



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina- Cardiologia

ELAINE GUIMARÃES DE SOUZA

**Alterações da função microvascular periférica e da espessura
médio-intimal carotídea em indivíduos com doença arterial
coronária de início precoce**

Rio de Janeiro
Agosto, 2013

ELAINE GUIMARÃES DE SOUZA

Alterações da função microvascular periférica e da espessura médio-intimal carotídea em indivíduos com doença arterial coronária de início precoce

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração em Cardiologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Cardiologia.

Orientadores: Andrea Rocha de Lorenzo
Eduardo Vera Tibiriça
Gláucia Maria Moraes Oliveira

Rio de Janeiro
Agosto, 2013

Souza, Elaine Guimarães de

Alterações da função microvascular periférica e da espessura médio-intimal carotídea em indivíduos com doença arterial coronária de início precoce / Elaine Guimarães de Souza. Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2013.

78 f.; 31 cm.

Orientadores: Andrea Rocha de Lorenzo, Eduardo Vera Tibiriça e Glaucia Maria Moraes de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – Cardiologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina (Cardiologia), 2013.

Referências bibliográficas: f. 56 – 66.

1. Doença da Artéria Coronariana. 2. Fatores de Risco. 3. Espessura Intima-Media Carotídea. 4. Artérias – Fisiopatologia. 5. Doença Arterial Periférica - Fisiopatologia. 6. Cardiologia – Tese. I. Lorenzo, Andrea Rocha de. II. Tibiriça, Eduardo Vera. III. Oliveira, Glaucia Maria Moraes de. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Medicina (Clínica Médica). V. Título.

**Alterações da função microvascular periférica e da espessura
médio-intimal carotídea em indivíduos com doença arterial
coronária de início precoce**

Elaine Guimarães de Souza

Orientadores:

Prof. Dra. Andrea Rocha de Lorenzo
Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriça
Prof. Dra. Glaucia Maria Moraes de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Medicina, área de concentração em Cardiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários a obtenção de título de mestre em Cardiologia.

Aprovada por:

Presidente Prof. Dr. Aristarco G. Siqueira Filho

Prof. Dr. Antônio Felipe Sanjuliani

Prof. Dr. Daniel Arthur B. Kasal

Rio de Janeiro
Agosto, 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores **Andrea Rocha de Lorenzo, Glaucia Maria Moraes de Oliveira** e **Eduardo Vera Tibiriça** pela dedicação, pela atenção e pelos ensinamentos.

Aos meus pais Laís e Camillo (**in memorian**) os quais devo toda a minha formação

Aos meus irmãos Ivaní e Luis Felipe pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos.

A todos os pacientes que fizeram parte deste estudo e aos médicos do Serviço de Ecocardiografia do Instituto Nacional de Cardiologia pela atenção e prestimosa cooperação.

RESUMO

DE SOUZA, Elaine Guimarães. Alterações da função microvascular periférica e da espessura médio-intimal carotídea em indivíduos com doença arterial coronária de início precoce

Dissertação (Mestrado em Medicina-Cardiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013).

Fundamentos: A doença aterosclerótica é multifatorial e associada a fatores de risco tanto inatos quanto ambientais. A doença aterosclerótica coronariana (DAC), quando manifestada precocemente (em homens com menos de 45 anos e mulheres com menos de 55 anos), possui importantes repercussões sócio-econômicas. Assim, sua identificação num estágio pré-clínico é de grande interesse. Têm sido pesquisados métodos não invasivos para essa avaliação, tanto em nível anatômico ou estrutural quanto funcional; dentre eles encontram-se, respectivamente, a medida da espessura médio-intimal carotídea (EMI) e a avaliação da função endotelial microvascular sistêmica. Objetivos: Avaliar a reatividade microvascular cutânea e a EMI carotídea em pacientes com DAC precoce. Métodos: Foram estudados pacientes com DAC e indivíduos saudáveis, submetidos à avaliação da EMI carotídea pelo duplex scan de carótidas (carótida comum, bulbo e ramo interno). A concordância entre a avaliação semiautomatizada e manual e interobservador (observadores A e B) das medidas da EMI foi avaliada e para análise de confiabilidade foi utilizado o coeficiente intraclassa. Foi feita também a avaliação do desempenho diagnóstico das medidas pela área sob a curva ROC. Foi avaliada a função endotelial microvascular cutânea pelo sistema de imagem laser *speckle* de contraste com testes de reatividade a acetilcolina (ACh, resposta vasodilatadora dependente do endotélio), nitroprussiato de sódio (NPS, independente do endotélio), e hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO). Resultados: Os valores máximos de condutância vascular cutânea (CVC) durante a iontoforese com ACh foram $0,61 \pm 0,04$ e $0,48 \pm 0,03$ UAP(unidades arbitrárias de perfusão)/mmHg nos controles versus DAC, respectivamente ($p=0,012$), e a área sob a curva foi 7258 ± 730 e 3723 ± 789 UAP/s, nos controles versus DAC, respectivamente ($p=0,003$). Os valores máximos de CVC durante a iontoforese de NPS foram de $0,51(0,39-0,67)$ e $0,38(0,29-0,49)$ UAP/s, de controles versus DAC, respectivamente ($p=0,001$). A EMI, avaliada nos diversos segmentos, diferenciou de forma significativa os grupos DAC e controle.

Também houve boa concordância interobservador A x B (entre 0,73 e 0,91) e concordância razoável (entre 0,62 e 0,64) nas medidas semiautomatizadas e nas realizadas pelo observador A, avaliadas pelo coeficiente intraclassa. Não houve diferença entre o desempenho da carótida comum, bulbo e ramo interno para discriminação de DAC, quando avaliados pela curva ROC. Conclusão: Os pacientes com DAC precoce apresentaram disfunção microvascular e aumento da espessura médio-intimal carotídea. Tais alterações podem, isoladamente ou em associação, fazer parte da fisiopatologia da doença aterosclerótica nesse grupo, bem como contribuir para o aumento do risco de eventos cardiovasculares.

Palavras-chave: Aterosclerose, doença arterial coronária precoce, função endotelial, disfunção endotelial, microcirculação cutânea, laser *speckle* de contraste, espessura médio intimal carotídea, fatores de risco cardiovascular.

ABSTRACT

DE SOUZA, Elaine Guimarães. Changes in microvascular peripheral function and carotid intima-media thickness in patients with early-onset coronary artery disease. Thesis (Master of Medicine-Cardiology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013).

Background: Atherosclerotic disease is multifactorial and associated with both innate and environmental risk factors. When expressed early (in men with less than 45 and women with less than 55 years), atherosclerotic coronary artery disease (CAD) has important socio-economic impacts. Thus, its identification in a preclinical stage is of great interest. Noninvasive methods for the assessment of early-onset CAD have been evaluated both in anatomic or structural as well as in functional levels; among them are, respectively, the measurement of carotid intima-media thickness (IMT) by carotid duplex scan and the evaluation of peripheral microvascular endothelial function. Objectives: To assess microvascular endothelial function and carotid IMT in patients with early-onset CAD. Methods: Patients with CAD and healthy subjects underwent assessment of carotid IMT with carotid artery duplex scan (common carotid, bulb and internal branch). Intraoperator and interoperator agreement (observers A and B) of IMT measures were evaluated, and for reliability analysis the intraclass coefficient was used. Evaluation of diagnostic performance of the measures of IMT was evaluated with the area under the ROC curve. Cutaneous microvascular endothelial function was evaluated with laser speckle contrast imaging (LSCI), testing reactivity to acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP), and post-occlusive reactive hyperemia (PORH). Results: The peak cutaneous vascular conductance (CVC) during iontophoresis with ACh was 0.61 ± 0.04 and 0.48 ± 0.03 APU / mmHg in controls versus CAD, respectively ($p = 0.0119$), and the area under the curve was 7258 ± 730 and 3723 ± 789 APU / s in controls versus CAD, respectively ($p = 0.003$). The peak CVC during iontophoresis with SNP was 0.51 (0.39 to 0.67) and 0.38 (0.29 to 0.49) APU / s in controls versus CAD, respectively ($p = 0, 001$). IMT was 0.8 (0.8 to 0.8), and 0.9 (0.8-1.0) mm in controls versus DAC, respectively ($p = 0.0003$). IMT was able to significantly differentiate CAD and control groups, except in the measure the anterior segment of the right carotid artery. There was also good interoperator A x B concordance (between 0.73 and 0.91) and fair agreement (between 0, 6 and 0.7) in the semiautomatic measures and in the measures taken by observer A, assessed by intraclass coefficient. There was no

differences between the performance of common carotid artery, bulb or internal branch for the discrimination of CAD, when evaluated with the ROC curve. Conclusion: Patients with early onset CAD showed microvascular dysfunction and increased carotid intima-media thickness. Such changes may, alone or in combination, be part of the pathophysiology of atherosclerotic disease in this group, as well as contribute to the increased risk of cardiovascular events.

Key-words: Atherosclerosis, coronary artery disease early, endothelial function, endothelial dysfunction, cutaneous microcirculation, laser speckle contrast, carotid intimal-medial thickness, cardiovascular risk factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo inflamatório crônico.	8
Figura 2: Produção do laser <i>speckle</i> .	14
Figura 3: Sistema de imagem laser <i>speckle</i> associado à iontoforese.	15
Figura 4: Duplex scan de carótida.	25
Figura 5: Fluxometria a laser com luz incidindo sobre a pele em A . Em B iontoforese com administração da droga (Ach ou NPS).	27
Figura 6: A fluxometria a laser e resposta normal da vasodilatação pelo estímulo da iontoforese da acetilcolina (Ach).	28
Figura 7: A fluxometria a laser e resposta deprimida da vasodilatação pelo estímulo da iontoforese de acetilcolina (Ach).	28
Figura 8: Condutância vascular cutânea (CVC) máxima pelo estímulo da iontoforese da acetilcolina (Ach) nos indivíduos controles (CONT) e com DAC de início precoce. Área sob a curva da CVC e hiperemia reativa pós-oclusiva(HRPO).	33
Figura 9: Condutância vascular cutânea (CVC) máxima pelo estímulo da iontoforese com o nitroprussiato de sódio (NPS). Área sob a curva (ASC) da CVC. Espessura médio-intimal carotídea (EMI) em indivíduos controles (CONT) e com DAC de início precoce.	34
Figura 10: Relação entre a vasodilatação máxima da iontoforese da Ach e NPS medida da EMI entre os grupos DAC e controle. CVC = APU/mmHg em média \pm Dp; EMI = mediana (p25-p75).	36
Figura 11: Comparações entre as medidas semiautomatizadas (aparelho = primeiro) e as realizadas pelos observadores A (segundo) e B (terceiro) nos diversos segmentos (carótida comum direita e esquerda anterior, lateral e posterior; bulbo direito e esquerdo, ramo interno direito e esquerdo) realizadas no grupo Controle como nas figuras 10 A, 10 B e 10 C, respectivamente.	40
Figura 12: Comparações entre as medidas semiautomatizadas (aparelho = primeiro) e as realizadas pelos observadores A (segundo) e B (terceiro) nos diversos segmentos (carótida comum direita e esquerda anterior, lateral e posterior; bulbo direito e esquerdo, ramo interno direito e esquerdo) realizadas no grupo DAC como nas figuras 11 A, 11 B e 11C, respectivamente.	43

Figura 13: Gráficos de Bland-Altman para avaliação da concordância iterobservador da EMI na carótida comum direita, esquerda e na maior medida entre as duas. 47

