo I e III. Já o tipo IV parece ser defeituoso particularmente acima da placa intimal (26).

2.3 Fisiopatologia da aterosclerose

A disfunção endotelial é a lesão precursora de um processo inflamatório e degenerativo que culmina com a formação da placa de aterosclerose e de trombos vasculares. Dentre os indutores da ativação endotelial estão as citocinas, o estresse hemodinâmico e produtos lipídicos, críticos para a patogenia da aterosclerose (11).

O endotélio vascular exerce funções autócrinas, parácrinas e endócrinas, afetando vários tipos celulares, além de regular o tônus vascular através de mediadores vasoativos, principalmente o NO (28).

Estudos com animais e em seres humanos detectaram que a hiperglicemia, seja por períodos prolongados ou transitórios, prejudica a função endotelial macro e microvascular (20). A disfunção endotelial é característica precoce e fator preditor de complicações cardiovasculares em indivíduos com *diabetes mellitus* tipo II (DM2) (21).

Nas fases iniciais da aterosclerose, interleucinas, interferons, fatores estimulantes de colônias e fatores de necrose tumoral (TNF¹¹) são os principais promotores da disfunção das células endoteliais. Estudos demonstraram que as ações do TNF- α e IL-1 regulam positivamente a interação endotélio-leucócitos induzindo a expressão de E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 na superfície das células endoteliais expostas ao estímulo inflamatório sendo responsáveis pela atração de linfócitos e monócitos para a parede arterial, além de alterar a permeabilidade vascular induzindo a fosforilação da caderina e orientar alterações estruturais no citoesqueleto de actina ativando proteína quinase C e MAP quinase¹². O TNF- α é capaz de induzir apoptose através da ativação de caspases e indução de iNOS em células endoteliais (24).

As citocinas, mediadores importantes do sistema imune desempenham um papel fundamental em todas as fases da aterosclerose. A disfunção endotelial está intimamente relacionada com estados pró-oxidantes e o processo de inflamação vascular (29).

A formação da placa aterosclerótica está associada a diversos fatores de risco, tais como a elevação plasmática de lipoproteínas aterogênicas como a

¹¹ Tumor Necrosis Factor

¹² Mitogen Activated Protein Kinases

lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL¹³), a lipoproteína de baixa densidade rica em colesterol (LDL¹⁴) e a lipoproteína de densidade intermediária (IDL¹⁵). A aterosclerose também tem como fatores de risco a hipertensão arterial, o DM, a obesidade e o tabagismo. Durante a disfunção endotelial ocorre a retenção das lipoproteínas no espaço subendotelial, onde posteriormente vão sofrer oxidação. Este evento causa a formação de diversos neo-epítomos, tornando a placa aterosclerótica imunogênica (30).

Chegando à camada íntima das artérias, os monócitos se diferenciam em macrófagos, que vão captar as moléculas de LDL oxidada circulantes na corrente sanguínea. Os macrófagos passam a ser denominados células espumosas e vão promover a progressão da doença aterosclerótica através de diferentes mecanismos (31).

As células espumosas passam a liberar mais citocinas, ERO e fatores de remodelamento tecidual, conduzindo assim o recrutamento de mais células inflamatórias e acentuando a lesão. O TNF- α liberado intraplaca exerce papel de destaque como promotor da inflamação e progressão da aterosclerose (24).

Estímulos desencadeados no tecido vascular convergem para a ativação do fator de transcrição NF- κ B, amplificando a injúria local (18). O NF- κ B é um fator de transcrição que regula múltiplos genes pró-inflamatórios e pró-ateroscleróticos alvos em células vasculares de músculo liso (VSMC¹⁶) e macrófagos (20). A hiperglicemia desencadeia também o aumento da expressão de NF- κ B, que leva a um aumento do estresse oxidativo, prejudicando a biodisponibilidade de NO. Como resultado, fatores de crescimento, pró-coagulantes e citocinas inflamatórias têm sua síntese amplificada, induzindo e promovendo a aterogênese (28). Em revisão publicada recentemente, o NF- κ B é considerado como um dos fatores de transcrição mais importantes na modulação das respostas inflamatórias em enxertos venosos (3),

Mas os papéis exatos das vias de sinalização do NF- κ B na aterosclerose não estão completamente esclarecidos, pois se identificou o desempenho de ações tanto pró como anti-aterogênicas. Isto reflete, provavelmente, os papéis complexos que este mediador desempenha no controle da resposta inflamatória (17)

¹³ *Very low density lipoprotein*

¹⁴ *Low density lipoprotein*

¹⁵ *Intermediary density lipoprotein*

¹⁶ *Vascular smooth muscle cell*

Um dos mecanismos patogênicos que contribui para a progressão da lesão aterosclerótica é a produção local de ERO. As ERO estão relacionadas com a degradação de moléculas biologicamente ativas, tais como proteínas e lipídios (32).

Com a evolução do processo aterosclerótico, a migração e proliferação de células musculares lisas da camada média para a íntima do vaso, formam a capa fibrosa do ateroma. A eventual ruptura desta capa expõe o material lipídico altamente trombogênico, levando assim à formação de um trombo sobrejacente (9).

Alguns biomarcadores são avaliados rotineiramente em pacientes que apresentam IAM. Os exemplos mais comuns são as troponinas cardíacas e a fração MB da creatina quinase. Estas moléculas são produzidas nos cardiomiócitos e permitem o diagnóstico de necrose cardíaca na fase aguda do infarto (33).

Já a CRP é um marcador sensível, apesar de ser pouco específico, produzido no fígado a partir de estímulos do TNF- α e da IL-6. Assim, a CRP ativa a cascata complemento que regula os processos inflamatórios (33), além de estar presente em placas ateroscleróticas (28). É reconhecida como parte da avaliação de risco cardiovascular global e também inibe a expressão da eNOS em pacientes diabéticos, atenuando a produção de NO, além aumentar a expressão de moléculas de adesão edotelial (28).

As enzimas cardíacas permitem estabelecer o diagnóstico de infarto do miocárdio, enquanto que a CRP auxilia na estratificação do risco cardiovascular global do paciente coronariopata (34).

Outra opção de acompanhamento do quadro clínico do paciente com comprometimento cardíaco é realizar uma abordagem de avaliação através de múltiplos marcadores para estimar o risco cardiovascular, contendo marcadores inflamatórios e marcadores de risco cumulativos obtidos a partir de testes não invasivos. Essa abordagem teria um poder preditivo superior de estratificação do risco do que um único marcador (35).

2.4 A cirurgia de revascularização do miocárdio

A cirurgia de revascularização do miocárdio (CRVM) envolve o emprego de enxertos arteriais ou venosos. Consiste em uma estratégia amplamente utilizada para o tratamento da aterosclerose coronariana avançada (36). A variação

apresentada no tempo de recuperação, complicações pós-cirúrgicas e sobrevida dos pacientes submetidos à CRVM é muito significativa. Atualmente são analisados o histórico médico do paciente e familiar, o estilo de vida, possíveis comorbidades associadas e o *performance status* para avaliar o prognóstico do paciente (37).

Na busca por ferramentas que possam determinar o prognóstico do paciente submetido à CRVM, têm-se desenvolvido diferentes modelos de estratificação de risco. Entre os sistemas disponíveis para avaliar o risco de morte em cirurgia cardíaca, o EuroScore é um dos mais utilizados (38).

O modelo EuroScore atribui pesos a cada fator de risco. São avaliados fatores relacionados ao paciente (ex.: idade, sexo, cirurgias cardíacas prévias, endocardite ativa), fatores relacionados à condição cardíaca do paciente (ex.: presença de angina instável, infarto recente), além de fatores relacionados à cirurgia (ex.: emergência, cirurgia cardíaca de grande porte realizada previamente). A pontuação é obtida e convertida em uma porcentagem aproximada da mortalidade prevista (39).

Estudos mostram que ao comparar a sobrevida de pacientes que utilizaram enxertos de veia safena com pacientes que fizeram uso enxertos de artéria torácica interna (ATI), após 10 anos de acompanhamento, 75% dos pacientes que possuíam enxerto venoso apresentaram obstrução do mesmo. Já o enxerto de ATI mostrou permeabilidade superior a 90% no mesmo período de acompanhamento (40).

A chamada falha ou oclusão do enxerto vascular, em especial os constituídos de veia safena, pode se manifestar clinicamente como novos eventos cardíacos, incluindo necessidade de nova cirurgia, ocorrência de IAM ou óbito do paciente. A partir desta constatação, alguns estudos tentam buscar novos exames complementares que auxiliem na identificação de pacientes com risco de oclusão do enxerto. O desenvolvimento de um painel clinicamente validado de biomarcadores com valor preditivo pode trazer informações prognósticas valiosas para a redução da mortalidade após a CRVM (41).

A diretriz de avaliação perioperatória da sociedade brasileira de cardiologia reconhece que aumentos na dosagem de troponina associadas à realização do eletrocardiograma seriado até o terceiro dia pós-operatório é a melhor estratégia para o diagnóstico de IAM neste período. Entretanto, elevações isoladas de

troponina estão associadas a maior taxa de eventos cardiovasculares e menor sobrevida a longo prazo, mesmo sem evidências clínicas de isquemia ou alterações eletrocardiográficas (42).

2.5 O paciente diabético submetido à CRVM

As complicações cardiovasculares são a principal causa de mortalidade em pacientes diabéticos (43). As oclusões dos enxertos vasculares utilizados em CRVM são mais comuns nos pacientes diabéticos (44).

Os mecanismos associados com a aceleração da aterosclerose no DM envolvem o aumento do estresse oxidativo e a exacerbação da reação inflamatória local (45). Até hoje, existem poucos estudos em humanos avaliando a atividade inflamatória *in situ*, em segmentos vasculares utilizados na cirurgia de revascularização do miocárdio.

Biomarcadores tornaram-se cada vez mais utilizados nas duas últimas décadas, na intenção de ampliar o cuidado global com o paciente. São utilizados na detecção precoce de doença subclínica, diagnóstico de síndromes agudas ou crônicas, estratificação de risco, além poder monitorar a eficácia terapêutica.

Novos biomarcadores potenciais têm sido profundamente estudados na área da medicina cardiovascular. No entanto, apenas um número limitado de biomarcadores demonstrou significativo impacto terapêutico e/ou prognóstico.

Estudos demonstram que os níveis elevados de alguns agentes vasoativos pró-aterogênicos podem ser utilizados como biomarcadores para DAC, assim como a redução de níveis circulantes de agentes vasoativos anti-aterogênicos (46).

Recentes estudos descobriram biomarcadores, dosados em sangue periférico, que podem ser utilizados na determinação do prognóstico de pacientes que sofreram cirurgia cardiorácica. Como exemplo pode-se citar a molécula de adesão CD62E, as interleucinas inflamatórias IL-1, 6 e 8, além da citocina TNF- α . Na cascata de coagulação, pode ser avaliada a anti-trombina III (34).

3. JUSTIFICATIVA

A artéria mamária, ou ATI, tem se mostrado um modelo adequado para investigações das alterações ateroscleróticas arteriais, uma vez que a composição da sua matriz, função endotelial e bioquímica reflete alterações que ocorrem nas coronárias e carótidas, bem como em outros vasos do sistema circulatório (47).

Avaliar a expressão de marcadores inflamatórios no enxerto de revascularização pode ser um passo importante para o desenvolvimento de um painel de marcadores individuais que auxiliem na construção de um prognóstico mais preciso para paciente operado. Adicionalmente, permite avaliar o estado de inflamação arterial *in situ* em artérias de médio calibre de diabéticos, comparando com não-diabéticos.

Em estudo realizado recentemente, onde foram avaliados fragmentos de ATI de pacientes diabéticos e não diabéticos, constatou-se diferença na expressão de proteínas no tecido arterial analisado por proteômica quantitativa, com destaque para as proteínas da matriz (47).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar, através de expressão gênica e imunohistoquímica, biomarcadores presentes em enxertos vasculares de artéria torácica interna (ATI) utilizados nas cirurgias de revascularização do miocárdio, em homens maiores de 18 anos, diabéticos e não diabéticos, realizadas no Instituto Nacional de Cardiologia (INC).

4.2 Objetivos Específicos

I - Avaliar a expressão dos marcadores inflamatórios TNF- α , TGF- β 1 e NF- κ B; das enzimas antioxidantes SOD e CAT, da enzima iNOS e a deposição na parede vascular de colágeno e fibras elásticas em enxertos de ATI utilizados na cirurgia de revascularização do miocárdio.

II – Caracterizar as populações estudadas através de coleta de dados clínicos em prontuário.

III – Correlacionar os dados obtidos (clínicos e experimentais) a fim de obter informações que possam fornecer evidências que auxiliem na tomada de decisões clínicas a serem empregadas.

5. METODOLOGIA

5.1 Aspectos bioéticos

Este estudo está registrado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INC sob o número 33705614.2.0000.5272, aprovado segundo o parecer 875.906 no dia 17/11/2014, conforme anexo I.

Todos os pacientes participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), apresentado no apêndice A, após terem sido esclarecidos sobre os procedimentos experimentais conforme determinações institucionais e da Resolução nº 96/196 do Conselho Nacional de Saúde.

5.2 Desenho do estudo

O presente trabalho é um estudo transversal realizado com amostra de conveniência. A população do estudo consiste de pacientes do sexo masculino que receberam, em ordem consecutiva, indicação eletiva de CRVM com uso de ATI através de avaliação feita por equipe multidisciplinar no INC, e que tiveram o procedimento realizado por um dos cirurgiões colaboradores no período entre dezembro de 2014 e dezembro de 2015.

Todos os pacientes participantes foram submetidos à entrevista, realizada no dia anterior à cirurgia, onde foram explicados os termos de aceitação do estudo, e então coletado o TCLE. Neste encontro também foram colhidos dados da história clínica do paciente e realizada a medida da circunferência abdominal (feita no ponto médio entre o último arco intercostal e crista ilíaca).