Figura 14: Curvas ROC das medidas da EMI para os segmentos da carótida comum, bulbo e ramo interno. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Categoria de risco absoluto (NCEP ATP III).	12
Tabela 2. Característica dos indivíduos saudáveis e com doença arterial coronariana de início precoce na avaliação da função microvascular cutânea.	31
Tabela 3. Área sob a curva da condutância vascular cutânea (CVC) pelos estímulos de acetilcolina, nitroprussiato de sódio e hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) em indivíduos controles e com DAC de início precoce.	35
Tabela 4. Vasodilatação máxima pelo estímulo da iontoforese com a acetilcolina (Ach), nitroprussiato de sódio (NPS) e hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) na condutância vascular cutânea e a presença de placa carotídea.	35
Tabela 5. Características clínicas dos portadores de doença arterial coronariana precoce e controle na avaliação da espessura médio-intimal (EMI).	37
Tabela 6. Mediana e percentis 25 e 75 dos diversos segmentos avaliados na EMI pelo aparelho (medida semiautomatizada) e pelos observadores A e B nos portadores da doença arterial coronariana precoce.	38
Tabela 7. Mediana e percentis 25 e 75 dos diversos segmentos avaliados na EMI pelo aparelho (medida semiautomatizada) e pelos observadores A e B nos controles.	38
Tabela 8. Análise de regressão linear múltipla das medidas da EMI nos vários segmentos nas medidas semiautomatizadas e manuais interobservadores.	45
Tabela 9. Concordância da medida semiautomatizada (aparelho) x observador A e interobservador (observador A x B) avaliada pelo coeficiente pelo coeficiente de correlação intraclasse.	46
Tabela 10. Avaliação da acurácia da medida da EMI pela ultrasonografia da artéria carótida.	47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
Apo E	Apolipoproteína E
ASC	Área sob a curva
AVE	Acidente vascular encefálico
CAPS	Estudo de progressão de aterosclerose carotídea
CCI	Coeficiente de correlação intraclasse
CHS	Estudo de Saúde Cardiovascular
CVC	Condutância vascular cutânea
DAC	Doença arterial Coronária
DM	Diabetes mellitus
EDHF	Fator hiperpolarizante do endotélio
EMI	Espessura médio intimal carotídea
ET	Endotelina
FE	Fração de ejeção
FRS	Estudo de risco de Framingham
FvW	Fator von Willerband
GMP-c	Monofosfato cíclico de guanosina
HRPO	Hiperemia reativa pós-oclusiva
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IL6	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IMPROVE	Progressão da EMI como preditor de eventos vasculares
LDF	Laser Doppler Fluxometria
LOX-1	Receptor de membrana da LDL oxidada
LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lioproteína de baixa densidade oxidada
LSCI	Sistema de imagem Laser <i>speckle</i>
MCP	Proteína quimioatrativa de monócitos
MMP	Metaloproteinase
NCEP-ATP III	Programa Nacional de Educação em Colesterol-Plano III de tratamento em Adultos
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear- κ B
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
NPS	Nitroprussiato de sódio
PAD	Pressão arterial diastólica
PAI-1	Ativador do plasminogênio do tipo 1
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistêmica
PCR	Proteína C Reativa
PROCAM	Estudo Prospectivo Cardiovascular de Münster

ROC	Receiver operator characteristic curve
ROI	Região de interesse
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RVN	Razão de verossimilhança negativo
RVP	Razão de verossimilhança positivo
SCORE	Avaliação sistemática de risco cardiovascular
TNF	Fator de necrose tumoral
UAP	Unidade arbitrária de perfusão
USC	Ultrasonografia de carótida
VCAM	Moléculas de adesão celular vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xii
1. Introdução	1
1.1 A doença aterosclerótica	1
2. Fundamentos teóricos	4
2.1. Função endotelial	4
2.2. Disfunção endotelial	7
2.3. Fatores de risco cardiovascular	10
3.0. Avaliação da função vascular como marcador de doença aterosclerótica	13
3.1. A fluxometria Laser Doppler (LDF) e o sistema de imagens Laser <i>speckle</i> de contraste	13
3.2. Análise da espessura média intimal carotídea	16
4.0. Importância do estudo	19
5.0. Objetivos	20
5.1. Primários	20
5.2. Secundário	20
6.0. Materiais e métodos	21
6.1. Pacientes	21
6.2. Critérios de Inclusão	21
6.3. Critérios de Exclusão	21
6.4. Aspectos Éticos	22
6.5. Variáveis Analisadas	22

6.5.1. Variáveis Clínicas	22
6.5.2. Variáveis Laboratoriais	23
6.6. Avaliação Não Invasiva	23
6.6.1. Ecocardiograma	23
6.6.2. Ultrassonografia das artérias carótidas	24
6.6.3. Fluxometria microcirculatória	26
6.7. Análise estatística	29
7. Resultados	29
7.1. Avaliação da função microvascular periférica	29
7.2. Avaliação da espessura médio-intimal carotídea	37
8. Discussão	49
8.1. Função microvascular cutânea	49
8.2. Espessura médio-intimal	51
8.3. Limitações	53
9. Resultados Gerais	53
10. Conclusões	54
11. Perspectivas Futuras	55
12. Referências Bibliográficas	56
13. Anexos	67
13.1. Anexo I - Aprovação CEP	67
13.2. Anexo II - TCLE	69
13.3. Anexo III - Ficha de Coleta de dados	72

Introdução

1.1. A doença aterosclerótica

A aterosclerose é uma doença sistêmica caracterizada por inflamação, disfunção endotelial e remodelamento vascular (Kenney et al., 2013), sendo assim uma doença complexa e multifatorial.

Além da associação entre a disfunção endotelial, fatores de risco cardiovascular e a doença aterosclerótica (Reriani et al., 2010) existe uma interação entre uma predisposição genética individual e condições ambientais (Bonetti et al., 2003) que estimulam a liberação de substâncias vasoativas e inflamatórias pelo endotélio (Chapman et al., 2003) e consequente desequilíbrio da homeostase vascular (Ando & Yamamoto, 2011).

No entanto, certos indivíduos não desenvolvem as manifestações da doença aterosclerótica apesar da presença destes fatores de risco e inversamente, muitos indivíduos com poucos fatores de risco apresentam disfunção endotelial que resulta em eventos cardiovasculares desfavoráveis (Bonetti et al., 2003; Reriani et al., 2010).

Apesar da doença ser mais prevalente em indivíduos idosos, também afeta adultos jovens (Rubin & Borden, 2012). Os indivíduos jovens que apresentam sintomas podem indicar uma doença de maior gravidade, quando é diagnosticada na ocorrência de um evento cardiovascular agudo (Klein & Nathan, 2003).

Estudo realizado em indivíduos jovens como o *Young Finns Study* (estudo de risco cardiovascular em jovens finlandeses), que apresentavam fatores de risco cardiovascular, mas sem quaisquer sinais clínicos de aterosclerose, mostraram que estes também eram afetados pela disfunção endotelial, como um indicador de piora da resposta vasodilatadora (Juonala et al., 2004).

Através de estudos de necrópsia, foi sugerida uma relação entre as alterações encontradas na parede arterial, (Flammer et al., 2012) com a transição da progressão de estrias gordurosas para lesão ateromatosa, em associação aos fatores de risco que estão presentes em adultos jovens e que essas lesões se iniciam na infância (Deanfield et al., 2007). A lesão ateromatosa progride silenciosamente através de um longo período pré-clínico, geralmente vindo a se manifestar na clínica durante a meia idade (Deanfield et al., 2007).

Atualmente tem se demonstrado que a disfunção endotelial ocorre no início do processo aterosclerótico e contribui para a formação, progressão e complicação da placa (Juonala et al. 2004) estando portanto associada a eventos cardiovasculares, cujas manifestações sistêmicas estão relacionadas com morbidade e mortalidade significativas (Sitia et al. 2010).

Os principais agentes celulares responsáveis pela aterosclerose são células endoteliais, leucócitos e a camada celular muscular intimal. A exposição do endotélio vascular resulta no estímulo da aterogênese e a um acúmulo de lipídio extracelular o qual leva ao recrutamento de monócitos que absorvem os lipídeos e conseqüentemente, originando as células espumosas (*foam cells*) (George & Movahed, 2008).

Devido à forte correlação entre a hemodinâmica vascular e a aterosclerose (Sitia et al., 2010), o endotélio tem sido considerado como um regulador da homeostase vascular, não sendo meramente uma barreira funcional (Deanfield et al., 2007). O endotélio responde a sinais físicos e químicos pela produção de uma grande variedade de fatores que regulam o tônus vascular, adesão e proliferação celular, antitrombóticos e a proliferação de células musculares lisas e inflamatórias (Dai G. et al., 2004 ; Reriani et al., 2010).

As medidas não invasivas de investigação da circulação periférica foram propostas para servir como um método complementar para as investigações invasivas das artérias coronárias (Anderson et al., 1995; Hansell et al., 2004). Existe uma associação da resposta endotelial entre pequenos vasos periféricos e grandes artérias em indivíduos saudáveis que podem ter implicações clínicas (Hansell et al., 2004), sugerindo que o endotélio possa ser observado em vasos sanguíneos de diferentes tamanhos e localizações, porque a disfunção endotelial não está confinada somente nas artérias coronárias mas também está presente nos vasos sanguíneos da circulação periférica (Hansell et al., 2004). Pelo fato da disfunção endotelial exibir uma característica sistêmica ela pode ser avaliada em diferentes territórios vasculares periféricos de fácil acesso (Debbabi et al., 2010).

A vasodilatação pode ser observada na microcirculação como um aumento do fluxo sanguíneo e nos condutos arteriais de maior calibre como um aumento do diâmetro do vaso (Debbabi et al., 2010). Durante a última década foram desenvolvidas técnicas menos invasivas ou não invasivas para a avaliação da

função endotelial, incluindo a vasodilatação mediada pelo fluxo da artéria braquial, durante a hiperemia reativa (George & Movahed, 2008), a avaliação da função microvascular com a fluxometria laser Doppler (Debbabi et al., 2010; Agarwal et al., 2012)

Nos últimos anos, a função endotelial microvascular também tem sido avaliada por um novo método não invasivo, através da medida do fluxo sanguíneo cutâneo com um sistema de imagens que utiliza a tecnologia laser *speckle* de contraste (LSCI; Mahé et al., 2012; Roustit et al., 2010; Humeau-Heurtier et al., 2012 1-2). Neste contexto, já foi demonstrado que a LSCI, quando combinada com a manobra de hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO), apresenta reprodutibilidade bastante superior àquela observada com a utilização de fluxometria laser Doppler ou com o sistema de imagens laser Doppler (Roustit et al., 2010).

Outro método não invasivo, validado desde meados de 1990, como substitutivo de preditor de risco da doença cardiovascular é a medida modo-B da ultrasonografia da espessura médio-intimal carotídea (Finn et al., 2009), pois tem sido sugerido que a medida do complexo médio-intimal possa ser uma representação mais precisa da aterosclerose (Robertson et al., 2012; Neji & Nambi, 2012).

Existe, portanto, uma necessidade de identificar indivíduos com risco de doença cardiovascular, de forma que as medidas preventivas possam ser instituídas antes que ocorra a doença vascular oclusiva (Davis et al., 1999).

2. Fundamentos teóricos

2.1. Função endotelial

O endotélio é composto por uma monocamada de células (Ando & Yamamoto, 2010) e exerce um importante papel no controle da função vascular mantendo a homeostase do sistema vascular (Szman et al., 2003-Parte I), não sendo uma barreira inerte e passiva como se pensava (Ando & Yamamoto, 2010).

O endotélio vascular regula a pressão arterial e o fluxo sanguíneo tecidual através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras, prevenindo também a formação de trombos através de mediadores antitrombóticos e fibrinólise. Também são importantes na angiogênese e remodelamento vascular pela produção de uma variedade de fatores de crescimento, e estão envolvidos na resposta imune e inflamatória tecidual pela interação da adesão leucocitária. Sabe-se que a função endotelial é regulada por mediadores químicos, tais como os hormônios, citocinas e neurotransmissores, mas é evidente que o estresse de cisalhamento (*shear stress*) gerado pelo fluxo e pressão sanguínea regula a função endotelial (Ando & Yamamoto, 2010).

O endotélio desempenha um papel fundamental no controle do tônus vasomotor pela síntese de pelo menos três diferentes agentes vasodilatadores. O primeiro, a prostaciclina, é um derivado do metabolismo do ácido araquidônico, tendo sua liberação estimulada pelo estresse de cisalhamento (*shear stress*) ou através de mediadores endógenos tais como: bradicinina, trombina, serotonina, produzindo vasodilatação pela adenil ciclase, o qual aumenta os níveis de monofosfato de adenosina nas células da camada muscular vascular (Deanfield et al., 2007; Ando & Yamamoto, 2010).

A prostaciclina previne a agregação plaquetária na superfície do endotélio e é um potente desagregador de grumos plaquetários existentes. A cicloxigenase é responsável tanto pela síntese de prostaciclina como de tromboxano A_2 nas plaquetas, causando posteriormente agregação plaquetária e vasoconstrição (Ando & Yamamoto, 2010).

O segundo agente vasodilatador produzido pelas células endoteliais é o óxido nítrico (NO). O NO é gerado pela conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina

pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (Shireman & Pearce, 1996; Szmítko et al., 2003-Parte I; Deanfield et al., 2007). O NO se difunde pela camada de células musculares vasculares onde estimula a guanilato ciclase o que leva a vasodilatação pelo GMPc (monofosfato cíclico de guanósina) (Deanfield et al., 2007; Reriani et al., 2010). O óxido nítrico é sintetizado em resposta fisiológica à tensão de cisalhamento (Furchgott & Zawadzki, 1980; Flammer & Lüscher, 2010) e por muitas substâncias vasoativas incluindo, a acetilcolina, bradicinina e trombina, além do difosfato de adenosina e a serotonina liberados pelas plaquetas que também estimulam o endotélio a produzir NO (Ando & Yamamoto, 2010).

Os efeitos vasodilatadores do NO protegem contra o dano vascular, inflamação e trombose, inibem a adesão leucocitária para o endotélio e mantém a camada muscular em um estado não proliferativo limitando a agregação plaquetária (Szmítko et al., 2003- Parte I).

Em resposta aos fatores de risco cardiovasculares tradicionais como hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia ocorrem modificações nas defesas do endotélio (Flammer & Lüscher, 2010). Por exemplo, a hipercolesterolemia estimula a adesão leucocitária endotelial, que está aumentada na aterosclerose. A oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL-ox) causa ativação endotelial e mudanças das características biológicas em parte pela redução da biodisponibilidade de NO (Smitko et al., 2003- Parte I).

O dano endotelial e a disfunção causada pela oxidação do LDL na patogênese da aterosclerose são exercidos pela ativação do receptor LDL oxidada-1 (LOX-1) (Szmítko et al., 2003- Parte II; Sitia et al., 2010). O LOX-1 é um receptor proteico de membrana do tipo II (Li & Metha, 2009), o qual, em condições fisiológicas, está envolvido na defesa do hospedeiro para *limpar* debris celulares. Em estados patológicos há ligação com elementos pró-aterogênicos como a LDL-ox (Smitko et al., 2003- Parte II), que ativa o endotélio causando acúmulo de lipídeos e resposta inflamatória (Li & Metha, 2009).

A angiotensina II, é um vasoconstrictor que age sinergicamente com o LDL-ox no dano endotelial (Li & Metha, 2009) e se opõe a ação do NO, provocando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 6 (IL6) e a proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1), estimulando o aumento da expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão intracelular (ICAM-1),

promovendo a adesão de monócitos no endotélio (Szmitko et al., 2003- Parte I). Conseqüentemente causa acúmulo de células e de deposição de LDL na matriz extracelular (Tuttolomondo et al., 2012; Smitko et al., 2003- Parte II).

A proteína C reativa (PCR) em níveis elevados é considerada como um fator de risco cardiovascular, porque pode promover a disfunção endotelial, atenuar a produção de NO e diminuir a sua biodisponibilidade. Estas modificações promovidas pelo processo inflamatório no endotélio vascular são o estágio inicial da progressão da lesão aterosclerótica (Szmitko et al., 2003- Parte I).

O terceiro fator vasodilatador liberado pelas células endoteliais é o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF, Shireman-Pearce, 1996). A hiperpolarização promovida pelo EDHF pode causar mudança transitória no potencial de membrana da camada muscular vascular, por uma via independente de NO, que aumenta a condução do potássio e a subsequente propagação da despolarização do músculo liso vascular para manter o tônus vasodilatador (Deanfield et al., 2007).

Dentre os agentes vasoconstritores, a endotelina é o mais potente vasoconstritor de uma família de três isoformas. A endotelina 1 (ET1) é sintetizada somente pelas células endoteliais, com uma capacidade pressora dez vezes maior que a angiotensina II e uma meia vida maior que a do fator relaxante derivado do endotélio (Shireman & Pearce, 1996). A ET 1 aumenta a expressão da LOX-1 (Shireman & Pearce, 1996) e a captação de LDLox no endotélio, reduzindo a concentração intracelular de NO (Szmitko et al., 2003-Parte I e Parte II).

2.2. Disfunção endotelial

A aterosclerose é uma desordem inflamatória crônica. Este conceito tem estimulado a descobrir e utilizar biomarcadores inflamatórios para predição de risco cardiovascular (Tuttolomondo et al., 2012).

A disfunção endotelial é um termo amplo que implica na diminuição da biodisponibilidade ou produção do óxido nítrico (NO) e no desequilíbrio entre a contribuição de fatores relaxantes derivado do endotélio e fatores de contração como a endotelina 1 (ET 1), angiotensina e substâncias oxidantes (Szmitko et al., 2003-Parte 1).

A disfunção endotelial está associada ao aumento do estresse oxidativo, que é um importante promotor do processo inflamatório (Davis P. F., 2009), sendo que o NO pode reduzir o estímulo de vários mediadores inflamatórios. A adesão celular aumenta a vulnerabilidade da placa aterosclerótica por um inibidor da transcrição do fator nuclear, fator κ B (NF κ B) que é um regulador de várias proteínas inflamatórias envolvidas na aterosclerose (Bonetti et al., 2003)

A inflamação é importante no processo da doença aterosclerótica podendo ser considerada como modulador primário do risco da doença (Shanker & Kakkar, 2010). Existe interesse crescente na avaliação de vários marcadores inflamatórios para a doença cardiovascular como: proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 6 (IL6), interleucina 8 (IL8), ligante solúvel CD40 e metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9)(Tuttolomondo et al., 2012; Shireman & Pearce,1996).

Os mecanismos de resposta inflamatória na aterosclerose estão envolvidas várias citocinas (Humphires et al., 2001). As citocinas agem através do recrutamento de monócitos/macrófagos na parede do vaso, aumentando o estímulo de adesão de moléculas como a MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócitos-1) (Shanker & Kakkar, 2010) figura 1. A síntese de fatores pró-trombóticos como o inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1) e fator von Willebrand (FvW), inclui o fator de necrose tumoral α (TNF α) produzido pela ativação de macrófagos e a interleucina 1 (IL1) também liberada pelos macrófagos, plaquetas e células endoteliais lesadas (Shanker & Kakkar, 2010).

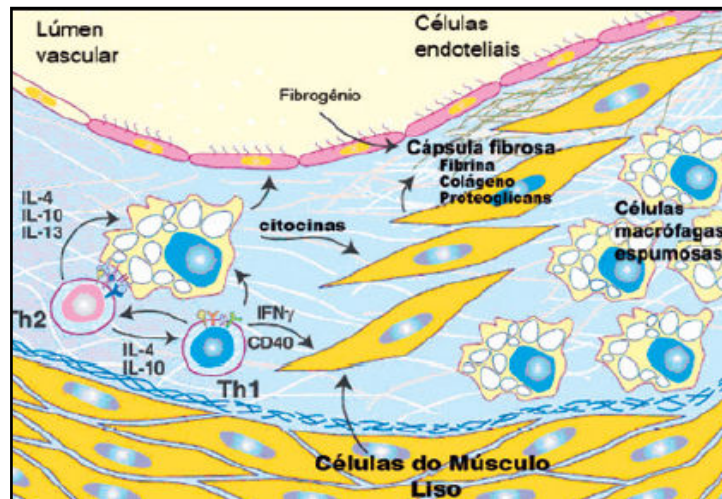


Figura 1. Processo inflamatório crônico. Progressão da lesão e interação entre macrófagos/células espumosas, linfócitos Th1 e Th2, estabelece um processo inflamatório crônico. As citocinas secretadas pelos linfócitos e macrófagos exercem ação, tanto pró-aterogênicas como aterogênica. As células do músculo liso migram da camada média da parede arterial, proliferam e secretam matriz extracelular que forma a placa fibrótica (Paiva et al. 2006 – Adaptado de Glass e Witzum).

Devido às evidências de que a doença aterosclerótica é um processo inflamatório crônico tendo envolvimento do LDL ox no seu desenvolvimento, levando ao acúmulo de ésteres de colesterol, resultando na formação de células espumosas (Paiva et al., 2006), sendo considerado um importante estímulo pró-inflamatório (Sítia et al., 2010). Na aterosclerose, o LDL ox, através do LOX-1 (proteína de membrana do tipo II) que é um receptor do LDL ox aumentando, contribui para a progressão da aterogênese induzindo a adesão de monócitos no endotélio, aumenta, a expressão de selectinas, VCAM-1, ICAM-1,3 estimula, a expressão da proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) e a migração de monócitos para a íntima. O LDL ox ligado ao LOX-1, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, estimula o ligante CD 40/CD 40L, e aumenta a apoptose das células musculares, o que resulta na expressão do fator tecidual e da metaloproteinase (MMP), que é uma enzima com atividade proteolítica contra os componentes da matriz extracelular como a elastina, proteoglicanos e o colágeno *perpetuando* a resposta inflamatória (Szmítka et al., 2003-parte I e parte II).

Vem sendo observado que a função endotelial está prejudicada não apenas nas artérias coronárias como nas artérias periféricas que possuem aterosclerose, provando o seu envolvimento sistêmico (Flammer et al., 2012).

A interleucina 6 (IL6) é uma citocina pleiotrópica que tem uma ampla propriedade de imunidade celular e humoral, relacionada com o processo inflamatório de lesão tecidual e defesa do hospedeiro, que contribui para a evolução clínica da doença cardiovascular, estimulando o processo aterosclerótico (Shanker & Kakkar, 2010).

A IL 6 está envolvida na inflamação, metabolismo ósseo, imunidade, reprodução, desenvolvimento neural e hematopoiese. É mediador central na síntese de proteínas pelo fígado na fase aguda do processo inflamatório (Humphries et al., 2001) e determinante primário da produção hepática da proteína C reativa (PCR) (Shanker & Kakkar, 2010; Szmitko et al., 2003-parte II).

A liberação de IL6 ocorre pela ativação de macrófagos por processo infeccioso ou ativação inflamatória na parede do vaso com contribuição de fibroblastos e células endoteliais (Humphries et al., 2001). A elevação da IL6 está associada ao aumento da espessura médio-intimal carotídea (Shanker & Kakkar, 2010).

No entanto, a produção de IL6 pode ocorrer na ausência de infecção e seu papel na doença arterial coronária é mais importante do que o PCR e o fibrinogênio, porém, ambas apresentam níveis séricos elevados na doença arterial coronária (Humphries et al., 2001; Mcglinchey et al., 2004).

Além disso, estudos genéticos em gêmeos, evidenciaram que a história familiar tem-se mostrado como fator de risco independente para a doença isquêmica mesmo quando foram considerados os fatores ambientais (Mcglinchey et al., 2004). Importante também é sua relação inversa entre a idade e o risco de DAC, pois a força do risco de doença cardiovascular é maior quanto menor for a idade de início da doença (Bachmann et al., 2012; Otaki et al., 2013).

Outro importante fator envolvido na aterosclerose é a apolipoproteína E (apo E), uma proteína plasmática envolvida no metabolismo do colesterol (Silva et al., 2008) e que contribui na formação de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e quilomícrons (Eichner et al., 2002).

As várias isoformas da apo E interagem diferentemente com um receptor lipoprotéico específico nas células hepáticas, alterando os níveis circulantes de colesterol (Eichner et al., 2002; Eifert et al., 2009).

A estrutura do gen da apo E é polimórfica, contendo três alelos os quais codifica as proteínas E2, E3 e E4, respectivamente (Anoop et al., 2010). A apo E a partir de VLDL, quilomícrons e remanescentes de quilomícrons se ligam a células receptoras hepáticas específicas. Uma lipoproteína envolvida na aterogênese e que se liga a lipoproteína de baixa densidade (LDL) é apo E2, (que contém o alelo 2) é menos eficiente em produzir e transferir VLDL e quilomícrons plasmáticos para o fígado devido as suas propriedades de ligação (Eichner et al., 2002; Eifert et al., 2009).

A apo E 4 tem maior afinidade pelo receptor LDL do que a apo E 2 e, por esta razão a lipoproteína, que é codificada pelo alelo 4, desaparece muito mais rapidamente do plasma, conseqüentemente uma redução da resposta celular do receptor hepático do LDL resulta no seu aumento plasmático (Eifert et al., 2009; Anoop et al., 2010). Portanto a apo E4 pode ser considerada aterogênica e, em recente metanálise foi associada com um alto risco de doença arterial coronária. A apo E2 parece mostrar um efeito protetor (Silva et al., 2008).

2.3. Fatores de risco cardiovascular

A maioria, se não todos os fatores de risco, relacionados com a aterosclerose, morbidade e mortalidade cardiovascular, incluindo os fatores de risco tradicionais e não tradicionais foram associados à disfunção endotelial (Bonetti et al., 2003; Flammer et al., 2010).

Os algoritmos de avaliação de risco, como o estudo de Framingham realizado nos Estados Unidos, incluíram o acompanhamento dos fatores de risco tradicionais como idade, sexo, colesterol total, HDL-c, pressão arterial sistólica, (ou tratamento para hipertensão), diabetes mellitus, tabagismo, idade e não tradicional como a obesidade (Greenland et al., 2007; Robertson et al., 2012).

Muitos destes fatores de risco como a dislipidemia, hipertensão, diabetes e tabagismo, estão associados com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou aumento do estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode diminuir a biodisponibilidade do NO e promover dano vascular. Sendo assim, o

estresse oxidativo é considerado um dos principais mecanismos envolvidos na disfunção endotelial (Bonetti et al.,2003, Granger et al., 2010).