Após consentimento, foram coletados dados no prontuário do paciente pertinentes ao estudo como dados antropométricos, presença de DM, hipertensão, tabagismo¹⁷, etilismo¹⁸ (48), histórico familiar positivo relacionado com pais e irmãos, IAM ou acidente vascular cerebral (AVC) prévio, farmacoterapia em uso, dados de ecocardiograma e cinecoronariografia pré-operatórios e análises bioquímicas

¹⁷ Foi considerado ex-fumante o paciente que parou de fumar completamente a seis meses, ou mais.

¹⁸ Foi considerado etilista o paciente classificado como paciente que consome álcool pelo menos uma vez por semana.

também pré-operatórias, além de dosagem máxima de troponina T¹⁹ avaliada no pós-operatório (até 48h). O formulário utilizado para captação das variáveis clínicas dos pacientes encontra-se no Apêndice B.

5.3 Critérios de Inclusão

Como critérios de inclusão, os pacientes deveriam ser do sexo masculino, maiores de 18 anos, que autorizaram a sua inclusão no estudo através de assinatura do TCLE, com indicação eletiva para CRVM no INC, com uso de ATI para construção do enxerto.

Para evitar grande variabilidade na técnica de coleta e manipulação do enxerto apenas foram analisadas as amostras coletadas pelos cirurgiões colaboradores do estudo.

5.4 Critérios de Exclusão

Como critérios de exclusão, os pacientes não poderiam ter insuficiência renal crônica com indicação permanente de diálise, serem portadores de quadro infeccioso em atividade nem de doenças crônicas tais como lúpus, artrite reumatoide, hepatite B e C e HIV, nem fazer uso de medicações imunossupressoras.

5.5 Processamento das amostras e análises realizadas

A avaliação da expressão dos marcadores estudados foi realizada através de duas técnicas distintas, a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR²⁰), ou PCR em Tempo Real, e IHQ. A quantificação por qPCR foi executada no Laboratório de Biologia e Diagnósticos Moleculares no Centro de Tecnologia Celular da Coordenação de Ensino e Pesquisa do INC. A análise por IHQ foi realizada no

¹⁹ O dado de troponina máxima considerado no estudo foi o maior valor obtido no pós-operatório imediato (até 48h), sendo a frequência e tempo de coleta determinados pela equipe médica da UTI pós-operatória.

²⁰ *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

Laboratório de Ultraestrutura em Biologia Tecidual localizado no Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em colaboração com o projeto.

Os objetos de estudo foram fragmentos vasculares de ATI, também denominada de artéria mamária, excedentes do procedimento cirúrgico. Os resultados obtidos foram agrupados em diabéticos (DM) e não-diabéticos (NDM).

Os fragmentos de ATI foram coletados em tubo contendo 25mL de tampão fosfato-salino (PBS²¹), previamente esterilizado com filtro 0,22µm, encaminhado ao centro cirúrgico em isopor com gelo. Após a coleta cirúrgica, o fragmento era imediatamente levado ao laboratório de Biologia Molecular para dissecação, processamento e fixação da amostra.

Primeiramente os fragmentos foram dissecados, em placa de vidro sobre gelo, para remoção de tecido muscular e conjuntivo e posterior fracionamento. Uma das porções era fixada imediatamente em paraformaldeído 4% em PBS (v/v). A outra porção era pesada e congelada imediatamente com nitrogênio líquido, macerada minuciosamente até total pulverização. Esta maceração fez-se necessária para otimizar a extração de RNA.

Foi padronizada a utilização de porções de 20mg a 40mg para a realização da extração do RNA. Identificou-se que porções deste tamanho são suficientes para obter quantidades desejáveis de RNA.

5.6 Da extração de RNA à quantificação por qPCR

5.6.1 Extração do RNA

A extração do RNA do tecido pulverizado foi realizada utilizando o kit de extração MIRVANA (Life Technologies). Este kit permite extrair frações distintas de RNA, uma enriquecida com RNAs²² pequenos, menores de 100pb, e outra contendo os fragmentos maiores de RNA. As frações enriquecidas em RNAs pequenos poderão ser utilizadas em estudos futuros.

²¹ *Phosphate buffered saline*

²² *small RNA*

O processamento foi realizado conforme protocolo fornecido pelo kit, resultando em duas frações de RNA de cada amostra, que foram quantificadas a 260nm em espectrofotômetro (Eppendorf) e encaminhadas para síntese do DNA complementar (cDNA).

5.6.2 Síntese de cDNA

A técnica de quantificação por qPCR utiliza o DNA complementar, ou cDNA, às cadeias de RNA extraídas. Para a síntese do cDNA das amostras utilizou-se o kit High Capacity (Life Technologies). Devido a necessidade de grande volume de cDNA para a realização das quantificações com PCR em Tempo Real (RT-PCR).

Para estas reações de PCR foi padronizada a utilização do RNA em concentração de 2ng/ μ L, previamente diluídos em água ultrapura, tratada com dietilpircarbonato (DEPC), que inibe a degradação do RNA em suspensão. O equipamento utilizado foi um termociclador (Biocycler) e a programação utilizada para a reação foi 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5s, conforme recomendado pelo kit High Capacity.

O cDNA sintetizado foi quantificado à 260nm e após congelado a -20°C para posterior utilização.

5.6.3 Teste de funcionalidade dos iniciadores

Para realizar a quantificação dos marcadores por qPCR é necessário utilizar iniciadores que amplifiquem regiões de cada um dos genes de interesse correspondentes.

Para as análises dos marcadores TNF- α , TGF- β , NF- κ B, iNOS, SOD e CAT foi necessária a utilização de um gene endógeno como referência. Este tipo de gene possui uma expressão estável sob diferentes situações testadas. Com ele é possível fazer a normalização dos dados, ou seja, a correção de possíveis variações entre as amostras analisadas. A normalização dos resultados obtidos com controle endógeno é atualmente o método mais utilizado para redução de possíveis erros na execução da técnica de RT-PCR (49). O presente trabalho utilizou como controle endógeno o

gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH²³), gene amplamente utilizado neste tipo de quantificação.

Os iniciadores utilizados possuem as seguintes sequências senso (*forward*) e antissenso (*reverse*) e os respectivos tamanhos de fragmento sintetizados (em pares de base) também são apresentados na tabela 3.

Tabela 2: sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados no estudo

Marcador		Tamanho amplicon
SOD2 F:	5' – CTG GAC AAA CCT CAG CCC TA – 3'	62 pb
SOD2 R:	5' – TGA TGG CTT CCA GCA ACT C – 3'	
CAT F:	5' – AGT GAT CGG GGG ATT CCA GA - 3'	159 pb
CAT R:	5' – AAG TCT CGC CGC ATC TTC AA – 3'	
TNF- α F:	5' – GTT CCT CAG CCT CTT CTC CT – 3'	186 pb
TNF- α R:	5' – ACA ACA TGG GCT ACA GGC TT – 3'	
TGF- β 1 F:	5' – TGA ACC GGC CTT TCC TGC TTC TCA TG – 3'	151 pb
TGF- β 1 R:	5' – GCG GAA GTC AAT GTA CAG CTG CCG C – 3'	
NF- κ B F:	5' – AAA CAC TGT GAG GAT GGG ATC TG – 3'	64 pb
NF- κ B R:	5' – CGA AGC CGA CCA CCA TGT – 3'	
iNOS F:	5'- AAA GAC CAG GCT GTC GTT GA - 3'	131pb
iNOS R:	5' – ACG GGA CCG GTA TTC ATT CT -3'	
GAPDH F:	5' – GAA GGT GAA GGT CGG AGT C – 3'	226 pb
GAPDH R:	5' – GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC – 3'	

Os iniciadores para SOD2, TNF- α , TGF- β , NF- κ B, iNOS e GAPDH foram desenhados a partir de estudos publicados que indicaram boa eficiência dos mesmos (50-53). Os iniciadores para CAT foram desenhados pelo nosso grupo utilizando o programa Primer-Blast²⁴. Os iniciadores para iNOS foram adquiridos da empresa IDT (Integrated Device Technology), os outros foram adquiridos da empresa EasyPath.

A região de ligação dos iniciadores ao DNA foi verificada com o software Geneious v6.1.2 (Biomatters) que permite observar se a região de anelamento abrange mais de um exon. Isso garante que a amplificação é do DNA complementar, ou seja, proveniente do RNA presente na amostra inicial.

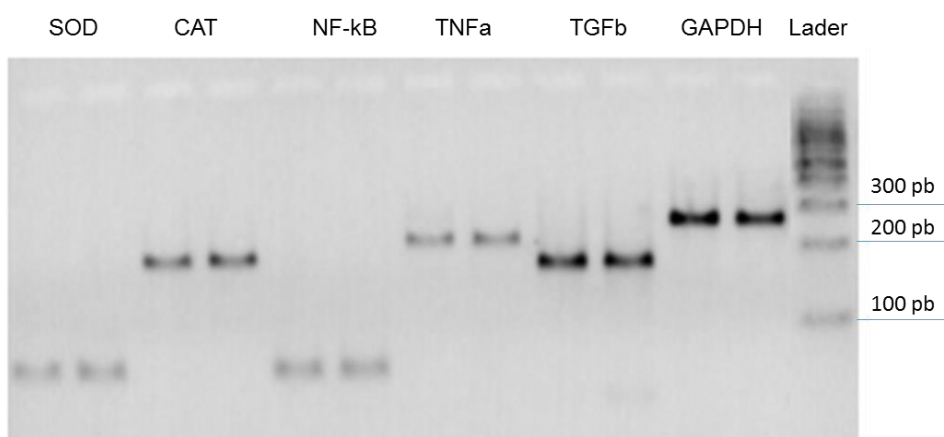
²³ *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

²⁴ www.ncbi.nlm.gov/tools/primer-blast/

Foram realizados testes de funcionalidade dos iniciadores de todos os marcadores antes de iniciar a quantificação por qPCR. Para isso comparou-se à amplificação de cDNA oriundo de sangue periférico com cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das amostras.

Após a amplificação, foi feito um gel de agarose 3% com o produto das amplificações. A corrida do gel foi realizada com corrente a 100v por 90min.

Figura 3: fotografia de gel feito com o produto de amplificação dos iniciadores testados



5.6.4 Definição da concentração de iniciadores

Outra etapa importante é definir a concentração ideal dos iniciadores para as reações. Foi realizada corrida, sob as mesmas condições que seriam utilizadas nas quantificações, onde foram testadas diferentes concentrações dos iniciadores. Foi decidido utilizar os iniciadores a 3 μ M, por ser a menor concentração em que houve amplificação de produto.

Este ajuste de concentrações é necessário para que o equilíbrio da reação seja mantido e não haja excesso ou falta de algum dos componentes.

5.6.5 Cálculo da eficiência de cada reação

A literatura indica para os cálculos de expressão gênica utilizando o qPCR o uso do método Ct, também conhecido como método ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (54, 55). Esta fórmula se baseia no pressuposto que as eficiências das reações a serem comparadas são iguais e mais, indica que elas devem ficar entre o intervalo de 90% e 110%. Em caso de as eficiências dos marcadores de interesse e do marcador endógeno serem diferentes, é necessário considerar as eficiências de cada marcador na equação.

Após realizar testes de funcionalidade com os iniciadores e definir a melhor concentração para as reações de quantificação foi necessário verificar a eficiência de reação para cada um dos marcadores analisados e para o controle endógeno.

Foram realizadas curvas de diluição de cDNA com os iniciadores de cada marcador. As curvas foram preparadas partindo-se do cDNA concentrado, seguido das diluições de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. As diluições foram preparadas com água ultrapura no momento das análises para evitar degradação do material genético. As diluições foram analisadas em triplicata.

As figuras a seguir (4 a 6) mostram os resultados das corridas para cálculo da eficiência. São apresentadas as curvas de amplificação e de dissociação das reações. Cada cor representada nos gráficos corresponde a uma diluição diferente testada para uma mesma amostra, no caso a AC013.