O estudo PROCAM (Estudo Prospectivo Cardiovascular de Münster), realizado em Münster na Alemanha, avaliou como variáveis: sexo, LDL-c, HDL-c, triglicerídeos, pressão arterial sistólica, tabagismo, história familiar, e presença ou ausência de diabetes (Greenland et al., 2007).

O escore de risco SCORE (avaliação sistemática do risco cardiovascular), realizado em países europeus, é semelhante ao de Framingham, porém ajusta o risco de acordo com a prevalência da doença aterosclerótica. Todos são disponíveis para estimativa de risco absoluto de eventos cardiovasculares em 10 anos. (Greenland et al., 2007). No entanto, essa estimativa de curto ou médio prazo é inadequada quando se busca prever a doença aterosclerótica em indivíduos jovens. Alguns algoritmos já estimam o risco em 30 anos ou em toda a vida, mas ainda necessitam de validação (Greenland et al., 2007).

Estas projeções de risco são amplamente utilizadas a fim de selecionar os candidatos mais adequados para as terapias medicamentosas destinadas a reduzir o risco cardiovascular. Diretrizes sobre o colesterol e hipertensão arterial nos Estados Unidos e em outros países da Europa têm seguido o princípio de que a intensidade do tratamento deve ser associada com a gravidade do risco cardiovascular (Grundy et al.,2002; Greenland et al., 2007).

Os pacientes são estratificados em risco alto, intermediário ou baixo, de acordo com a estimativa do escore de Framingham em 10 anos, para recomendar metas a serem alcançadas, como no National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) (Grundy et al.,2002; 2004). O NCEP-ATP III, em 2004, dividiu o risco cardiovascular intermediário em risco moderadamente alto e risco moderado, empregando o risco absoluto em 10 anos para sugerir abordagem terapêutica visando à redução dos níveis séricos de colesterol (Grundy et al., 2004 e 2002; Greenland et al., 2007). Tabela 1.

Tabela. 1 Categorias de risco absoluto de acordo com o National Cholesterol Education Program (NCEP) (Grundy et al., 2004; Greenland et al., 2007)

Categoria de risco absoluto em 10 anos	Definição de categoria
Alto Risco	DAC*, risco equivalente DAC† incluindo + 2 fatores de risco maiores ‡ + risco DAC maior que 20% em 10 anos§.
Risco moderadamente alto	+ 2 fatores de risco maiores ‡ mais o risco de DAC 10% a 20% em 10 anos
Risco moderado	+ 2 fatores de risco maior mais o risco de DAC menos que 10%
Risco Baixo	0 a 1 fator de risco maior (risco de DAC em 10 anos menor que 10%) §

*DAC inclui história de infarto do miocárdio, angina instável, angina estável, angioplastia ou cirurgia de revascularização, ou evidência de isquemia miocárdica clinicamente significativa. † Risco equivalente de DAC inclui manifestações clínicas de formas não coronarianas de doença aterosclerótica (doença arterial periférica, aneurisma de aorta abdominal, doença arterial carotídea: AIT ou AVE de origem carotídea com obstrução acima de 50%), DM e +2 fatores de risco em 10 anos para DAC menor que 20%. ‡ Fatores de risco maior inclui tabagismo, HAS (PA \geq 140/90 mmHg ou medicação anti-hipertensiva), HDL baixo (< 40mg/dl), história familiar de DAC precoce (DAC em homens com parentesco de primeiro grau e menos de 55 anos; em mulheres com parentesco de primeiro grau com menos de 65 anos) e idade (homens com idade maior ou igual a 45 anos; mulheres com idade maior ou igual a 55 anos). § Quase todas as pessoas com fator de risco 0 a 1 apresentam menos de 10% risco em 10 anos e a avaliação de risco em 10 anos não se faz necessária. DAC = doença arterial coronária; HAS = hipertensão arterial sistêmica; HDL = lipoproteína de alta densidade. (Adaptado de Grundy et al., 2004; Greenland et al., 2007).

As diretrizes atuais que levam em consideração escores como o de Framingham e a Avaliação Sistemática de Risco Cardiovascular (SCORE), consideram uma intervenção mais agressiva para aqueles com risco elevado. Entretanto, muitos pacientes que apresentam infarto agudo do miocárdio têm risco intermediário ou baixo, o que demonstra uma limitação da predição de risco por estes métodos de avaliação. Desse modo, novos métodos de avaliação de risco *estão sendo desenvolvidos* como a medida da espessura médio-intimal das carótidas,(Darabian et al., 2013), biomarcadores como a microalbuminúria (Klausen et al., 2004; Weir MR, 2007), proteína C reativa (PCR) e a homocisteína (US Preventive Service Task force, 2009) e o índice tornozelo - braquial (Lin et al., 2013) na detecção do processo aterosclerótico.

3.0. Avaliação da função vascular como marcador de doença aterosclerótica

3.1. A fluxometria laser Doppler (LDF) e o sistema de imagens com laser *speckle* de contraste

A técnica do LDF depende do efeito Doppler e baseia-se na reflexão do feixe de luz laser de baixa intensidade. Quando o feixe laser atinge partículas em movimento, principalmente células sanguíneas no tecido em estudo, a luz é reemitida com uma mudança no comprimento de onda. O tamanho, frequência e distribuição destas mudanças no feixe reemitido atinge o fotodetector e são relacionados ao número e velocidade das células sanguíneas. Diferentes sinais podem ser registrados, porém o fluxo de hemácias resultante do produto da velocidade e concentração das células circulantes para um dado volume é a mais utilizada. A luz refletida é, portanto convertida em um sinal elétrico, sendo proporcional à perfusão tecidual microvascular (efeito Doppler) (Cracowisk et al., 2006; Mahé. et al.; 2012).

Inicialmente, os testes de LDF foram utilizados como marcadores para doenças tais como a esclerose sistêmica. Porém, pela ausência de dados padronizados foram abolidos na prática clínica diária. Nos dias atuais tem sido utilizada na avaliação do fluxo sanguíneo da pele e também na avaliação da função endotelial de indivíduos hipertensos, dislipidêmicos e diabéticos. (Roustit, et al., 2010)

O recente desenvolvimento da técnica do sistema de imagem laser *speckle* de contraste (LSCI) para monitorar a função microvascular cutânea baseia-se no fenômeno *speckle* obtendo assim um mapa da perfusão tecidual (Mahé et al.; 2012)

Desde a década de 1990, tem se observado o aumento do interesse pelo LSCI acrescentando a técnica do LDF já existente, exercendo uma vantagem sobre o LDF e oferecendo uma imagem bidimensional da perfusão (Humeau-Heurtier et al., 2012-1).

Os *speckles* correspondem a áreas escuras e brilhantes geradas pela luz refletida coletada e projetada em uma tela. Quando a luz a laser incide em uma superfície [região tecidual de interesse (ROI)] as partículas em movimento na região tecidual iluminada leva a flutuações do *speckle* no detector (Mahé G. et al.; 2012),

gerando uma imagem da perfusão microvascular (Humeau-Heurtier et al., 2012-2). As células sanguíneas dentro do vaso constituem a principal fonte de dispersor móvel no tecido biológico (Senarathna et al., 2013) figura 2 e figura 3.

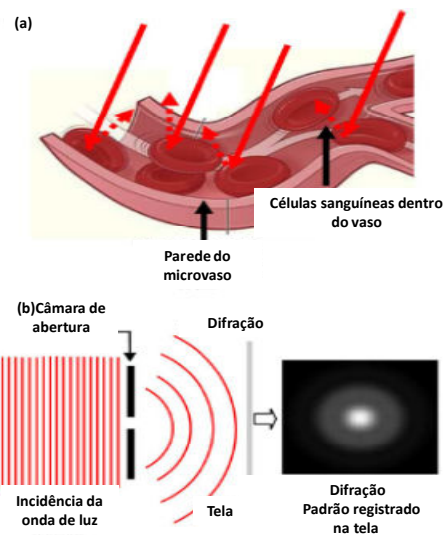


Figura 2. Produção do laser speckles (a). A luz a laser incidindo nas células sanguíneas do microvaso (setas vermelhas) é refletida (setas pontilhadas). (b) A onda de luz refletida é difratada através de uma câmara de abertura para formar um padrão de interferência na tela. A luz difratada resulta da combinação de ondas, originada de cada célula sanguínea que age como um ponto de fonte de luz. (Adaptado de Senarathna et al., 2013).

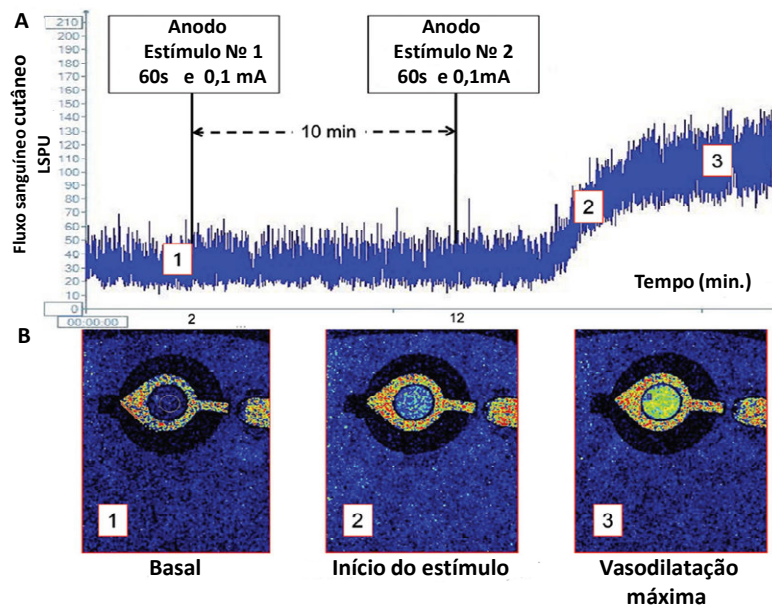


Figura 3. Sistema de imagem laser *speckle* associado à iontoforese. **A.** Registro das mudanças do fluxo sanguíneo induzido pela iontoforese (2 estímulos anodais por um intervalo de 10 minutos). **B.** Imagem do fluxo sanguíneo cutâneo induzido pela iontoforese (Adaptado de Mahé et al., 2012).

Os dados podem ser expressos em unidade arbitrária de perfusão (UAP), em percentagem ou percentagem da vasodilatação máxima ou expressa como condutância vascular cutânea a qual é o fluxo dividido pela pressão arterial média (UAP/mmHg). Conseqüentemente levando em consideração as variações na pressão arterial que podem afetar o fluxo sanguíneo local (Mahé G. et al.; 2012).

A microcirculação constitui-se de vasos com menos de 150 μ m em diâmetro, incluindo arteríolas, capilares e vênulas (Boer et al., 2012) que são importantes na determinação da resistência vascular periférica e também um local onde iniciam as manifestações da doença cardiovascular, em particular o processo inflamatório (Levy et al, 2001).

A função primária da microcirculação é melhorar o suprimento de nutrientes e oxigênio para os tecidos em resposta a uma variação de demanda. Uma perfusão adequada da rede microcirculatória é essencial para a integridade da função de órgãos e tecidos. (Boer et al., 2012).

A disfunção microvascular tanto nos vasos de resistência como no leito capilar de nutrição tecidual está estabelecida na obesidade, hipertensão e resistência à insulina, levando à piora da perfusão tecidual que afeta múltiplos órgãos e tecidos, envolvendo vários leitos vasculares. A disfunção microvascular tem demonstrando ser um indicador de um aumento da incidência de eventos cardiovasculares (Boer et al, 2012). Tem sido relatada uma estreita relação entre a disfunção microvascular sistêmica e a disfunção da microcirculação cutânea (Mahé et al., 2012).

O escore de risco de Framingham (FRS) está inversamente correlacionado com o recrutamento da densidade máxima de capilares da pele e a reserva de fluxo coronário. Dados epidemiológicos e experimentais também sugerem que a disfunção microvascular relacionada com a obesidade contribui para o desenvolvimento do risco cardiometabólico tais como hipertensão e resistência à insulina (Boer et al, 2011).

Na doença arterial coronária estudos têm mostrado através da avaliação da microcirculação, que a resposta à vasodilatação está deprimida quando utilizados estímulos farmacológico (Ach) e fisiológico (hiperemia reativa pós-oclusiva) (Agarwal et al., 2012).

3.2. Análise da espessura média intimal carotídea

A utilização da ultrasonografia das carótidas é um método não invasivo e relativamente simples. É crescente o interesse, particularmente na avaliação da espessura médio-intimal (EMI) como preditor de risco cardiovascular (Robertson et al., 2012).

Esta técnica, utilizada e validada a partir da década de 1980, atualmente utilizada em pesquisas, principalmente na avaliação das mudanças estruturais na parede arterial, como um marcador substituto da doença aterosclerótica (Oren et al., 2003). Estas avaliações têm sugerido que o aumento da EMI possa estar relacionado a eventos cardiovasculares futuros, principalmente em adultos jovens

para a detecção de doença cardiovascular subclínica (Finn et al., 2010; Roman et al., 2011; Inaba et al. 2012).

A relação entre o risco cardiovascular e a extensão da aterosclerose na meia idade e nos indivíduos idosos está bem estabelecida, porém estudos de necropsia têm sugerido similar associação que pode estar presente na população de adultos jovens (Oren et al., 2003).

A medida da espessura médio-intimal (EMI) carotídea depende da idade e sexo, sendo realizada pela distância entre a interface lumen-intima e a interface médio-adventícia (Robertson et al., 2012). A camada média e a íntima são indistinguíveis à ultrasonografia sendo então apropriado medir a espessura três vezes nos planos anterior, lateral e posterior em um total de 18 medidas (Darabian et al., 2013) e de acordo com o último consenso da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Stein et al., 2008).

Um estudo realizado por Polak et al. associou os riscos cardiovasculares em indivíduos com média de idade de $45,2 \pm 3,63$ anos e a EMI. Este estudo comparou as medidas da EMI na carótida comum com as medidas realizadas no bulbo e ramo interno. Foi então observado que as alterações na EMI estavam relacionadas com a idade, níveis mais elevados do LDL-c, tabagismo e hipertensão em todos os segmentos analisados (Polak et al., 2009).

O estudo de risco de aterosclerose em adultos jovens (ARYA) mostrou que a idade, índice de massa corpórea (IMC), pressão de pulso, níveis de LDL-c elevados e sexo masculino eram fatores independentes para aumento da EMI (Oren et al., 2003).

Foi também demonstrado que a EMI está significativamente relacionada com os eventos cardiovasculares nos estudos, *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC), *Rotterdam Coronary Calcification Study*, *Cardiovascular Health Study* (CHS) e *Carotid Atherosclerosis Progression Study* (CAPS). No estudo de progressão da EMI para eventos cardiovasculares em uma população europeia de alto risco (IMPROVE) a combinação da medida da EMI com os fatores de risco de Framingham foi melhor em prever eventos cardiovasculares futuros do que a avaliação de risco clássico de Framingham isoladamente (Doneen & Bale, 2013).

A espessura médio-intimal é um marcador de aterosclerose e pode ser usado para detectar a doença arterial coronariana (DAC) precoce em estágio subclínico. Apresenta como vantagens o fato de ser um exame complementar não invasivo, seguro e relativamente barato e pode ser realizado repetidamente sem efeitos adversos (Cobble & Bale, 2010). Diretriz recente aponta para os métodos de imagem, no qual a USC (ultrasonografia de carótidas) está inserida, classe de recomendação II com nível de evidência B, podendo ser considerado para a avaliação de risco tanto o aumento dos valores da EMI quanto a presença de placa aterosclerótica (Perk et al., 2012).

A EMI está associada às doenças cardiovasculares e é preditor independente de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. Quando foi medida somente no segmento da carótida comum, o risco absoluto anual de evento variou de 0,7% a 2,2% para o infarto do miocárdio, de 0,4% a 1,8% para o acidente vascular cerebral e de 1,8% a 3,2% para doença cardiovascular total. Quando foi medida em vários segmentos (carótida comum, bifurcação, bulbo e ramo interno), o risco absoluto anual de infarto do miocárdio para cada milímetro foi de 1,3% e 1,4% em homens e mulheres, respectivamente, e para acidente vascular cerebral risco foi 0,5% em ambos os sexos (Simon et al., 2010). Uma metanálise de 11 estudos de base populacional (54.336 pacientes) mostrou que a placa de carótida, em comparação com a EMI, teve acurácia significativamente maior para a predição de eventos futuros de infarto do miocárdio fatal e não fatal (Inaba et al., 2011).

A aferição da medida da EMI pelo USC apresenta vários desafios, incluindo sua reprodutibilidade e dependência do operador. Ainda hoje existem importantes diferenças nas medidas realizadas por diferentes laboratórios de imagem. Dentre elas podemos citar o local da aquisição da imagem (segmento e/ou parede de medida) e a determinação do limite de eco definindo as interfaces quando realizada de forma automática ou manual. Variabilidades intra e interobservador foram encontradas tanto para medições semiautomatizadas quanto manuais (Inci et al 2013).

Estudo realizado para avaliar a presença de DAC precoce em pacientes com doença reumática avaliou a medida da EMI manual e semiautomatizada, para avaliar a concordância das medidas interobservador empregando o coeficiente de correlação intraclassa (CCI) e a análise gráfica de Bland-Altman. Foi observada boa concordância com CCI de 0,74 (0,69 e 0,77 para carótida comum direita e esquerda

respectivamente), também demonstrada pelos gráficos de Bland-Altman. Estas análises sugeriram que o método é reprodutível (Di Geso et al., 2012) como ferramenta para a detecção de doença aterosclerótica subclínica e avaliação de risco cardiovascular (Vanoli et al.,2013).

4. Importância do estudo

Nas últimas décadas cresceu o interesse no estudo da epidemiologia cardiovascular, especialmente com foco na detecção precoce da aterosclerose empregando métodos não invasivos, na tentativa de interferir na história natural dessa patologia.

Dentre os métodos não invasivos para avaliação estrutural do vaso para a predição de risco cardiovascular, destacam-se a angiotomografia coronária e a medida da espessura médio-intimal carotídea (EMI). A medida da EMI tem sido pesquisada como uma ferramenta na identificação de indivíduos sob maior risco cardiovascular.

Diversos estudos adotaram técnicas de medidas não invasivas para detectar a disfunção vascular endotelial que está envolvida precocemente no desenvolvimento da aterosclerose (Flammer & Lüscher, 2010). A avaliação do fluxo da artéria braquial com testes de hiperemia reativa pós-oclusiva (Jounala et al., 2004) e mais recentemente o sistema de imagem a laser de contraste têm sido utilizados para avaliar a função microvascular, sugerindo uma relação com o a disfunção vascular sistêmica (Mahé et al.;2012).

Várias razões podem ser apresentadas para um maior interesse nestes indicadores de doença vascular como potenciais substitutos dos marcadores de risco cardiovascular, uma vez que os fatores de risco cardiovascular estabelecidos são insuficientes para identificar acuradamente aqueles indivíduos que poderão vir a sofrer a doença no futuro. A viabilização de métodos não invasivos para avaliação de doença vascular subclínica pode melhorar o entendimento da patogênese, progressão e prognóstico da doença aterosclerótica (Rubin & Borden, 2012). Este estudo poderá acrescentar informações por métodos não invasivos capazes de contribuir para a predição de eventos cardiovasculares futuros.

5. Objetivos:

5.1 Primários

1. Comparar a função microvascular de indivíduos com doença arterial coronariana precoce e de indivíduos saudáveis, empregando o sistema de imagem laser *speckle* de contraste.
2. Investigar a associação das medidas da EMI realizadas em vários segmentos da carótida com a doença arterial coronariana precoce.

5.2. Secundário

1. Avaliar a concordância nas medições manuais e semiautomatizadas realizadas por um mesmo observador e interobservador na medição manual da EMI.

6. Materiais e métodos

6.1. Pacientes

Este foi um estudo transversal de pacientes com DAC precoce acompanhados no Instituto Nacional de Cardiologia e indivíduos saudáveis, voluntários aleatórios (grupo controle), recrutados entre setembro de 2011 e maio de 2013.

Foram estudados 94 indivíduos, sendo 58 com DAC precoce, definida como indivíduos que apresentaram angina estável, angina instável ou infarto agudo do miocárdio e 36 controles sem DAC. A partir destes, foram realizados dois estudos, sendo o primeiro uma avaliação da reatividade microvascular em pacientes com DAC precoce e controles pareados por sexo e idade, e o segundo uma análise do total de pacientes e controles quanto às medidas da espessura médio-intimal carotídea.

6.2. Critérios de inclusão

DAC precoce foi considerada aquela manifestada em homens com menos de 45 anos e mulheres com menos de 55 anos, de acordo com a história clínica de angina estável ou instável, coronariografia evidenciando estenose maior ou igual a 50% em pelo menos uma coronária epicárdica, história de infarto agudo do miocárdio confirmado pelo prontuário ou relatório médico, história de revascularização do micárdio cirúrgica ou por angioplastia percutânea.

6.3. Critérios de exclusão:

1. Pacientes com doenças autoimunes.
2. Pacientes com neoplasia.
3. Mulheres grávidas
4. Pacientes com insuficiência renal com creatinina $>2,0$ mg/dl.
5. DPOC e asma brônquica
6. Diabetes *Mellitus* tipo I
7. Pacientes com dados gravados por não estarem disponíveis para análise.

6.4. Aspectos Éticos

A participação do estudo foi voluntária. Todos os pacientes e controles foram esclarecidos a respeito dos objetivos e métodos do trabalho e assinaram um termo consentimento livre e esclarecido (**Anexo II**) O estudo teve aprovação do Comitê de Ética em pesquisa pelo Instituto Nacional de Cardiologia, sob o número 0332/1105211- CAAE e executado conforme suas determinações éticas. (**ANEXO I**)

6.5. Variáveis analisadas (ANEXO III)

6.5.1. Variáveis clínicas:

Os pacientes foram submetidos a exame físico e anamnese, responderam a um questionário (Anexo III).

1. Tempo da doença
2. Tempo de tabagismo e Carga tabágica (maços /ano)
3. Pressão arterial (mmHg) com esfigmomanômetro de mercúrio
4. Peso (Kg) com balança digital antropométrica com capacidade máxima até 200 kg.
5. Altura (cm) régua antropométrica (balança digital) com escala de 1,00 metro a 2,10 metros, divisão de 0,5 cm.
6. Circunferência da cintura com trena antropométrica (cm com resolução em milímetros).
7. Circunferência do quadril (com trena antropométrica ao nível da linha acetabular, em cm)
8. Índice de massa corpórea ($IMC = \text{kg}/\text{m}^2$) calculado pela fórmula $\text{peso}/\text{altura}^2$

Todos os sujeitos da pesquisa foram submetidos à anamnese e exame físico e realizaram testes de bioquímica sendo as amostras de sangue venoso obtidas de manhã após 12 horas de jejum.

6.5.2. Variáveis laboratoriais:

1. Hemograma completo, hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucograma, contagem de plaquetas.
2. Colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e triglicerídeos (mg/dl)
3. Eletrólitos: Sódio e Potássio (mg/dl)
4. Ácido úrico (mg/dl)
5. Glicemia de jejum (mg/dl) e hemoglobina glicada (mg%)
6. Dosagem de insulina sérica (mcUI/ml)
7. Uréia e creatinina (mg/dl)
8. Hormônio estimulador da tireóide (TSH) e tiroxina livre (T4L) (μ UI/L)
9. Apolipoproteína A - I (Apo A) e apolipoproteína B (Apo B) (mg/dl)
10. Proteína C reativa (mg/dl)
11. Aminotransferase glutâmico oxalacética (TGO/AST) e aminotransferase glutâmico pirúvica (TGP/ALT) (mg/dl)
12. Homocisteína (umol/l)

6.6. Avaliação Não Invasiva

6.6.1. Ecocardiograma

Os exames foram realizados nos pacientes selecionados e agendados no Instituto Nacional de Cardiologia (INC).

Foram realizados ecocardiogramas utilizando o aparelho Vivid S6 (*Cardiovascular Ultrasound System-GE*) com o transdutor 3Mhz Todos os exames foram gravados e avaliados por dois observadores independentes.

As dimensões cardíacas foram medidas conforme as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia pelo modo M (diâmetro atrial esquerdo, diâmetros diastólico e sistólico finais do VE). A avaliação da função sistólica ventricular esquerda pela fração de ejeção foi determinada pelo método de Teichholz no modo M e Simpson pelo modo B pelas janelas apicais 4 e 2 câmaras considerando insuficiência ventricular esquerda menos que 45%. Análise da função segmentar para avaliar áreas isquêmicas.