Figura 4: Curva de eficiência de reação do iniciador para SOD

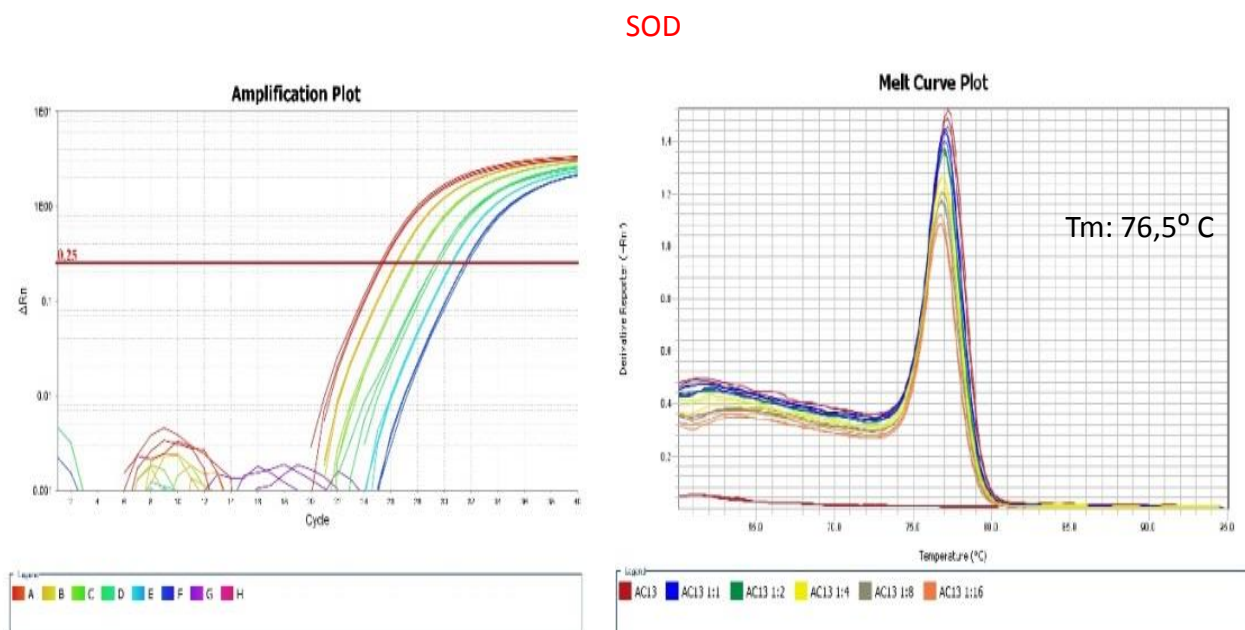
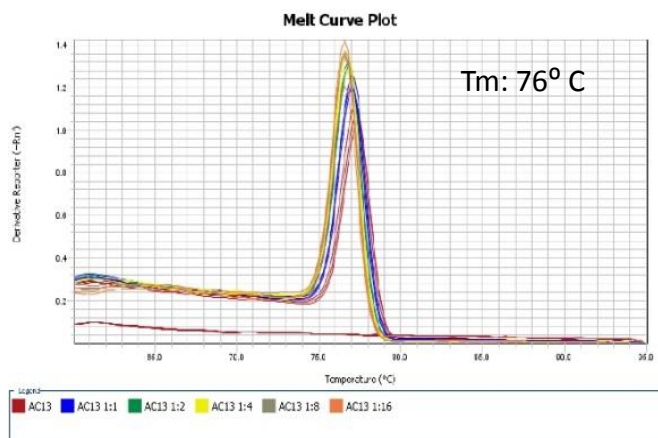
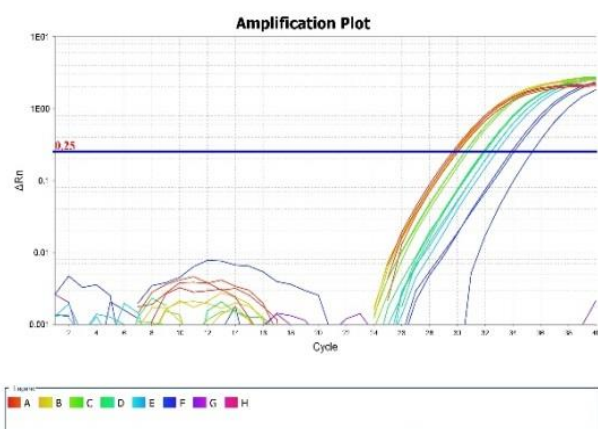
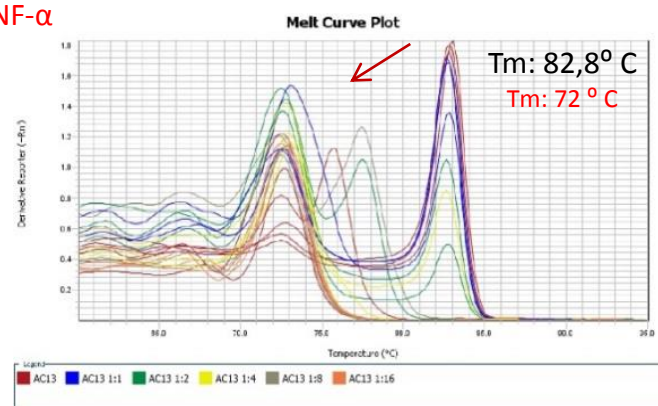
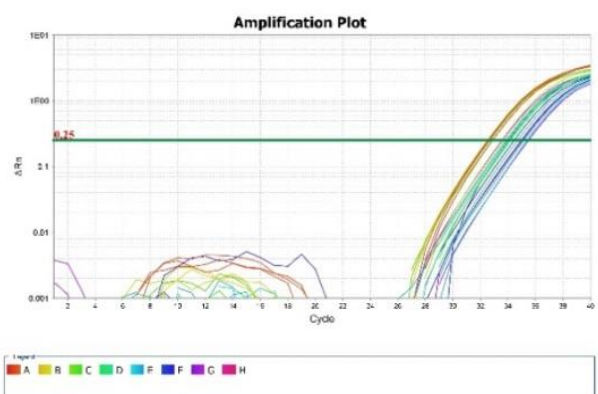


Figura 5: Curvas de eficiência de reação dos iniciadores para CAT, TNF- α e TGF- β

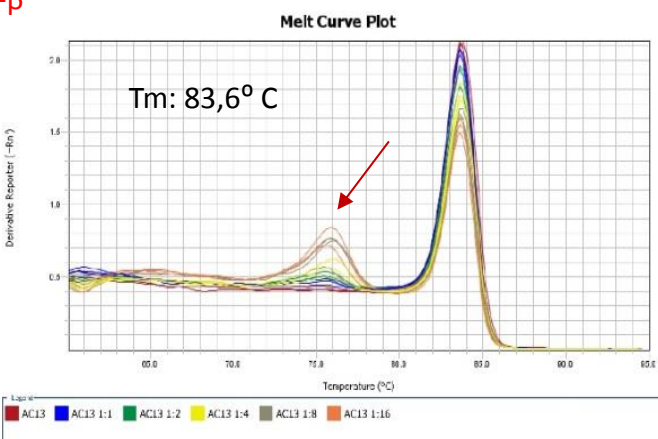
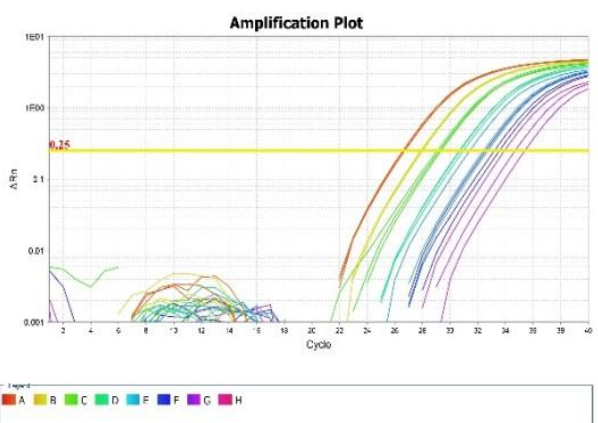
CAT



TNF- α



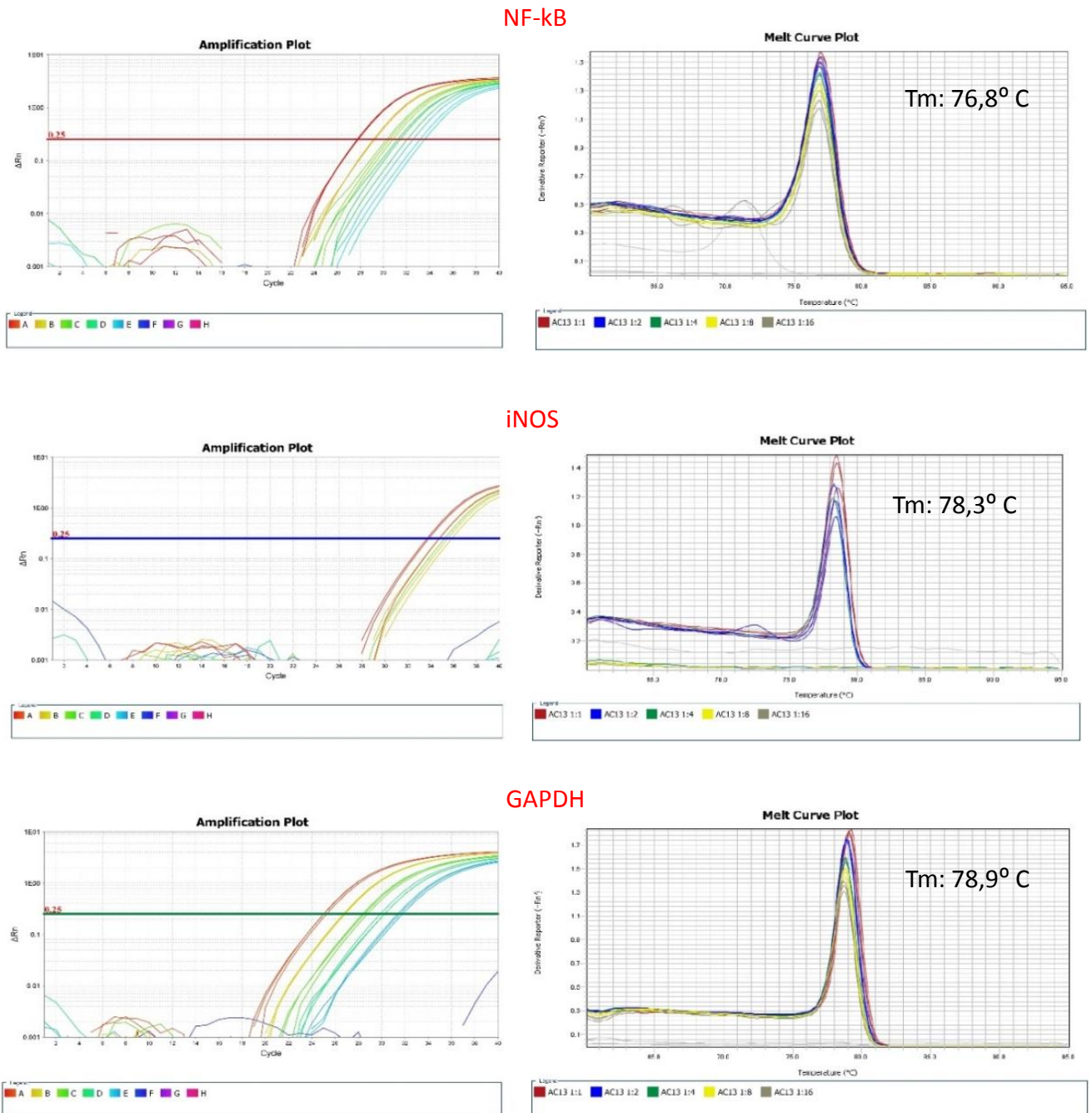
TGF- β



É possível observar que as curvas de dissociação para TNF- α e TGF- β (em menor proporção) apresentam a formação de produtos inespecíficos. Não foi possível utilizar os dados da curva de amplificação para o TNF- α devido a

quantidade de produtos inespecíficos formados. Esta falha na amplificação do TNF- α só foi identificada neste momento, pois no teste de funcionalidade dos iniciadores não houve formação de dímeros, nem de outros produtos que não o de interesse.

Figura 6: Curva de eficiência de reação do iniciador para NF-kB, iNOS e GAPDH

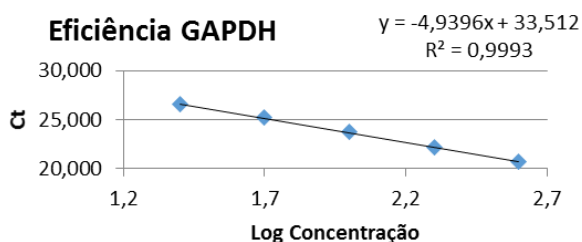
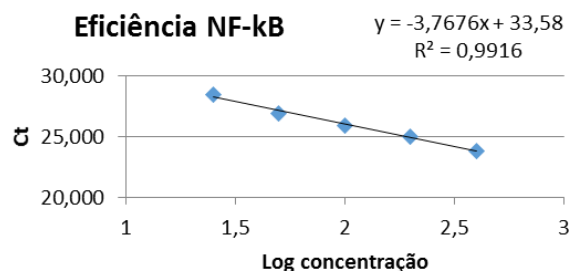
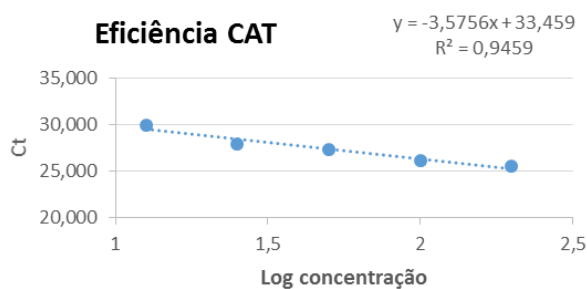
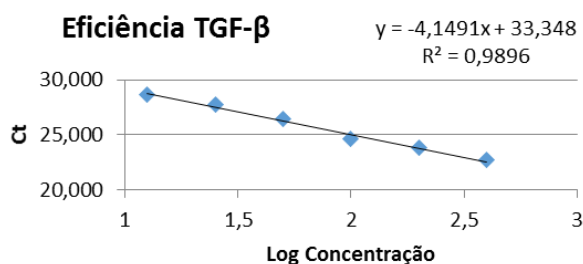
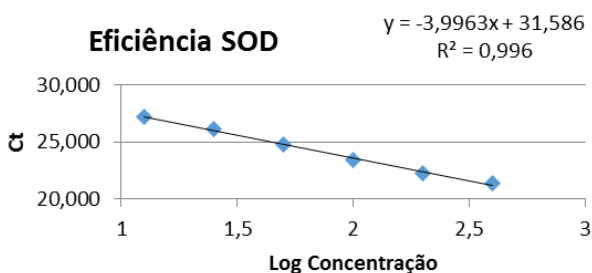


É possível verificar que na curva de amplificação para iNOS apenas algumas diluições, as mais concentradas, apresentaram produto de amplificação. Isso

impediu que a eficiência da reação fosse calculada adequadamente. Por essa razão os resultados obtidos para este marcador não foram considerados válidos.

A partir das curvas de amplificação é possível construir gráficos do logaritmo da concentração de cDNA em cada ponto da diluição e o Ct correspondente para o mesmo "Threshold" conforme indicado na literatura (54-56).

Figura 7: Gráficos para cálculo das eficiências e equação utilizada



Equação para cálculo da eficiência das reações

$$E = 10^{(-1/slope)} - 1$$

onde *slope* = valor de **a** da equação da reta ($y = ax + b$)

A eficiência foi calculada pela equação $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ a partir dos gráficos das reações. Diz-se que a eficiência da reação é máxima quando $E = 2$ e boa quando o valor de E varia no máximo 10%, ficando dentro do intervalo (1,8 e 2,2). As reações dos marcadores estudados tiveram as seguintes eficiências (tabela 4).

Tabela 3: Eficiência calculada para as reações de amplificação

Marcador	Eficiência
SOD	1,71
CAT	2,01
TGFb	1,68
NF-kB	1,74
GAPDH	1,53

A diferença apresentada das eficiências entre os marcadores e o controle endógeno teve que ser considerada para calcular a expressão dos mesmos nas amostras analisadas.

5.6.6 Quantificação por qPCR

A técnica de qPCR é amplamente utilizada para quantificação da expressão gênica em diferentes tecidos biológicos. Esta técnica pode realizar a quantificação de forma absoluta, determinando a quantidade exata de moléculas presentes na amostra, ou de forma relativa, onde é possível determinar alterações na expressão de determinados genes de interesse em uma amostra submetida a determinado tratamento ou condição, relativa à expressão encontrada em uma amostra referência. Foi realizada a análise por quantificação relativa entre as expressões dos marcadores avaliados nos grupos DM e NDM.

As quantificações por qPCR foram realizadas no termociclador de tempo real VIIA 7 (Life Technologies) utilizando reação de amplificação com volume final de 20 μ L, onde 10 μ L eram do reagente SYBR Green Master Mix (Life Technologies), 2 μ L de cDNA concentrado, 0,8 μ L de iniciadores a 3 μ M e 7,2 μ L de água DEPC. No controle negativo (CN), o DNA foi substituído por água DEPC.

O programa utilizado para a corrida foi: etapa de aquecimento = 95°C por 20s; etapa de PCR (40 ciclos) = 95°C por 1s seguidos de 20s à 60°C; etapa curva de dissociação (*Melting*) = 95°C por 15s, 1min à 60°C e 95°C por 15s (esta última etapa ocorre em ciclo único).

Cada amostra teve todos os marcadores analisados em triplicata, de uma única vez, incluindo o controle endógeno.

Os resultados das curvas de amplificação das amostras foram analisados em programa livre disponível no site do fabricante do termociclador²⁵, considerando as diferenças apresentadas nas eficiências das reações.

²⁵ www.thermofisher.com/br/en/home/cloud.html

5.7 Imunohistoquímica e coloração

A porção do fragmento fixada em paraformaldeído 4% foi armazenada sob refrigeração até o processamento onde passou pelas etapas de desidratação com álcool, clareamento com xilol e posteriormente inclusão em bloco de parafina. Cortes transversais de 5µm de espessura foram realizados para confecção das lâminas histológicas. As lâminas foram pré-tratadas com Poly-L-Lisina para melhorar a fixação do material no vidro.

Para a IHQ foram utilizados os anticorpos monoclonais TNF- α e TGF- β (Santa Cruz Biotechnology), NF- κ B (ABCAM) e kit de detecção *Histotain Plus 3rd generation* (Invitrogen), que utiliza anticorpo secundário biotilado. Para a coloração dos anticorpos marcados, utilizou-se como cromógeno a diaminobenzidina (DAB) e peroxidase como substrato enzimático.

Após a realização da IHQ as lâminas foram coradas com hematoxilina para identificação dos núcleos. As etapas da técnica utilizada na IHQ estão descritas detalhadamente no fluxograma do Apêndice C.

Paralelamente à IHQ, foram realizadas as colorações de PicroSirius Red e Resorcina - Fucsina de Weigert.

A técnica de PicroSirius Red, descrita detalhadamente no fluxograma do Apêndice D, destaca em vermelho o colágeno presente no tecido. Já a técnica de Resorcina - Fucsina de Weigert, descrita de forma detalhada no fluxograma do Apêndice E, destaca em roxo as fibras elásticas presentes no tecido.

Após a secagem das lâminas, estas foram fotografadas e quantificadas utilizando-se o software *Image Pró-Plus 4.5*²⁶. A quantificação foi realizada a partir de 5 (cinco) campos distintos da cada corte, fotografados com objetiva de 40X.

As áreas de leitura de cada campo foram delimitadas manualmente pelo leitor, abrangendo o espaço entre a camada endotelial e a lâmina elástica externa, localizada entre a túnica média e adventícia. A marcação considerada positiva também foi determinada pelo leitor. As leituras foram realizadas de forma cega. O software utilizado calcula a área positiva proporcional à área delimitada anteriormente. O resultado é o percentual de tecido marcado em cada campo.

²⁶ *Media Cybernetics*

5.8 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* Stata, versão 14. Os dados clínicos foram agrupados em duas tabelas, comparando os grupos DM e NDM. Nas variáveis numéricas foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, mostrando média, mediana e valor de p , pois os dados da população estudada não possuem distribuição normal quando analisados pelo teste Kolmogorov-Smirnov, que avalia a distribuição de dados em uma amostra.

As variáveis categóricas foram analisadas pelo Teste Exato de Fisher, mostrando como resultado a proporção de cada fator na população geral estudada e a significância estatística através do valor de p . Foi considerada diferença estatística quando o valor de p foi $\leq 0,05$.

Para a análise da IHQ foi aplicado o Teste de Mann-Whitney sobre as medianas das leituras dos cinco campos de cada lâmina de cada paciente. Foi assumido que estes marcadores não possuem distribuição normal, pois não existem dados sobre a distribuição deles na população.

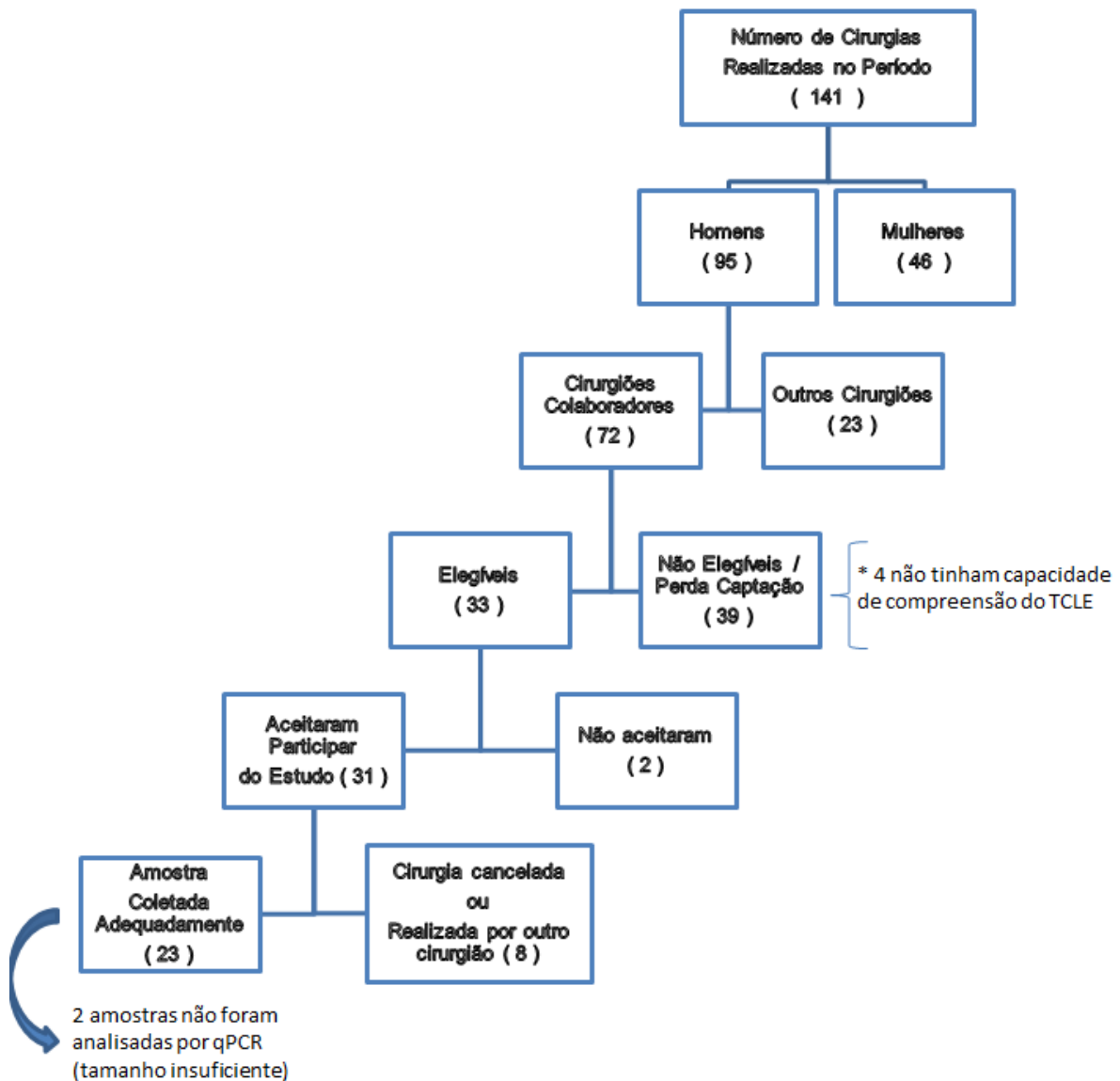
6. RESULTADOS

6.1 Dados da população analisada

Os pacientes alvo do estudo foram aqueles do sexo masculino com indicação eletiva para realização de CRVM eletiva internados no setor de Coronariopatia do INC. A seleção se deu a partir da participação nas reuniões multidisciplinares do setor, onde os casos foram apresentados, além da consulta prévia aos mapas cirúrgicos do hospital.

A captação de amostras é descrita no diagrama de fluxo do estudo (figura 8). Dos pacientes selecionados, foram coletadas 23 amostras no período de dezembro de 2014 a dezembro de 2015. Destas, em duas delas não foi possível realizar extração de RNA e posterior análise por qPCR pois os fragmentos eram muito pequenos para analisarmos através das duas técnicas. Estes fragmentos foram encaminhados apenas para realização da IHQ, mas os dados clínicos referentes a estes pacientes foram incluídos na estatística realizada.

Figura 8: Diagrama de fluxo para captação de amostras



As características clínicas da população estão descritas nas tabelas 4 e 5. Algumas variáveis possuem um número amostral (N) menor do que o N do subgrupo, devido a não realização de alguns exames bioquímicos por todos os pacientes, ou informação não localizada no prontuário do paciente. Nenhuma das variáveis numéricas consideradas no estudo mostrou diferença estatística.

A mediana de idade dos pacientes NDM foi de 64,5 anos, e dos DM 59 anos, com valor de p calculado em 0,29.

A mediana do risco cirúrgico, fornecido pelo EuroScore II, foi de 1,10 para NDM e 1,48 para DM. A fração de ejeção obtida pelo método de Teicholz durante

ecocardiograma transtorácico, frações lipídicas e usCRP foram muito similares nos dois grupos.

As variáveis clínicas que mostraram maior diferença numérica foram o Clearance de Creatinina (Cl cr) estimado e a Troponina máxima dosada nas primeiras 48 do pós-operatório. A mediana do Cl cr foi de 59,36mL/min para NDM e 85,94mL/min para DM. A troponina máxima apresentou mediana de 2,62 mg/dL para o grupo de NDM e 5,81 para os DM.

Tabela 5: Dados clínicos da população (variáveis numéricas) agrupados em não diabéticos (NDM) e diabéticos (DM)

Variável	NDM			DM			p (Mann-Whitney)
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana	
Idade (anos)	12	65,00	64,50	11	60,73	59,00	0,295
Peso (kg)	12	77,34	77,00	11	82,15	79,00	0,5584
IMC (kg/m ²)	12	27,22	26,05	11	26,06	25,56	0,7583
Circ, Abdominal (cm)	12	102,27	100,70	11	96,47	100,00	0,7582
EuroScoreII	11	1,35	1,10	8	1,70	1,48	0,4826
Nº cigarros ano	12	29,33	21,25	10	31,95	10,00	0,6603
ECO FE (T) %	12	56,79	60,16	11	58,23	62,68	0,5794
LDL (mg/dL)	12	97,17	78,00	11	86,96	78,00	0,7349
HDL (mg/dL)	12	33,50	34,00	11	34,18	35,00	0,4768
TGC (mg/dL)	11	159,64	132,00	11	156,91	130,00	0,8181
usCRP (mg/dL)	10	0,45	0,21	10	0,61	0,31	0,6224
Cr plasmática (mg/dL)	11	1,20	1,19	11	1,10	1,00	0,4302
Cl Cr (estimado) ²⁷ (mL/min)	11	73,63	59,36	11	88,94	85,94	0,2505
Hematócrito (%)	12	38,90	39,10	11	39,98	39,80	0,5382
Troponina máx. PO ²⁸ (mg/dL)	12	5,42	2,62	10	6,88	5,81	0,1661

N - Número, IMC - Índice Massa Corporal, FE - Fração de Ejeção, ECO – Ecocardiograma, T – método Teicholz, LDL - *Low Density Lipoprotein*, HDL - *High Density Lipoprotein*, TGC – Triglicerídeos, usCRP - Proteína C Reativa ultra sensível, Cr plasmática – Creatinina plasmática, Cl cr - *Clearance* de Creatinina, Troponina P.O - Troponina no Pós Operatório (48h)

²⁷ O Cl cr - *Clearance* de Creatinina estimado foi calculado através da equação de Cockcroft & Gault para homens

Clearance de Creatinina = [(140-Idade) x Peso(kg)] / (Creatinina Sérica x 72)

²⁸ O valor de Troponina máxima é correspondente ao maior valor obtido nas primeiras 48h do pós-operatório

As variáveis categóricas são apresentadas na tabela 6. Novamente não houve diferença estatística entre os grupos em nenhuma variável considerada no estudo.

Todos os pacientes de ambos os grupos foram diagnosticados com hipertensão arterial sistêmica (HAS) e dislipidemia e encontravam-se, no momento da cirurgia, com terapia medicamentosa otimizada. Nenhum paciente fazia uso de digoxina.