A função diastólica foi determinada pelo fluxo mitral, obtido pelo cursor posicionado na extremidade dos folhetos mitrais e pelo Doppler tecidual septal e lateral na janela apical 4 câmaras (Otto CM, 2007) sendo então, realizadas as seguintes medidas:

- Velocidade da onda E e da onda A com Doppler pulsado do fluxo mitral;
- Relação entre as velocidades das ondas E/A >1 pelo fluxo transmitral;
- Doppler Tecidual com avaliação das ondas E' septal e lateral, relação E/E'
- DT (tempo de desaceleração do enchimento inicial) com valor normal até 240 ms; (Otto C M, 2007)

Enchimento atrial esquerdo avaliado pelo fluxo da veia pulmonar superior direita medida 1 cm a 2cm da veia, medindo o pico da velocidade sistólica e diastólica e pico do fluxo reverso atrial. (Otto C M, 2007)

6.6.2. Ultrassonografia das artérias carótidas

A espessura médio- intimal (EMI) foi avaliada de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Stein et al., 2008) em aparelho de ultrassom Vivid S6 com transdutor de 7,5 MHz (GE Healthcare, Wisconsin, EUA). A EMI foi medida em vários segmentos (carótida comum, bulbo, e ramo interno) nas carótidas direita e esquerda.

A imagem bidimensional foi focada na parede posterior da carótida comum medindo da borda da interface luminal da intima até a borda da interface da media-

adventícia a 1 cm da bifurcação na parede posterior da carótida comum (Stein et al., 2008; Neji & Nambi, 2012), com a imagem congelada e sincronizada com a onda R do eletrocardiograma no final da diástole (Stein et al., 2008; Roman et al., 2012) em três insonações de angulações diferentes, anterior, lateral e posterior em um total de 18 medidas com a medida automatizada (Stein et al., 2008; Darabian et al., 2013) e apresentando uma média de valores da espessura médio-intimal (Darabian et al., 2013). Foi também medido a espessura médio-intimal da bifurcação e ramo interno (Finn et al., 2010; Inaba et al., 2011; Robertson et al., 2012; Peters & Bots, 2013).

A concordância foi avaliada pelo observador A entre as medidas, manual e semiautomatizadas, com intervalo mínimo de 4 semanas. As aferições manuais foram realizadas de forma independente por dois observadores (A e B), um deles com certificação em ecocardiografia pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, e que realizam mais de 1200 exames/ano e, empregadas para calcular a concordância interobservador.

Como medidas normais foi considerado $< 1,0$ mm e acima de $1,5$ mm foi considerado como placa aterosclerótica (Stein et al., 2008; Finn et al., 2010) figura 4.

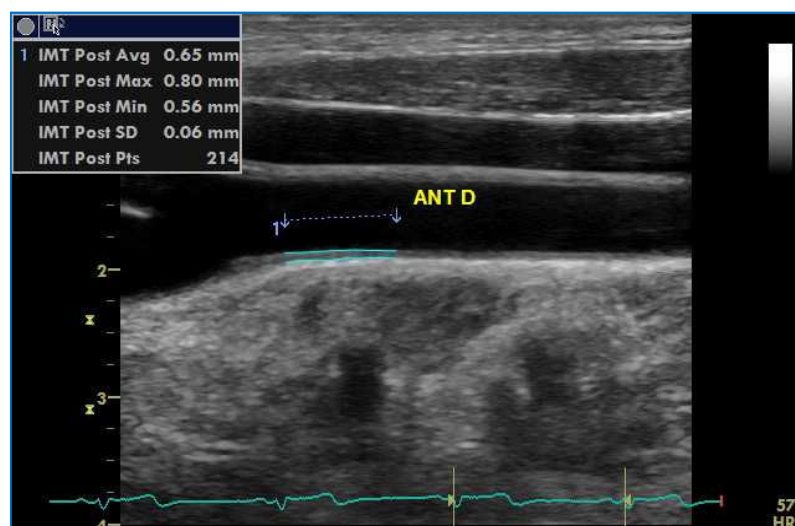


Figura 4. Duplex Scan de carótida com avaliação da espessura miointimal

6.6.3. Fluxometria microcirculatória

O fluxo microcirculatório cutâneo foi avaliado através de um sistema de análise de imagens (figura 5) que utiliza tecnologia de luz laser (*laser speckle contrast analysis*, Pericam PSI system, Perimed AB, Sweden). O sistema PSI permite o registro contínuo, em tempo real com alta resolução do fluxo microcirculatório de maneira independente do operador. As imagens foram analisadas através de software fornecido pelo fabricante.

Foram escolhidos aleatoriamente dois pontos na pele na face ventral do antebraço com aproximadamente 5cm de distância entre eles, evitando-se áreas de pelos, pigmentação alterada, escoriações e veias visíveis. Foram então instalados dois eletrodos para a administração de fármacos através de discos adesivos (LI611, Perimed, Järfälla, Suécia, figura 5) e determinadas três áreas de medida, correspondendo a regiões circulares de aproximadamente 80 mm². Duas das áreas de medida se encontravam nos eletrodos (iontoforese) e a terceira (hiperemia reativa) era adjacente aos eletrodos. Foi utilizado um sistema de coxins a vácuo (AB Germa, Kristianstad, Sweden) para evitar os artefatos de medida que poderiam resultar dos movimentos do braço.

A iontoforese cutânea de acetilcolina (Ach 2% peso/volume) ou nitroprussiato de sódio (NPS 2% peso/volume, *Sigma Chemical CO, USA*), solução é administrada em uma câmara no eletrodo, c foi realizada através da utilização de um sistema de micro-farmacológico (PF 751 Perilont USB Power Supply, Perimed, Suécia) através de correntes anódicas (Ach) e catódicas (NPS) de 30, 60, 80, 120, 152 e 180µA por 10 segundos com um intervalo de 1 minuto entre cada aplicação . As cargas totais de corrente foram de 0.3; 0.6; 0.9; 1.2; 1.5; e 18 mC, respectivamente. O eletrodo de dispersão da corrente foi instalado aproximadamente 15 cm abaixo das câmaras de eletroforese.

Para os testes da hiperemeia reativa pós-oclusiva (HRPO), foi realizada a oclusão arterial através do manguito de esfignomanômetro aplicado no braço com pressão supra-sistólica, definida como 50 mmHg acima da pressão arterial sistólica, durante 3 minutos. Imediatamente após a liberação do manguito o fluxo máximo foi registrado.

As medidas de fluxo microvascular cutâneo, em unidades arbitrárias de perfusão (UAP), foram divididas pela pressão arterial média para gerar dados de condutância vascular cutânea (CVC), expressas em unidades de UAP/mmHg.

A avaliação microcirculatória foi realizada 20 minutos após o repouso na posição supina em uma temperatura ambiente controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e cerca de 1h após uma refeição leve. Na manhã dos testes, os pacientes receberam as medicações habituais, exceto o mononitrato de isossorbida, que foi administrado após o término da avaliação da reatividade microvascular.

Imediatamente antes do registro do fluxo microcirculatório, foram medidas a pressão arterial (PAS) sistólica e diastólica (PAD) duas vezes com um intervalo de 1 minuto entre elas, utilizando um esfignomômetro de mercúrio e os valores médios registrados, sendo a pressão arterial média (PAM) calculada como $\text{PAD} + [(\text{PAS} - \text{PAD}) / 3]$ figura 5 e figura 6.

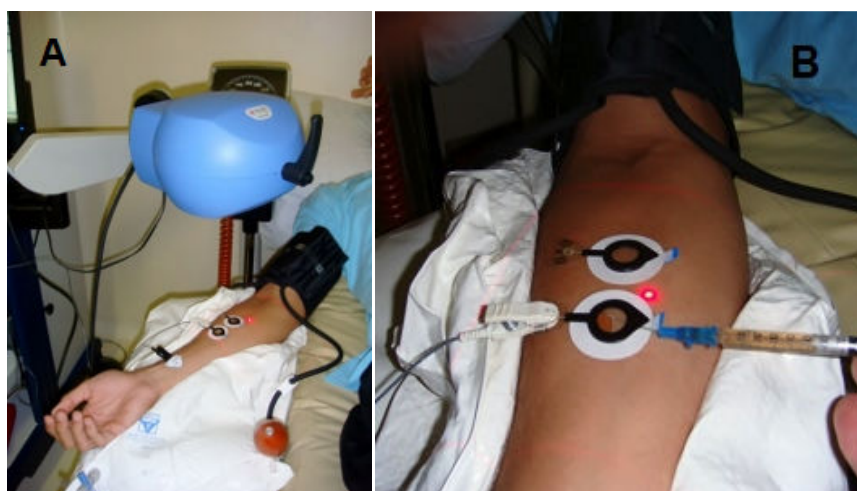


Figura 5. A - Fluxometria laser *speckle* com transdutor incidindo luz laser sobre a pele. **B**-Iontoforese com administração da droga (Ach ou NPS) para o teste de reatividade na câmara do eletrodo e esfignomômetro para hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO). Laboratório do Instituto Nacional de Cardiologia (INC).

A figura 6 mostra a reatividade microvascular com LSCI com resposta normal. Foram colocados dois eletrodos na face ventral do antebraço (apoiado em um coxim a vácuo para evitar artefatos de movimentos) um eletrodo contendo água (área escura) e outro com acetilcolina (Ach) apresentando a vasodilatação máxima

(mosaico de cores), demonstrando as flutuações dos *speckles*. Na figura 7 demonstra uma resposta deprimida com o estímulo da micro-iontoforese de Ach.

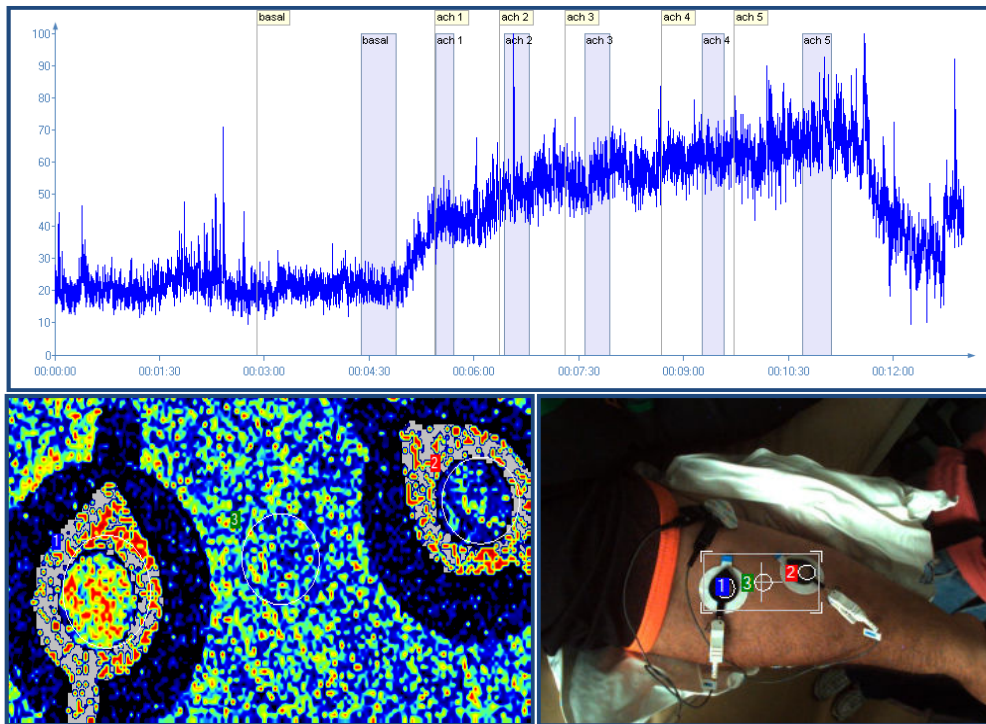


Figura 6. A fluxometria a laser e resposta normal da vasodilatação pelo estímulo da acetilcolina (Ach). Imagens do Laboratório do Instituto Nacional de Cardiologia (INC).

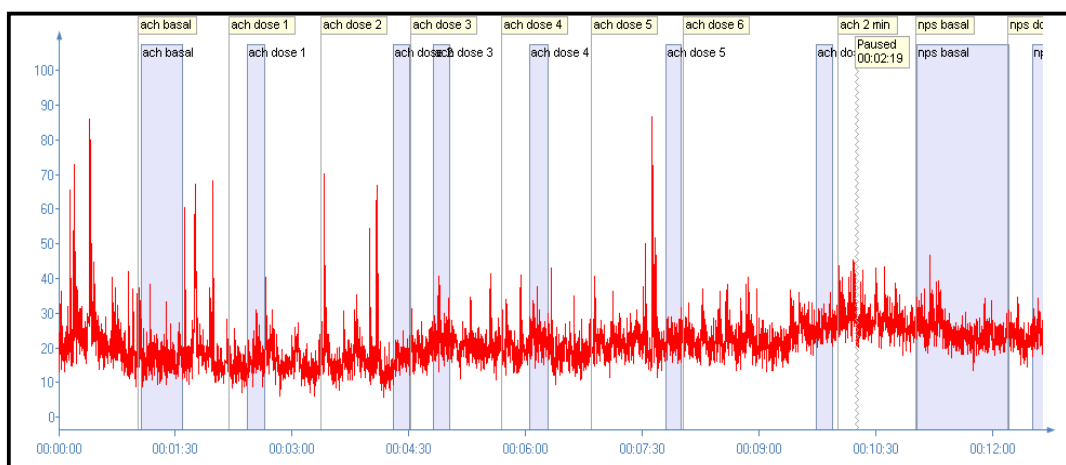


Figura 7. A fluxometria a laser e resposta deprimida da vasodilatação pelo estímulo da iontoforese de acetilcolina (Ach). Imagens do laboratório do Instituto Nacional de Cardiologia (INC).