Tabela 6: Dados clínicos da população (variáveis categóricas) agrupados em não diabéticos (NDM) e diabéticos (DM)

Variável	NDM (N = 12)		DM (N = 11)		p (Teste exato Fisher)
	N	Percentual	N	Percentual	
Raça (branco)	8	66,7	6	54,6	0,6802
Fumante ou ex-fumante	9	75,0	6	54,6	0,4003
HF (+) IAM / AVC	4	33,3	5	45,5	0,6802
IAM prévio	3	25,0	5	45,5	0,4003
AVC prévio	1	8,3	1	9,1	1
Claudicação Intermitente	2	16,7	2	18,2	1
HAS	12	100,0	11	100,0	*
Dislipidemia	12	100,0	10	90,9	0,4783
Histórico farmacológico					
Estatinas	10	83,3	8	72,7	0,6404
Betabloqueadores	10	83,3	10	90,9	1
Bloqueador Canal Ca+2	3	25,0	4	36,4	0,6669
IECA	3	25,0	4	36,4	0,6669
Nitratos	8	66,7	9	81,8	0,6404
Antagonista Receptor AT1	6	50,0	7	63,6	0,6802
Digoxina	0	0,0	0	0,0	*
Diuréticos	3	25,0	3	27,3	1
AAS	11	91,7	9	81,8	0,5901
Hipoglicemiantes orais	0	0,0	8	72,73	*
Insulina	0	0,0	5	45,45	*
Anticoagulantes orais	2	16,7	4	36,4	0,3707
Disfunção Diastólica					
Sem disfunção	2	16,7	1	9,1	1
Leve	9	75,0	8	72,7	
Moderada	1	8,3	2	18,2	
Disfunção Sistólica					
Sem disfunção	7	58,3	8	72,7	1
Leve	2	16,7	1	9,1	
Moderada	1	8,3	0	0,0	
Grave	2	16,7	2	18,2	
Lesão de Tronco	5	41,7	2	18,2	0,3707
Nº vasos acometidos (> 60%)					
3	6	50,0	4	36,4	0,8882
4	2	16,7	3	27,3	
5	2	16,7	3	27,3	
6	1	8,3	1	9,1	
7	1	8,3	0	0,0	
Óbito P.O	0	0,0	0	0,0	*

N – numero amostral, HF(+) – Histórico familiar positivo, IAM – Infarto Agudo do Miocárdio, AVC – Acidente Vascular Cerebral, HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica, IECA – Inibidor da Enzima Conversa de Angiotensina, AAS – Ácido Acetil Salicílico

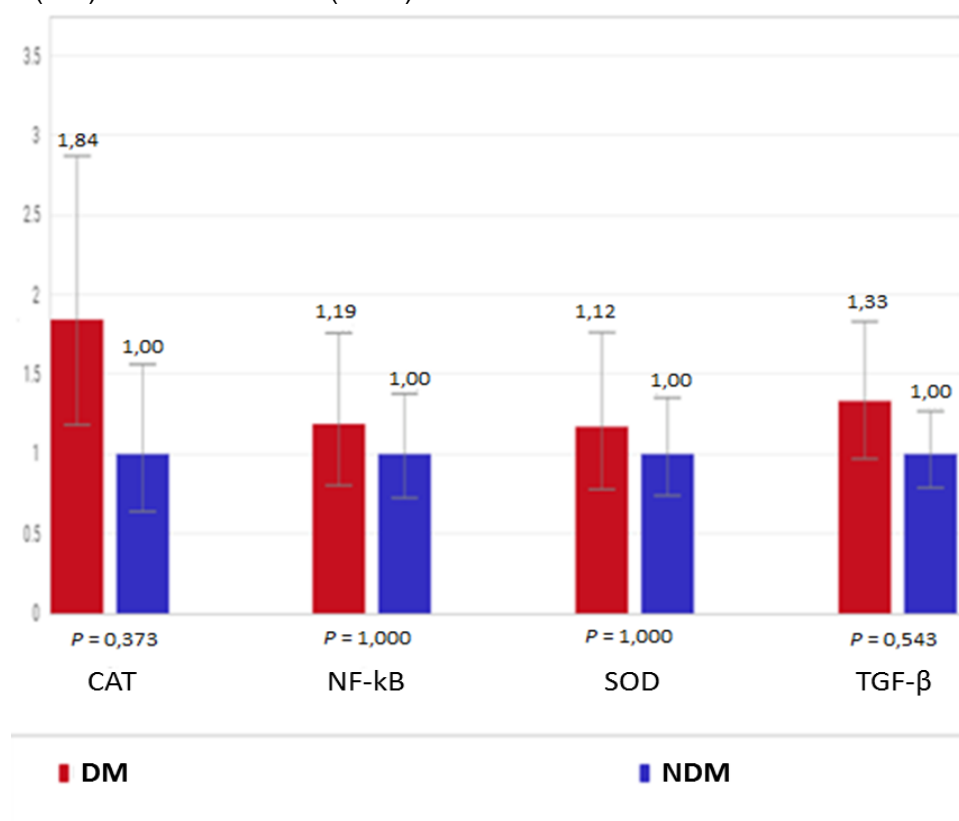
6.2 Resultados da análise por qPCR

A análise dos resultados dos ensaios de qPCR foi realizada utilizando-se o programa de análise do fabricante do termociclador. Como resultado final obtivemos o gráfico apresentado na figura 9. Foi aplicado o teste *t* de *Student* e a barra de erro representa o desvio padrão das leituras. Foram analisadas 21 das 23 amostras coletadas, pois não foi possível realizar a extração de RNA em duas amostras devido ao tamanho insuficiente do fragmento coletado.

O programa normaliza o grupo controle (definido como os NDM) para 1 e apresenta a diferença na expressão de cada marcador do grupo afetado (DM) comparado com a expressão do grupo controle. Ou seja, os DM tiveram um aumento de 84% na expressão do marcador CAT comparado com a expressão do mesmo marcador no grupo dos NDM.

No grupo DM os marcadores NF-kB, SOD e TGF- β obtiveram aumentos mais discretos em relação aos NDM, com valores variando entre 12 e 33%.

Figura 9: Comparativo entre as expressões dos marcadores analisados nos grupos de diabéticos (DM) e não diabéticos (NDM)



Fonte: gráfico gerado pelo site www.thermofisher.com/br/en/home/cloud.html

6.3 Imunohistoquímica e coloração

Foram processadas amostras de 13 dos 23 participantes, quantificando os marcadores TNF- α , TGF- β e NF- κ B, além de colágeno e elastina. Os resultados são expressos em percentual da área definida para leitura considerada positiva durante as leituras das lâminas, compreendida entre a camada endotelial e a lamina elástica externa. A tabela 7 apresenta a mediana, primeiro e terceiro quartil dos itens avaliados, além do valor de p calculado.

Não houve diferença estatística entre os grupos, mas o marcador NF- κ B apresentou a maior variação, ficando os NDM com uma mediana de 55,09% e os DM com 46,91%. O TGF- β apresentou mediana de 45,46% para os NDM e 56,15% para os DM, já o TNF- α apresentou mediana de 54,95% para NDM e 68,88% para DM.

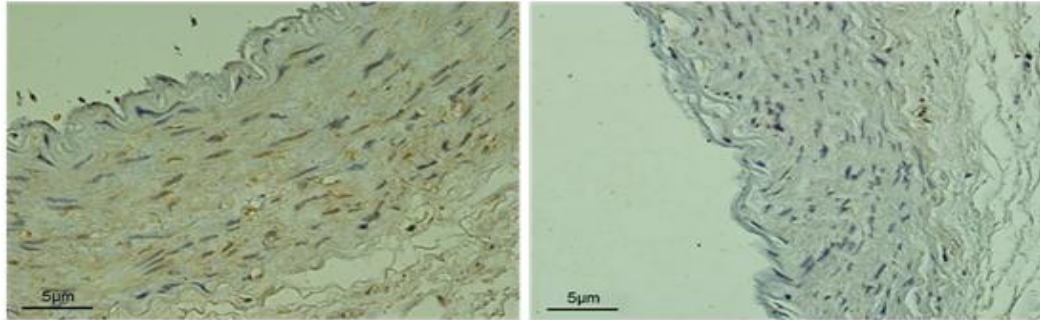
Os valores de mediana obtidos nas quantificações de colágeno foram de 77,90% para NDM e 77,50% para DM. Fibras elásticas tiveram mediana de 56,52% no grupo de NDM e 69,20% no grupo de DM.

Tabela 7: Quantificação percentual dos marcadores realizada por técnicas de IHQ e coloração

Item	NDM (N=9)					DM (N=4)				p (Mann-Whitney)
	N	Mediana	1° quartil	3° quartil		N	Mediana	1° quartil	3° quartil	
NF- κ B	4	55,085	43,055	60,745		3	46,91	40,55	49,6	0,289
TGF- β	6	45,46	38,09	66,73		4	56,145	45,26	59,95	0,831
TNF- α	4	54,95	52,95	59,805		3	62,88	48,7	73,84	0,724
Colageno	7	77,9	68,09	82,59		4	77,5	74,69	78,03	0,935
Fibra Elastica	7	65,52	57,33	71,08		4	69,2	67,51	69,57	0,570

A seguir são mostradas imagens das lâminas processadas para IHQ (marcação positiva em castanho) e das colorações para colágeno e fibra elástica em pacientes dos grupos DM e NDM (figuras 10 a 12).

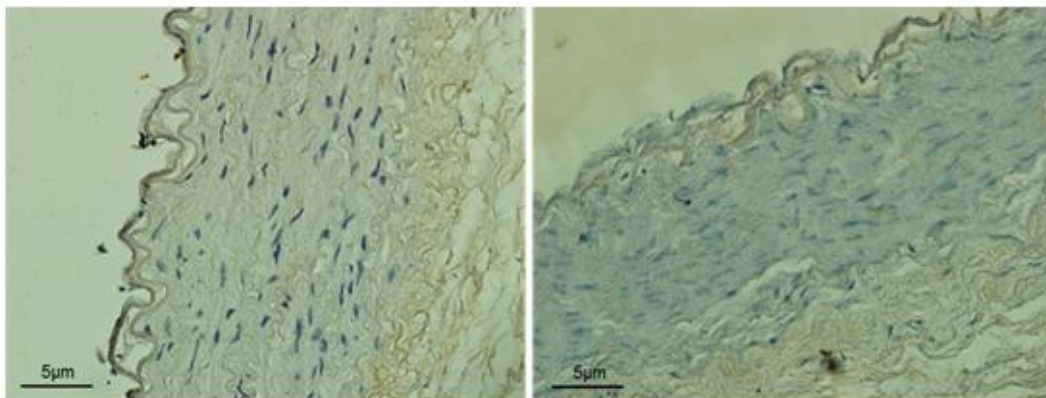
Figura10: Imagens dos campos de leitura das lâminas de pacientes DM e NDM processadas para o marcador TNF- α (núcleos corados com hematoxilina, vistos em roxo) – objetiva de 40X



(1) Lâmina de paciente DM mostrando marcador TNF- α

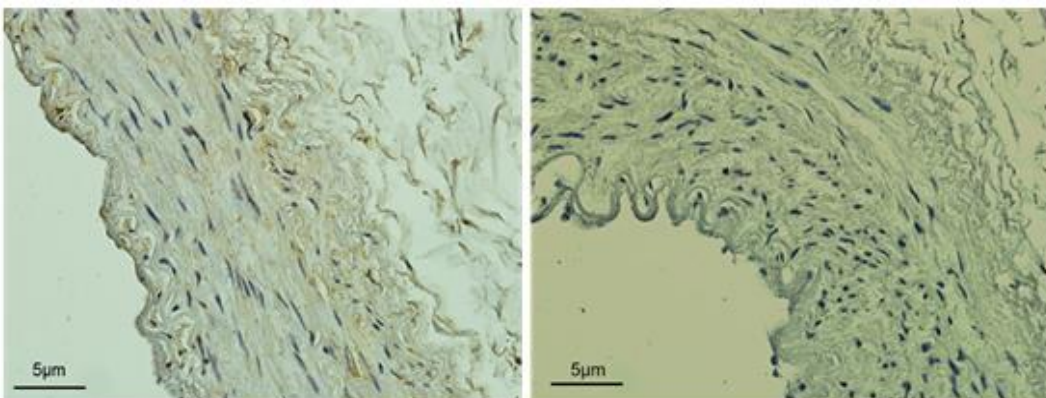
(2) Lâmina de paciente NDM mostrando marcador TNF- α

Figura11: Imagens dos campos de leitura das lâminas de pacientes DM e NDM processadas para o marcador NF-kB e TGF- β (núcleos corados com hematoxilina) – objetiva de 40X



(3) Lâmina de paciente DM mostrando marcador NF-kB

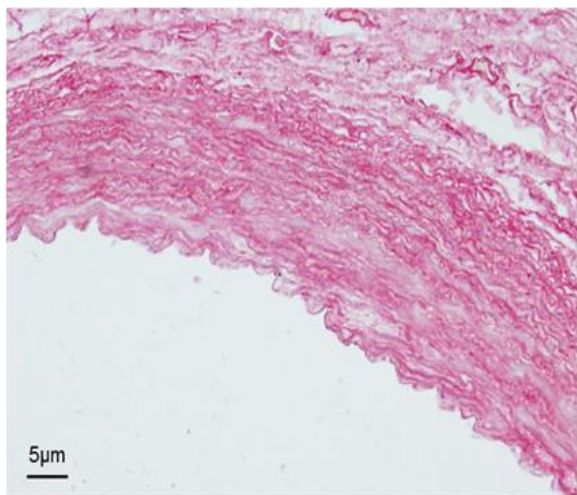
(4) Lâmina de paciente NDM mostrando marcador NF-kB



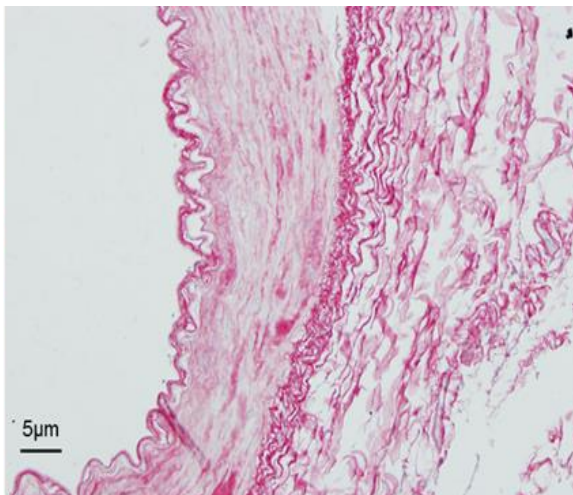
(5) Lâmina de paciente DM mostrando marcador TGF- β

(6) Lâmina de paciente NDM mostrando marcador TGF- β

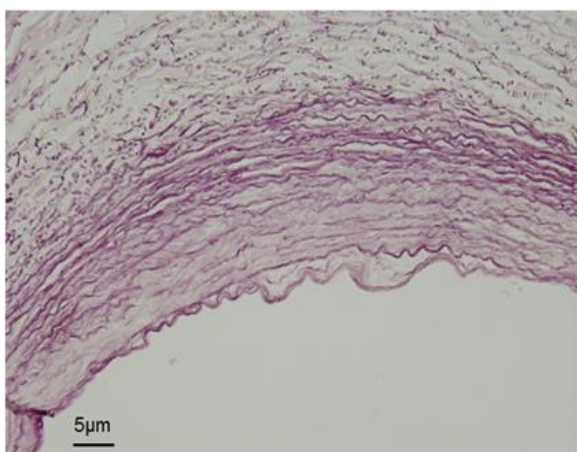
Figura12: Imagens dos campos de leitura das lâminas de pacientes DM e NDM coradas para colágeno e fibras elásticas – objetiva de 40X



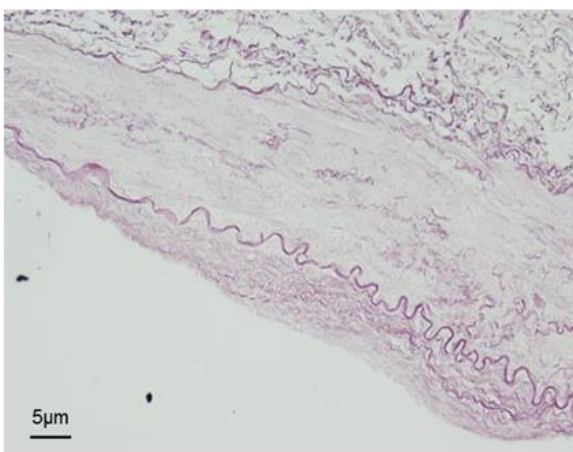
(7) Lâmina de paciente DM mostrando coloração para colágeno



(8) Lâmina de paciente NDM mostrando coloração para colágeno



(9) Lâmina de paciente DM mostrando coloração para fibras elásticas



(10) Lâmina de paciente NDM mostrando coloração para fibras elásticas

7. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou características clínicas e laboratoriais de pacientes submetidos à CRVM eletiva no INC entre o período de dezembro de 2014 a dezembro de 2015, estratificando os resultados em diabéticos e não diabéticos. Ambos os grupos apresentaram distribuição não normal para os aspectos avaliados.

Os dados clínicos demonstraram que os grupos DM e NDM são clinicamente semelhantes, sendo a única diferença existente dentre as variáveis analisadas, a presença da *diabetes mellitus* e o uso dos medicamentos para seu tratamento. Isso é indicativo que possíveis diferenças encontradas se devem exclusivamente ao diabetes, não sendo influenciadas por outras comorbidades ou fatores de risco preexistentes.

A HAS teve prevalência de 100% em ambos os grupos em nosso estudo, o que vai ao encontro com o estudo longitudinal que foi realizado com 3020 pacientes, de oito países, ao longo de 10 anos, no qual foram analisados fatores de risco e prognóstico em pacientes diabéticos e não diabéticos que sofrem AVC (57). Assim como, no estudo citado, a frequência de fumantes é menor entre o grupo de diabéticos.

Mesmo não havendo diferença estatística entre as variáveis, as maiores diferenças numéricas encontradas são referentes às medianas de idade, nível de troponina T no pós-operatório (até 48h) e *clearance* de creatinina estimado. A mediana da idade dos DM foi de 59 anos e dos NDM foi de 64,50 anos, sugerindo que o surgimento de complicações vasculares ocorre precocemente em pacientes diabéticos.

A maior dosagem de troponina T apresentada no pós-operatório pelo grupo DM resultou em mediana de 5,81 mg/dL, enquanto os NDM apresentaram mediana de 2,62 mg/dL. Não houve diferença estatística entre os grupos, mas segundo a Diretriz de Avaliação Perioperatória da Sociedade Brasileira de Cardiologia, mesmo alterações isoladas no nível de troponina após a cirurgia, representam aumento no risco de eventos cardiovasculares futuros e menor sobrevida a longo prazo (42).

Já o *clearance* de creatinina estimado pela equação de Cockcroft & Gault apresentou mediana superior para o grupo de DM com valor de 85,94 mL/min enquanto os NDM apresentaram taxa de 59,36 mL/min, compatível com dados

apresentados no estudo anteriormente citado (57). Sabe-se que pacientes diabéticos e hipertensos apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doença renal crônica. Esse aumento na taxa de filtração glomerular (*clearance*) nos pacientes diabéticos pode ocorrer em fases iniciais da lesão renal (58).

Os resultados de qPCR não mostraram diferença estatística entre os grupos. Mesmo que o CAT tenha apresentado um aumento de 84% na sua expressão em pacientes DM comparado ao grupo NDM, não foi demonstrada a diferença estatística, pois o valor de p foi de 0,373. O mesmo ocorreu com SOD, NF-kB e TGF- β . Estes resultados vão de encontro a estudos realizados em modelo animal, no qual pode ser observado aumento na expressão CAT (59, 60) e SOD (60).

As análises realizadas por IHQ para os marcadores NF-kB, TNF- α e TGF- β apresentaram resultados compatíveis com os obtidos por qPCR, não demonstrando diferenças estatísticas entre os grupos DM e NDM.

Mesmo que o resultado na IHQ do NF-kB tenha apresentado valores de expressão superiores para os NDM, com mediana de 55,09%, enquanto os DM apresentaram mediana de 46,91%, o tamanho da amostra analisada é muito pequeno para que se possa inferir a distribuição deste, e dos outros marcadores, nas populações estudadas.

A quantificação de colágeno e fibras elásticas também não mostrou diferença estatística entre os grupos, apesar de as lâminas apresentarem diferença visual na distribuição destes elementos nos cortes analisados, como mostrado na figura 12. Novamente o tamanho da amostra analisada é pequeno para que possamos dizer se há ou não diferença real na expressão destas proteínas.

Esperávamos encontrar diferenças na distribuição dos marcadores analisados entre os grupos estudados, uma vez que é consenso que o paciente diabético possui um quadro inflamatório sistêmico mais elevado do que o paciente não diabético e, conforme estudo publicado recentemente há diferenças na expressão de diversos marcadores no tecido de ATI (47).

Estudos realizados em modelo animal que demonstraram diferenças na estrutura vascular, determinadas por aumento na expressão de colágeno do tipo IV e TGF- β 1 em ratos com nefropatia diabética induzida (61), nos indicam que podem haver diferenças destes e de outros marcadores no tecido de enxerto utilizado em

CRVM. Entretanto, provavelmente, o reduzido tamanho amostral do nosso estudo, não tenha possibilitado observar estas diferenças.

Apesar da expressão de colágeno e fibras elásticas não ter variado entre DM e NDM, durante a leitura das lâminas coradas para estes dois elementos, pode-se perceber uma alteração na estrutura dos vasos entre os grupos. As amostras provenientes de diabéticos, muitas vezes apresentaram espessamento da lâmina elástica externa, porém para que possamos confirmar esta diferença estrutural entre os grupos faz-se necessário que o processamento de todas as amostras seja realizado, bem como a medição das camadas constitutivas do vaso das mesmas.

8. CONCLUSÕES

A avaliação de marcadores relacionados com a inflamação e estresse oxidativo em fragmentos de artéria torácica interna, não apresentou diferenças ao compararmos pacientes coronariopatas diabéticos *versus* não-diabéticos. Acreditamos que o pequeno tamanho amostral analisado pode ter contribuído para a ausência de resultados com significância estatística.

Pretendemos continuar com as análises deste material, pois como citado anteriormente, é um tecido que reflete o que ocorre no sistema circulatório arterial. Para isso acreditamos ser necessária a ampliação do número amostral para ambos os grupos, bem como ampliar as análises de IHQ e colorações realizadas para todas as amostras coletadas.

É de nosso interesse também ampliar as análises para outros marcadores envolvidos no processo de disfunção endotelial, por acreditarmos ser de grande importância o conhecimento do que ocorre *in situ* nos enxertos utilizados em CRVM, na tentativa de fornecer dados para um prognóstico mais preciso para o paciente operado.

9. REFERÊNCIAS

1. Lin J, Cheng W, Czer LS, De Robertis MA, Mirocha J, Ruzza A, et al. Coronary artery bypass graft surgery using the radial artery as a secondary conduit improves patient survival. *J Am Heart Assoc* 2013;2(4):e000266.
2. Raja SG. Bilateral internal mammary artery grafting in diabetics: outcomes, concerns and controversies. *Int J Surg* 2015;16(Pt B):153-7.
3. de Vries MR, Simons KH, Jukema JW, Braun J, Quax PH. Vein graft failure: from pathophysiology to clinical outcomes. *Nat Rev Cardiol* 2016;13(8):451-70.
4. Mansur AP, Favarato D. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. *Arq Bras Cardiol* 2012;99(2):755-61.
5. Datasus - Sistema de Informações Hospitalares do SUS. Taxa de internação hospitalar (SUS) por doença isquêmica do coração por 10.000 habitantes em 2012. [Internet]. [cited 08 de julho de 2015]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe>.
6. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2016;133(4):e38-60.
7. Baena CP, Olandoski M, Luhm KR, Costantini CO, Guarita-Souza LC, Faria-Neto JR. Tendência de Mortalidade por Infarto Agudo do Miocárdio em Curitiba (PR) no Período de 1998 a 2009. *Arq Bras Cardiol* 2012;98(3):211-7.
8. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol* 2015;5(4):1841-75.
9. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 2007;88(1):1-19.
10. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 2005;26(1-2):33-65.
11. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, C. AJ. Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
12. Morita M, Yano S, Yamaguchi T, Sugimoto T. Advanced glycation end products-induced reactive oxygen species generation is partly through NF-kappa B activation in human aortic endothelial cells. *J Diabet Complications* 2013;27(1):11-5.
13. Steyers CM, Miller FJ. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 2014;15(7):11324-49.
14. Gomes F, Telo DF, Souza HP, Nicolau JC, Halpern A, Serrano CV. [Obesity and coronary artery disease: role of vascular inflammation]. *Arq Bras Cardiol* 2010;94(2):255-61, 73-9, 60-6.
15. Jacob T, Hingorani A, Ascher E. Overexpression of transforming growth factor-beta1 correlates with increased synthesis of nitric oxide synthase in varicose veins. *J Vasc Surg* 2005;41(3):523-30.
16. Toma I, McCaffrey TA. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res* 2012;347(1):155-75.
17. Buckley ML, Ramji DP. The influence of dysfunctional signaling and lipid homeostasis in mediating the inflammatory responses during atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(7):1498-510.

18. Brasier AR. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 2010;86(2):211-8.
19. Sánchez A, Calpena AC, Clares B. Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int J Mol Sci* 2015;16(8):16981-7004.
20. Sena CM, Pereira AM, Seíça R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832(12):2216-31.
21. Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, et al. Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from South Indian patients. *PLoS One* 2015;10(4):e0125270.
22. Mikhed Y, Daiber A, Steven S. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *Int J Mol Sci* 2015;16(7):15918-53.
23. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir Bras* 2002; 17:417-23.
24. Carbone F, Montecucco F. Inflammation in arterial diseases. *IUBMB Life* 2015;67(1):18-28.
25. Lee BJ, Lin YC, Huang YC, Ko YW, Hsia S, Lin PT. The relationship between coenzyme Q10, oxidative stress, and antioxidant enzymes activities and coronary artery disease. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:792756.
26. Tsamis A, Krawiec JT, Vorp DA. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *J R Soc Interface* 2013;10(83): 20121004.
27. Otsuka F, Yahagi K, Sakakura K, Virmani R. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? *Ann Cardiothorac Surg* 2013;2(4):519-26.
28. Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, Siasos G, Latsios G, Tentolouris K, et al. Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(8):667-76.
29. Aguiar LG, Villela NR, Bouskela E. A microcirculação no diabetes: implicações nas complicações crônicas e tratamento da doença. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51(2):204-11.
30. Profumo E, Buttari B, Riganò R. Oxidative stress in cardiovascular inflammation: its involvement in autoimmune responses. *Int J Inflam* 2011; 2011:295705.
31. Shirai T, Hilhorst M, Harrison DG, Goronzy JJ, Weyand CM. Macrophages in vascular inflammation--From atherosclerosis to vasculitis. *Autoimmunity* 2015;48(3):139-51.
32. Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat Chem Biol* 2014;10(1):9-17.
33. Yousuf O, Mohanty BD, Martin SS, Joshi PH, Blaha MJ, Nasir K, et al. High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: a resolute belief or an elusive link? *J Am Coll Cardiol* 2013;62(5):397-408.
34. Preeshagul I, Gharbaran R, Jeong KH, Abdel-Razek A, Lee LY, Elman E, et al. Potential biomarkers for predicting outcomes in CABG cardiothoracic surgeries. *J Cardiothorac Surg* 2013;8:176.