6.7. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm DP ou mediana (percentis 25 - 75) para valores que não seguiram distribuição normal (teste de normalidade Shapiro-Wilk).

Para a comparação das características clínicas entre os grupos, foram utilizados os testes, qui quadrado e exato de Fisher para as variáveis dicotômicas e o da soma dos postos de Wilcoxon para as contínuas. Empregaram-se também os testes t bicaudal de Student ou teste de Mann Whitney, respectivamente para a análise das variáveis relacionadas com a microcirculação.

Para a análise da concordância entre as medidas, foram utilizados o coeficiente de correlação intraclass e o gráfico de Bland-Altman (Altman DG, 1991). Análise de regressão linear múltipla das medidas da EMI em vários segmentos na medida semiautomatizada e manuais interobservadores.

Para a avaliação do desempenho diagnóstico da EMI nos diversos segmentos utilizamos as medidas do examinador mais experiente. Foram analisadas as áreas sob as curvas ROC, além da sensibilidade, especificidade e razões de verossimilhança usando 1 mm como ponto de corte.

A significância estatística foi estipulada em 5%. Os dados foram tabulados com a planilha eletrônica Excel versão. A análise estatística foi realizada com os programas R versão e Stata versão 12. (Stata Corp., 2011).

7. Resultados:

7.1. Avaliação da função microvascular periférica

Na avaliação da função microvascular periférica, um estudo transversal, foram incluídos 30 pacientes com diagnóstico DAC precoce e 30 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade. A Tabela 2 descreve as características dos indivíduos saudáveis e com doença arterial de início precoce. Os pacientes com DAC

apresentaram fatores de risco (hipertensão, diabetes e dislipidemia, tabagismo) obesidade e maior circunferência da cintura, tiveram infarto agudo do miocárdio prévio e foram submetidos a uma revascularização (cirúrgica ou por angioplastia) eram tabagistas ou ex-tabagistas. Os controles não apresentaram diferenças significativas em relação à pressão arterial, mas, com níveis de LDL-c maior que os pacientes com DAC precoce que estavam em uso regular de estatinas e anti-hipertensivos, hipoglicemiantes orais ou insulina (INPH) para aqueles que eram também diabéticos. No grupo DAC 20% apresentaram presença de placa aterosclerótica. Também não houve diferença em relação à atividade física.

Os pacientes com DAC apresentaram níveis de triglicerídeos mais elevados e lipoproteína de alta densidade (HDL-c) mais baixa do que os controles, tendo significância estatística ($p=0.0003$). Porém, a lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) se apresentou mais elevada nos controles uma vez que os pacientes com DAC estavam em uso diário de estatinas. Ressalte-se que 30% dos pacientes com DAC eram diabéticos, e a maioria apresentava sobrepeso e aumento da circunferência abdominal quando comparados com os controles. Não foram observadas diferenças em relação aos níveis tensionais devido ao uso concomitante de medicamentos anti-hipertensivos nos portadores de DAC precoce.

As frequências observadas do uso de medicações no grupo de DAC precoce foram de 90% para os que estavam em uso de anti-hipertensivos, 33% em uso de hipoglicemiantes (oral ou Insulina NPH), 87% em uso de estatinas e 50% em uso de nitratos.

A CVC máxima durante iontoforese da Ach foram de $0,61 \pm 0,04$ e $0,48 \pm 0,03$ UAP / mmHg nos controles e pacientes com DAC, respectivamente ($p = 0,012$, Figura 8). A área sob a curva da vasodilatação induzida pela ACh foi de 7258 ± 730 e 3723 ± 789 AP /s, de controles versus DAC, respectivamente ($p = 0,003$, Figura 7). O aumento de CVC, resultante da vasodilatação induzida pela HRPO, foi de $0,48 \pm 0,03$ e $0,39 \pm 0,02$ UAP / mmHg controles vs DAC, respectivamente ($p = 0,024$, Tabela 3).

Tabela 2. Características dos indivíduos saudáveis e com doença arterial coronariana de início precoce na avaliação da função microvascular cutânea

Variáveis	Grupo Controle (n=30)	Grupo DAC (n=30)	P
Idade (anos)	42.1 ± 0.6	42.6 ± 0.5	0.417
Gênero-Homens n (%)	15 (50)	18 (60)	0.436
Cor da pele-Brancos n (%)	25(81)	21(70)	0,229
Escolaridade-Até 12 anos estudados n (%)	11(36)	15(50)	0,125
Renda - 1-2 salários mínimos n (%)	13(42)	19(63)	0,203
Hipertensão arterial sistêmica n (%)	01(3,2)	27(90)	<0.001
Diabetes Mellitus n (%)	0 (0)	9 (33)	<0,001
Peso (kg)	73.8 ± 2.9	89.0 ± 4.3	0.003
Altura (cm)	168.1 ± 2.1	164.2 ± 1.9	0.181
História Familiar DAC n (%)	01(3,2)	24(80)	<0.001
História Familiar DAC precoce n(%)	0(0)	19(63)	<0.001
IMC (kg/m ²) n (%)	26.1 ± 0.7	32.7 ± 1.1	<0.001
Circunferência abdominal (cm)	89.4 ± 2.1	105.5 ± 3.2	<0.001
Dislipidemia n(%)	3(9,7)	26(87)	<0.001
Tabagismo n (%)	6(20)	9(30)	0.552
Ex tabagismo	4(13)	11(37)	0,037
Sedentarismo n (%)	18(58)	16(53)	0,610
IAM prévio n (%)	0(0)	26(87)	<0.001
Drogas ilícitas	2(6,5)	6(20)	0,133
Angioplastia n (%)	0(0)	20(67)	<0.001
CRVM n (%)	0(0)	8(27)	<0.001
PAS (mmHg)	130.0 ± 3.4	131.7 ± 5.0	0.784
PAD (mmHg)	85.1 ± 2.2	84.6 ± 3.4	0.903
PAM (mmHg)	99.5 ± 2.6	101.0 ± 3.7	0.801
Creatinina (mg/dl)	0.81 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.331
Uréia (mg/dl)	28.3 ± 2.4	31.1 ± 1.7	0.346
Colesterol total (mg/dl)	201.0 ± 7.1	202.3 ± 11	0.526
Triglicerídeos(mg/dl)	76.5 (62-117)	157 (110-265)	<0.001
HDL-C (mg/dl)	48.2 ± 2.5	36.8 ± 1.3	0.003
LDL-C (mg/dl)	142.5 (102-152)	114 (90-140)	0.155
Glicose (mg/dl)	92.5 (88-97)	105 (96-128)	0.004
Uso de estainas n(%)	0(0)	26(87)	<0.001
Uso de nitratos n(%)	0(0)	15(50)	<0.001
Uso de hipoglicemiantes orais ou INPH n (%)	0(0)	9(33)	<0.001
Presença de placa carotídea	(0)	6(20)	<0.001

Média ± dp, e mediana (p25-p75), IMC = índice de massa corpórea, PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, PAM = pressão arterial média, HDL= lipoproteína de alta densidade, LDL = lipoproteína de baixa densidade, CRVM = cirurgia de revascularização miocárdica, IAM = infarto agudo do miocárdio, DAC = doença arterial coronária.

Os pacientes com DAC apresentaram níveis de triglicerídeos mais elevados e lipoproteína da alta densidade (HDL-c) mais baixa do que os controles, tendo significância estatística ($p=0.0003$). Porém, a lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) se apresentou mais elevada nos controles uma vez que os pacientes com DAC estavam em uso diário de estatinas. Ressalte-se que 30% dos pacientes com DAC eram diabéticos, e a maioria apresentava sobrepeso e aumento da circunferência abdominal quando comparados com os controles. Não foram observadas diferenças em relação aos níveis tensionais devido ao uso concomitante de medicamentos anti-hipertensivos nos portadores de DAC precoce.

As frequências observadas do uso de medicações no grupo de DAC precoce foram de 90% para os que estavam em uso de anti-hipertensivos, 33% em uso de hipoglicemiantes (oral ou Insulina NPH), 87% em uso de estatinas e 50% em uso de nitratos.

A CVC máxima durante iontoforese da Ach foram de $0,61 \pm 0,04$ e $0,48 \pm 0,03$ UAP / mmHg nos controles e pacientes com DAC, respectivamente ($p = 0,012$, Figura 8). A área sob a curva da vasodilatação induzida pela ACh foi de 7258 ± 730 e 3723 ± 789 AP /s, de controles versus DAC, respectivamente ($p = 0,003$, Figura 7). O aumento de CVC, resultante da vasodilatação induzida pela HRPO, foi de $0,48 \pm 0,03$ e $0,39 \pm 0,02$ UAP / mmHg controles vs DAC, respectivamente ($p = 0,024$, Tabela 3).

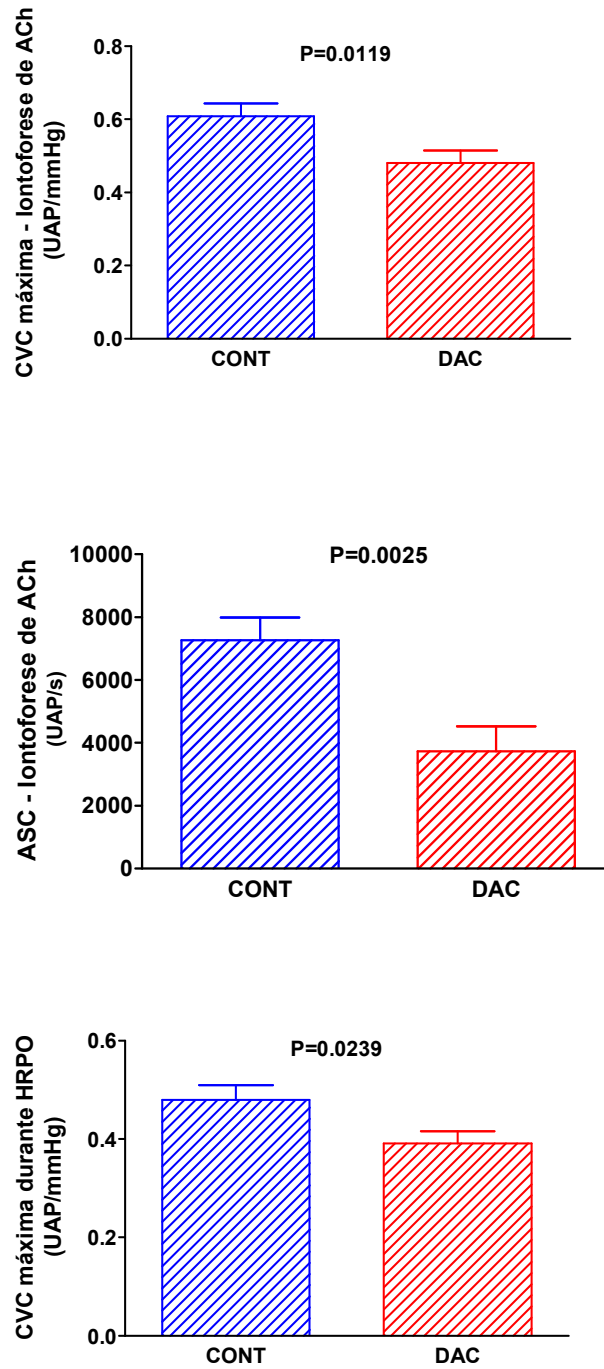


Figura.8 Condutância vascular cutânea (CVC) máxima pelo estímulo da iontoforese da acetilcolina (ACh) nos indivíduos controles (CONT) e com DAC de início precoce. ASC = área sob a curva e hiperemia reativa pós- oclusiva (HRPO).