35. Páramo JA, Rodríguez JA, Orbe J. Vulnerable plaque versus vulnerable patient: emerging blood biomarkers for risk stratification. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2007;7(3):195-201.
36. Davierwala PM, Verevkin A, Leontyev S, Misfeld M, Borger MA, Mohr FW. Impact of expeditious management of perioperative myocardial ischemia in patients undergoing isolated coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2013;128(11 Suppl 1):S226-34.
37. Panagiotopoulos I, Palatianos G, Michalopoulos A, Chatzigeorgiou A, Prapas S, Kamper EF. Alterations in biomarkers of endothelial function following on-pump coronary artery revascularization. *J Clin Lab Anal* 2010;24(6):389-98.
38. Carvalho MRM, Souza e Silva NA, Klein CH, Oliveira GMM. Aplicação do EuroSCORE na cirurgia de revascularização miocárdica em hospitais públicos do Rio de Janeiro. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2010;25(2):209-17.
39. Nashef SA, Roques F, Sharples LD, Nilsson J, Smith C, Goldstone AR, et al. EuroSCORE II. *Eur J Cardiothorac Surg* 2012;41(4):734-44; discussion 44-5.
40. Taggart DP. Current status of arterial grafts for coronary artery bypass grafting. *Ann Cardiothorac Surg* 2013;2(4):427-30.
41. Yanagawa B, Algarni KD, Singh SK, Deb S, Vincent J, Elituv R, et al. Clinical, biochemical, and genetic predictors of coronary artery bypass graft failure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;148(2):515-20.e2.
42. Gualandro D, Yu P, Calderaro D, Marques A, Pinho C, Caramelli B, et al. II Diretriz de Avaliação Perioperatória da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol* 2011;96(3supl.1):1-68.
43. Butcher M, Galkina EV. Old suspect--new evidence: the role of PKC β in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(8):1737-8.
44. Singh SK, Desai ND, Petroff SD, Deb S, Cohen EA, Radhakrishnan S, et al. The impact of diabetic status on coronary artery bypass graft patency: insights from the radial artery patency study. *Circulation* 2008;118(14 Suppl):S222-5.
45. Kong L, Shen X, Lin L, Leitges M, Rosario R, Zou YS, et al. PKC β promotes vascular inflammation and acceleration of atherosclerosis in diabetic ApoE null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(8):1779-87.
46. Watanabe T, Sato K, Itoh F, Wakabayashi K, Shichiri M, Hirano T. Endogenous bioactive peptides as potential biomarkers for atherosclerotic coronary heart disease. *Sensors (Basel)* 2012;12(4):4974-85.
47. Preil SA, Kristensen LP, Beck HC, Jensen PS, Nielsen PS, Steiniche T, et al. Quantitative Proteome Analysis Reveals Increased Content of Basement Membrane Proteins in Arteries From Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Lower Levels Among Metformin Users. *Circ Cardiovasc Genet* 2015;8(5):727-35.
48. Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas; 2007. V.70. p. 47-56.
49. Novais CM, Alves M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. *Biotechnolog. Cienc. Desenvolv* 2004;p.10-13.
50. Broadbelt NV, Stahl PJ, Chen J, Mizrahi M, Lal A, Bozkurt A, et al. Early upregulation of iNOS mRNA expression and increase in NO metabolites in pressurized renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293(6):F1877-88.

51. Strzalka B, Dorecká M, Stanik-Walentek A, Kowalczyk M, Kapral M, Romaniuk W, et al. Quantitative analysis of transforming growth factor beta isoforms mRNA in the human corneal epithelium. *Folia Biol (Praha)* 2008;54(2):46-52.
52. Cavalcante LO, Melo MR, Dinis VG, Castro RB, Souza BD, Longui CA. Quantitation of glucocorticoid receptor alpha and NF- κ B pathway mRNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Genet Mol Res* 2010;9(4):2300-10.
53. Andrews M, Soto N, Arredondo M. [Effect of metformin on the expression of tumor necrosis factor- α , Toll like receptors 2/4 and C reactive protein in obese type-2 diabetic patients]. *Rev Med Chil* 2012;140(11):1377-82.
54. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
55. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101-8.
56. Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lin YH, Hou SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil* 2006;14(12):1237-47.
57. Palacio S, McClure LA, Benavente OR, Bazan C, Pergola P, Hart RG. Lacunar strokes in patients with diabetes mellitus: risk factors, infarct location, and prognosis: the secondary prevention of small subcortical strokes study. *Stroke* 2014;45(9):2689-94.
58. Bastos M, Bregman R, Kirsztajn G. Chronic kidney diseases: common and harmful, but also preventable and treatable. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56(2):248-53.
59. Perlman AS, Chevalier JM, Wilkinson P, Liu H, Parker T, Levine DM, et al. Serum Inflammatory and Immune Mediators Are Elevated in Early Stage Diabetic Nephropathy. *Ann Clin Lab Sci* 2015;45(3):256-63.
60. Rossoni Júnior JV, Araújo GR, Pádua Bda C, Magalhães CL, Chaves MM, Pedrosa ML, et al. Annatto extract and β -carotene enhances antioxidant status and regulate gene expression in neutrophils of diabetic rats. *Free Radic Res* 2012;46(3):329-38.
61. Wang T, Chen SS, Chen R, Yu DM, Yu P. Reduced beta 2 glycoprotein I improves diabetic nephropathy via inhibiting TGF- β 1-p38 MAPK pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(3):2321-33.

APÊNDICES

APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: Expressão de biomarcadores inflamatórios em enxertos utilizados na revascularização do miocárdio: correlação com dados clínicos e laboratoriais.

Termo de esclarecimento:

O senhor será submetido a uma cirurgia de revascularização do coração, indicada por uma equipe médica do Instituto Nacional de Cardiologia. Dessa forma, está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é investigar sinais de inflamação em pequenos fragmentos vasculares. O estudo pode fornecer informações importantes sobre doenças como a aterosclerose e pode ajudar no desenvolvimento de tratamentos novos e mais eficientes.

O procedimento fundamental para o projeto é a coleta de uma amostra de cerca de 2 centímetros de um vaso sanguíneo. Durante a cirurgia de revascularização do coração, o cirurgião utiliza artérias ou veias. Muitas vezes, elas são maiores que o necessário e um pequeno fragmento é descartado. É este fragmento que será utilizado na pesquisa.

O convite a participar no estudo não influenciou na indicação médica para a cirurgia. Este estudo não envolve riscos ou efeitos adversos além daqueles normalmente associados com a cirurgia de revascularização do coração. Não afetará o resultado da cirurgia, o restante do seu tratamento ou seu tempo de recuperação.

Adicionalmente, faremos um questionário para obtenção de informações sobre a sua saúde e analisaremos informações do seu prontuário médico.

Não há benefício imediato para você. Somente após a conclusão dos estudos será possível obter conhecimento que eventualmente poderá ser utilizado no desenvolvimento de novos tratamentos.

Em qualquer etapa do estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável do estudo, o médico Dr. Daniel Kasal, através do telefone (21) 3037-2288. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Cardiologia.

É garantida a liberdade de não querer participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações obtidas de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos voluntários.

Não há despesas pessoais para os voluntários que participarem do estudo, bem como, nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação.

1

Haverá o armazenamento do material, caso seja necessário realizar experimentos futuros e repetições dos anteriores para aumentar credibilidade dos dados. O material biológico obtido não será enviado ao exterior.

Termo de Consentimento

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo citado acima que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com o integrante da equipe _____, sobre minha decisão de participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que o acompanhamento médico seguirá conforme a orientação do corpo clínico do Instituto, independentemente de minha escolha em participar do estudo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo. Poderei retirar meu consentimento e solicitar o descarte do material referente à minha participação em qualquer momento, antes ou durante o estudo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesta Instituição.

Autorizo a utilização do material colhido:

() Para este estudo e outras pesquisas sobre doenças cardiovasculares que possam ser realizadas no futuro com o mesmo material.

() Apenas para este estudo.

Nome do sujeito da pesquisa

Data: __ / __ / ____

Assinatura do sujeito da pesquisa

Nome do Pesquisador

Data: __ / __ / ____

Assinatura do pesquisador

APÊNDICE B: Formulário utilizado para captação das variáveis clínicas do paciente

Data de preenchimento: ___/___/___

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

Projeto de pesquisa:

EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS EM ENXERTOS UTILIZADOS EM PACIENTES SUBMETIDOS À REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO: CORRELAÇÃO COM DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

Ficha de Dados Clínicos do Paciente – v.2.0		
Nome:		
Prontuário:		
Idade:		
Raça:		
Profissão:		
Fatores de Risco / Comorbidades		
História familiar positiva para DVC:	S () N ()	
Infarto prévio:	S () N ()	Quando:
ACV prévio:	S () N ()	Quando:
PTCA prévia:	S () N ()	Quando:
RVM prévia:	S () N ()	Quando:
Claudicação Intermitente:	S () N ()	
DM:	S () N ()	Insulino-dependente S () N ()
HAS:	S () N ()	
Dislipidemia:	S () N ()	
Obesidade:	S () N ()	
DPOC:	S () N ()	
CF (NYHA, I a IV):	()	
Medicamentos (Classe/dose)		
Estatinas:	S () N ()	Nome/dose:
Betabloqueadores:	S () N ()	Nome/dose:
Bloqueadores de Canal Ca:	S () N ()	Nome/dose:
IECA:	S () N ()	Nome/dose:
Nitratos:	S () N ()	Nome/dose:
Antagonistas do receptor AT-1:	S () N ()	Nome/dose:
Digoxina:	S () N ()	
Diuréticos:	S () N ()	Nome/dose:
AAS:	S () N ()	
Hipoglicemiantes:	S () N ()	Nome/dose:
Insulina:	S () N ()	Nome/dose:
AINEs:	S () N ()	Nome/dose:
Anticoagulante:	S () N ()	Nome/dose:

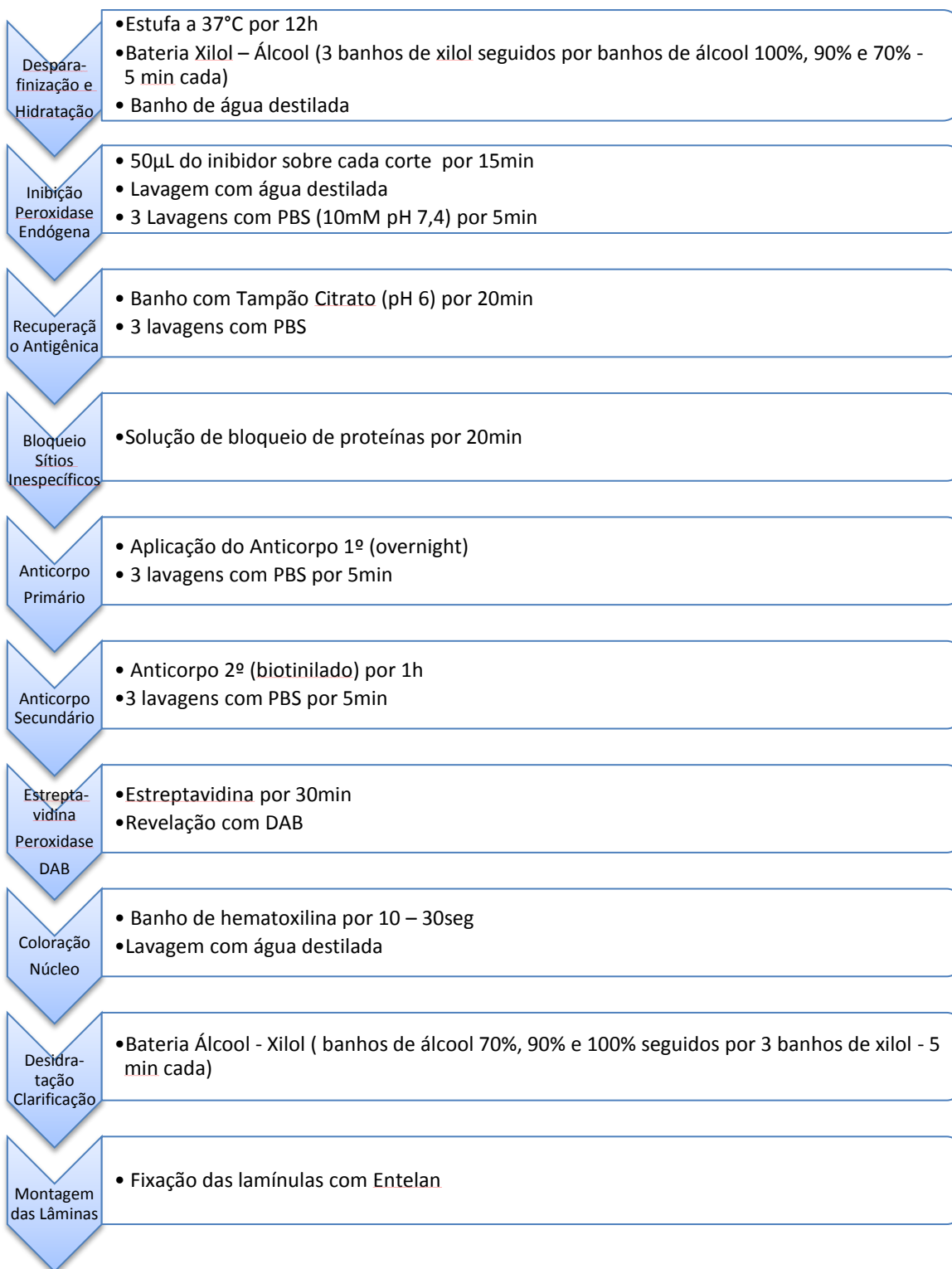
Ecocardiograma Pré-Operatório		Laudo:	Data:
Fração de Ejeção (% T ou S): Diâmetro AE: Diâmetro Diastólico final do VE: Diâmetro Sistólico final do VE: Pressão da artéria pulmonar: Presença de Insuficiência / Estenose Mitral (L / M / G): Presença de Insuficiência / Estenose Aórtica(L / M / G): Presença de Insuficiência / Estenose Tricúspide:(L / M / G): Presença de áreas hipocinesia / acinesia:			
Coronariografia Pré-Operatória		Data:	
Nº CAT INC: Nº estenoses com % de obstrução:			
TCE:	DA:	Dg1:	
Dg2:	Diag:	Mg1:	
Mg2:	Mg3:	CD:	
Dp:	Vp:	Cx:	
Ventriculografia:			
Hemograma / Bioquímica (Pré-OP)			
Glicemia de Jejum:		Sódio:	
Hemoglobina Glicada:		Potássio:	
Colesterol Total:		Ureia:	
LDL:		Creatinina:	
HDL:		TSH:	
TGC:		T4 livre:	
Ác. Úrico:		Tx Filt. Glomerular:	
PCR us:		Hematócrito / Hb	
Dados Biométricos			
Peso (kg)		IMC	
Altura (m)		Circunf. Abdominal (cm)	
EuroScore II			
Valor:			
Tabagismo			
Fumante:		S () N () Ex-fumante ()	
Período que fumou:		Quando parou:	
Cigarros / dia			
OBS (outros exames relevantes):			

Variáveis da Cirurgia e Pós-Operatório (48h)		
Nº de enxertos:		
Tipo de enxerto:		
Tempo de Anóxia (pinça)	Tempo de Perfusão (CEC)	
Endarterectomia	S ()	N ()
Uso de hemoderivados:	S ()	N () Quais:
Uso de CEC:	S ()	N ()
Uso de amins no PO:	S ()	N () Quais:
Uso de Balão Intra-Aórtico:	S ()	N ()
IAM no PO:	S ()	N () Q () S/Q ()
AVE no PO:	S ()	N ()
FA no PO:	S ()	N ()
Troponina máxima no PO:	Data:	
Óbito no per-OP / pós-OP imediato:	S ()	N ()

AVC, Acidente vascular cerebral; PTCA, *Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty*; HAS, Hipertensão arterial sistêmica; DPOC, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica; CF, Classe Funcional; NYHA (*New York Heart Association*); IECA, Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina; AT-1; angiotensina-1; AAS, ácido acetil salicílico; AINE, Anti-inflamatório não esteroide; AE, Átrio Esquerdo; VE, Ventrículo Esquerdo; CAT, Cateterismo; TGC, Triglicerídeos; TSH, *Thyroid Stimulating Hormone*; CEC: Circulação Extracorpórea; FA: Fibrilação Atrial.

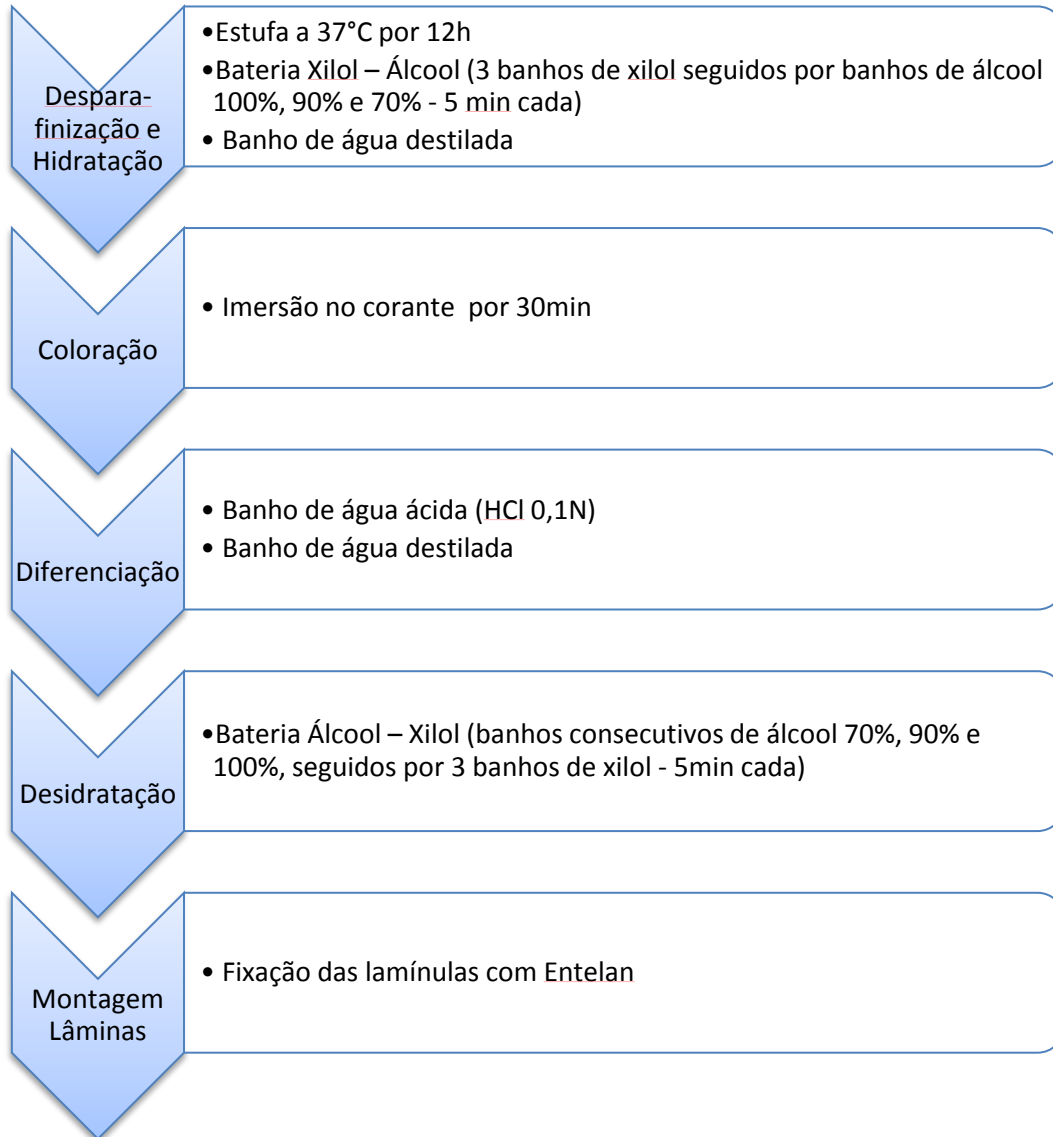
APÊNDICE C: Descrição detalhada da técnica de IHQ utilizada para detecção e quantificação dos marcadores inflamatórios estudados

Figura 1: Técnica de imunohistoquímica utilizada para detecção dos marcadores estudados expressos no vaso



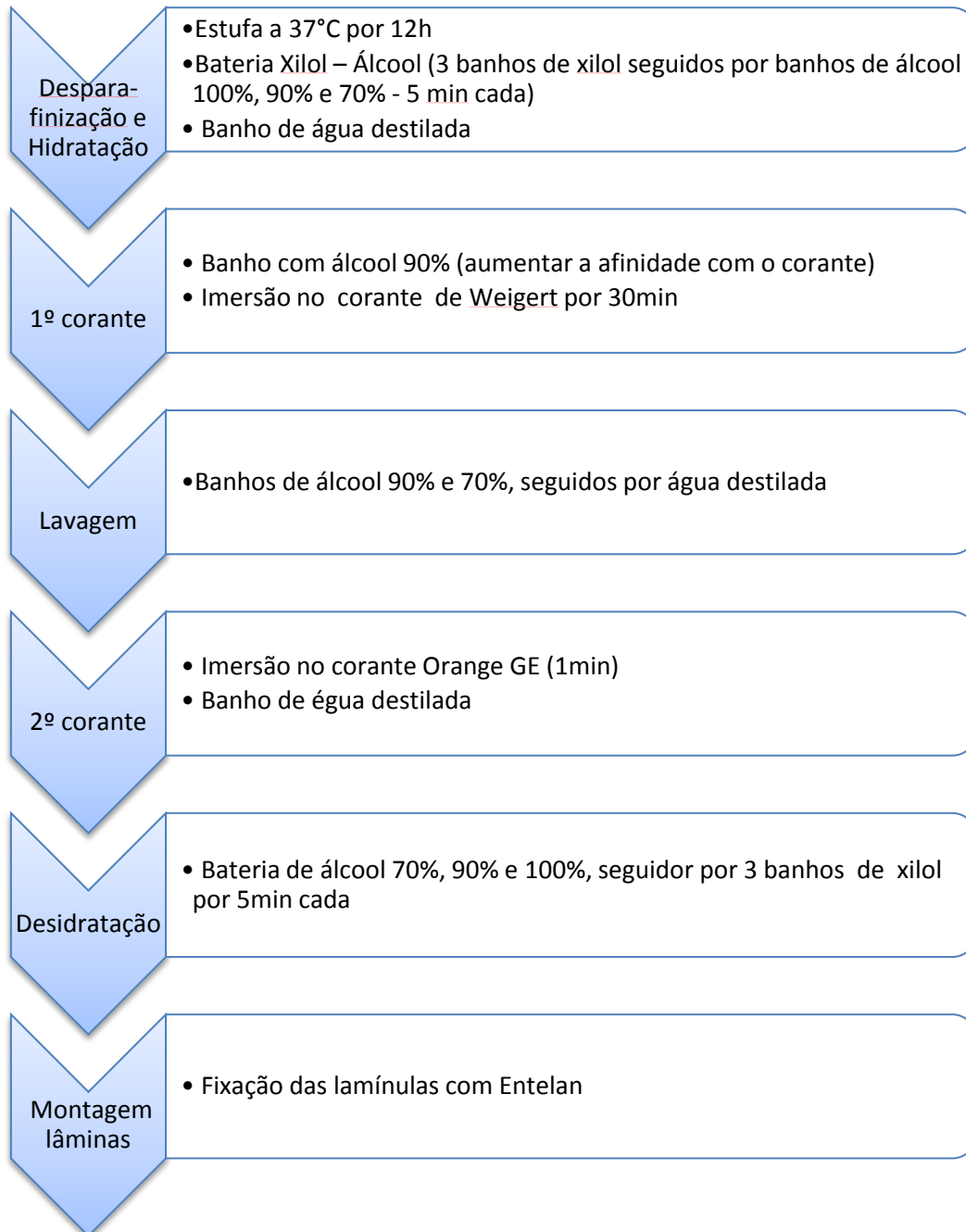
APÊNDICE D: Fluxograma das etapas da técnica de coloração para detecção de colágeno por Pricro-sirius Red

Figura 2: Técnica de coloração utilizada para detecção do colágeno presente no vaso



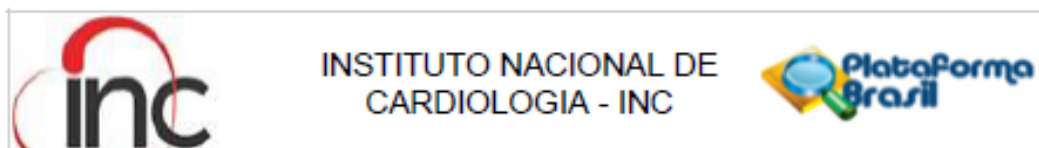
APÊNDICE E: Fluxograma das etapas da técnica de coloração para detecção de fibra elástica por Resorcina + Fucsina Weigert

Figura 3: Técnica de coloração utilizada para detecção das fibras elásticas presente no vaso



ANEXOS

Anexo I: Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de biomarcadores inflamatórios em enxertos utilizados na revascularização do miocárdio: correlação com dados clínicos e laboratoriais.

Pesquisador: Daniel Arthur Barata Kasal

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 33705614.2.0000.5272

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Cardiologia - INC

Patrocinador Principal: Instituto Nacional de Cardiologia - INC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 875.906

Data da Relatoria: 17/11/2014

Apresentação do Projeto:

Respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado do CEP nº 840.513.

Foram adicionados ao protocolo os seguintes documentos:

1. respostas às pendências (03/11/2014);
2. nova versão das informações básicas do projeto (03/11/2014);
3. nova versão do TCLE (03/11/2014);
4. regulamentos dos biorrepositórios (03/11/2014).

Objetivo da Pesquisa:

Ver o Parecer Consubstanciado do CEP nº 738905 de 05/08/2014.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver o Parecer Consubstanciado do CEP nº 738905 de 05/08/2014.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver o Parecer Consubstanciado do CEP nº 738905 de 05/08/2014.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver o Parecer Consubstanciado do CEP nº 738905 de 05/08/2014.

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar
Bairro: Laranjeiras CEP: 22.240-006
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3037-2307 Fax: (21)3037-2307 E-mail: cepinc@laranjeiras@gmail.com



Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Apresentar detalhamento a respeito do tratamento das amostras biológicas relativos ao armazenamento e descarte das mesmas.

Resposta 1: As amostras utilizadas no estudo correspondem a pequenos fragmentos de tecido vascular, com comprimento estimado de 2 milímetros. Dessa forma, o material será utilizado em sua íntegra, para análise histológica ou extração de DNA. Durante o processamento do material, pequenas frações da amostra podem ser removidas (fragmentos de gordura com menos de 1 grama de massa), sendo descartadas em sacos identificados como material biológico infectante, no Laboratório de Biologia e Diagnósticos Moleculares situado no quinto andar do INC. Após a amplificação do material genético, alíquotas serão

estocadas no freezer situado no mesmo laboratório, para eventual repetição de experimentos vinculados ao mesmo estudo, visando validação dos resultados.

Análise 1: o armazenamento de material biológico para novas análises relativas ao mesmo experimento configuram o estabelecimento de biorrepositório, regulado pela Resolução CNS 441/2011 e pela Portaria MS 2201/2011. É necessária a apresentação do regulamento (conjunto de normas técnicas, operacionais e éticas) do biorrepositório e o TCLE deve esclarecer que o participante pode solicitar descarte do material armazenado em qualquer momento da pesquisa.

Resposta 2: anexados arquivos referentes ao armazenamento e descarte, tanto do material genético quanto da análise histológica. Elaborado novo TCLE esclarecendo o participante sobre a possibilidade de solicitar o descarte do material armazenado, sendo também anexado.

Análise 2: pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS/MS 466/12 Capítulo XI Item 2.d cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e final ao Comitê de Ética em que foi submetido o projeto.

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar

Bairro: Laranjeiras

CEP: 22.240-006

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3037-2307

Fax: (21)3037-2307

E-mail: cepinc@laranjeiras@gmail.com



INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGIA - INC



Continuação do Parecer: 875.906

RIO DE JANEIRO, 18 de Novembro de 2014

Assinado por:
monica moura de vasconcellos
(Coordenador)

Endereço: Rua das Laranjeiras 374 - 5º andar
Bairro: Laranjeiras **CEP:** 22.240-006
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3037-2307 **Fax:** (21)3037-2307 **E-mail:** cepinc@laranjeiras@gmail.com

Página 03 de 03