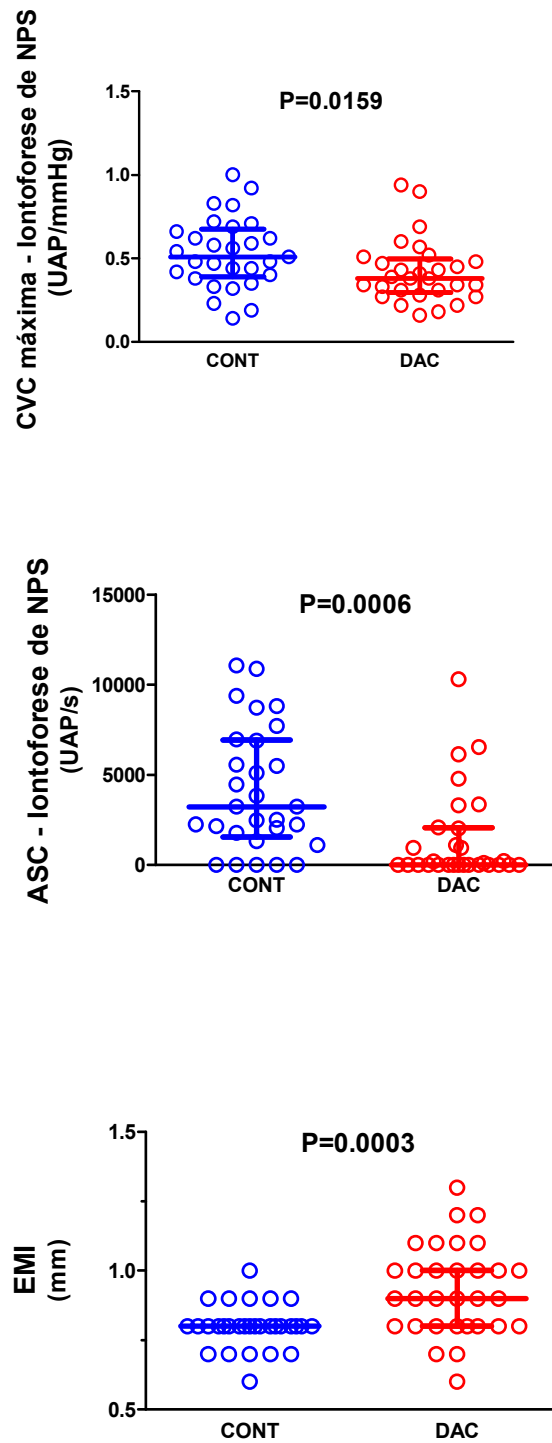


Figura 9. Condutância vascular cutânea (CVC) máxima pelo estímulo da iontofores com nitroprussiato de sódio (NPS). Área sob a curva (ASC) da CVC. Espessura médio-intimal carotídea (EMI) em indivíduos controles(CONT) e com DAC de início precoce.

Tabela. 3. Área sob a curva da condutância vascular cutânea (CVC) pelos estímulos de acetilcolina, nitroprussiato de sódio e hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) em indivíduos controles e com DAC de início precoce.

ÁREA SOB A CURVA	GRUPO CONTROLE	GRUPO DAC	VALOR DE p
Ach (UAP/s)	7258±730	3723±789	0,003
NPS (UAP/s)	3225(1549-6933)	0(0-2058)	0,006
VASODILATAÇÃO MÁXIMA	GRUPO CONTROLE	GRUPO DAC	VALOR DE p
HRPO (UAP/mmHg)	0,48±0,03	0,39±0,02	0,024

Média ± Dp, mediana (p25-p75), Ach = acetilcolina; NPS= nitroprussiato de sódio; AUP= unidade de arbitrária de perfusão; DAC= doença arterial coronariana.

A CVC máxima durante a iontoforese de NPS foram de 0,51 (0,39-0,67) e 0,38 (0,29-0,49) UAP/mmHg em controles versus DAC, respectivamente ($p = 0,0159$, Figura 9). A área sob a curva de vasodilatação induzida por NPS foi de 3225 (1549-6933), 0(0-2058) UAP/s, de controles versus DAC, respectivamente ($p = 0,0006$, Figura 2). Observou-se aumento significativo na EMI em indivíduos com DAC; a EMI foi de 0,8 (0,8-0,8) e 0,9 (0,8-1,0) mm em controles versus com DAC, respectivamente, $p = 0,003$, Figura 8. O aumento da EMI foi associado com as alterações encontradas na resposta do estímulo com o NPS no grupo DAC podendo estar relacionado à disfunção endotelial na vasodilatação independente do endotélio. Na figura 10 o gráfico mostra a relação da vasodilatação máxima e a espessura médio-intimal carotídea.

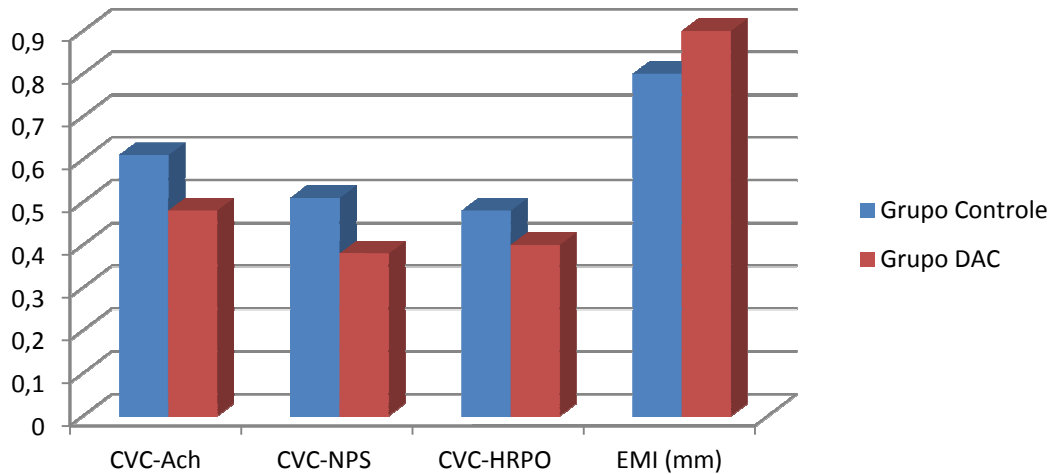


Figura 10. Demonstração gráfica da relação entre a vasodilatação máxima da iontoforese da Ach e NPS medida da EMI entre os grupos DAC e controle. Quanto maior a EMI pior foi a resposta vasodilatadora. Condutância vascular cutânea (CVC) = APU/mmHg em média \pm Dp; espessura médio-intimal (EMI) = mediana (p25-p75).

Tabela 4. Vasodilatação máxima pelo estímulo da iontoforese com a acetilcolina (Ach), nitroprussiato de sódio (NPS) e hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) na condutância vascular cutânea. EMI (espessura médio-intimal) e a presença de placa carotídea.

Variáveis	Grupo Controle	Grupo DAC	Valor de P
CVC-Ach (UAP/mmHg)	0,61 \pm 0,04	0,48 \pm 0,03	0,0119
CVC-NPS (UAP/mmHg)	0,51(0,39-0,67)	0,38(0,29-0,49)	0,0159
CVC-HRPO (UAP/mmHg)	0,48 \pm 0,03	0,39 \pm 0,02	0,0239
EMI (mm)	0,8(0,8-0,8)	0,9(0,8-1,0)	0,0003

Média \pm Dp, mediana (p23-p75), CVC= condutância vascular cutânea, NPS=nitroprussiato de sódio, Ach= acetilcolina, HRPO= hiperemia reativa pós-oclusiva, EMI=espessura médio intimal, DAC=doença arterial coronariana.

7.2. A avaliação da espessura médio-intimal carotídea

A Tabela 5 descreve as características clínicas dos pacientes portadores de DAC precoce e dos controles. Foram realizadas 2112 medidas em 89 indivíduos do estudo. Cinco indivíduos não foram avaliados por não terem os seus dados disponíveis para a análise das medidas da EMI (três do grupo DAC e dois do grupo controle). Os fatores de risco foram mais prevalentes nos portadores de DAC precoce, bem como a presença de eventos como o infarto agudo do miocárdio e os procedimentos de revascularização do miocárdio, percutâneo e cirúrgico. Os portadores de DAC precoce apresentaram idade discretamente superior ao do grupo controle. Observou-se que não houve diferença entre os grupos no que tange a atividade física e que a maioria dos portadores de DAC precoce abandonou o hábito de fumar. Não houve diferença entre o grupo controle e o grupo DAC em relação à pressão arterial, porém tiveram LDL-c maior no grupo controle, uma vez que o grupo DAC estava em uso regular de estatinas, nitratos, hipoglicemiantes orais ou INPH para aqueles que eram também diabéticos. Na avaliação da presença de placa foram encontrados 40% no grupo DAC e 6,7% no grupo controle.

As Tabelas 6 e 7 descrevem as medianas e os percentis 25 e 75 dos diversos segmentos avaliados na EMI pelo aparelho (medida semiautomatizada) e pelos observadores A e B nos portadores de DAC precoce e controle, respectivamente. Nas Figuras 9 e 10 pode-se observar a demonstração gráfica da distribuição das diversas medidas realizadas. Foi observada maior dispersão nas medidas realizadas no grupo DAC precoce do que no grupo controle.

Tabela 5. Características clínicas dos portadores de doença arterial coronariana precoce e os controles na avaliação da espessura médio-intimal

Variáveis	Controle (n=36)	DAC precoce (n=58)	p
Idade	40,6 ± 4,7	45,4 ± 3,4	<0,001
Gênero- Homens n(%)	19(52,8)	34(58,6)	0,579
Cor da pele – Brancos n(%)	30(83,3)	39(67,2)	0,057
Escolaridade – Até 12 anos estudados n(%)	22(61,1)	30(51,7)	0,062
Renda –1 –2 salários mínimos n(%)	12(33,3)	38(65,5)	0,002
Hipertensão Arterial Sistêmica n(%)	1(3)	55(95)	<0,001
Diabetes Mellitus n(%)	0(0)	18(31)	<0,001
Peso (kg)	73 ± 2,9	85 ± 2,7	0,002
Altura (cm)	168 ± 11	164 ± 1,3	0,162
História Familiar DAC n(%)	1(3)	44(76)	<0,001
História Familiar DAC precoce n(%)	0(0)	31	<0,001
IMC (kg/m ²) n (%)	26 ± 3,6	32 ± 6,2	0,003
Circunferência abdominal (cm)	89 ± 11	106 ± 17	0,133
Dislipidemia n(%)	3(8,3)	52(90)	<0,001
Tabagismo n(%)	6(17)	11(19)	0,778
Ex Tabagismo n(%)	5(14)	31(53)	1
Sedentarismo n(%)	23(64)	33(57)	0,502
IAM prévio n(%)	0(0)	48(83)	<0,001
Drogas ilícitas n(%)	2(6)	8(14)	0,308
Angioplastia n(%)	0(0)	38(66)	<0,001
CRVM n(%)	0(0)	22(38)	<0,001
PAS(mmHg)	129 ± 2,4	134 ± 3,3	0,469
PAD (mmHg)	82 ± 1,5	87 ± 2,1	0,083
PAM (mmHg)	97 ± 1,7	103 ± 2,8	0,124
Creatinina (mg/dl)	0,8 ± 0,14	0,23 ± 0,43	0,511
Uréia (mg/dl)	28 ± 11,5	27,4 ± 24,3	0,004
Colesterol total (mg/dl)	200 ± 33	200 ± 59	0,053
Triglicerídeos (mg/dl)	77(63-113)	178(110-249)	<0,001
HDL-C (mg/dl)	44(36-55)	35(30-43)	0,001
LDL-C (mg/dl)	140(104-151)	112(81-138)	<0,001
Glicose (mg/dl)	94(88-99)	102(96-122)	0,001
Uso de estainas n(%)	0(0)	52(89,7)	<0,001
Uso de nitratos n(%)	0(0)	29(50)	<0,001
Uso de hipoglicemiantes orais ou INPH n (%)	0(0)	18(31)	<0,001
Presença de placa carotídea n(%)	(0)	24(40)	<0,001

IAM (infarto agudo do miocárdio), CRVM (cirurgia de revascularização miocárdica), média ± Dp, mediana (p25-p75), PAS = pressão arterial sistólica, PAD = pressão arterial diastólica, PAM = pressão arterial média, CRVM = cirurgia de revascularização miocárdica, IAM = infarto agudo do miocárdio, DAC=doença arterial coronariana, HDL = lipoproteína de alta densidade, LDL = lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 6. Mediana e percentis 25 e 75 dos diversos segmentos avaliados na EMI pelo aparelho (medida semiautomatizadas) e pelos observadores A e B nos portadores de doença arterial coronariana precoce.

Variáveis	Aparelho	A	B
CC Anterior Direito	0,84(0,75-1,0)	1,0(0,9-1,1)	1,0(0,9-1,1)
CC Lateral Direito	0,9(0,8-0,98)	1,0(0,9-1,1)	1,0(0,9-1,1)
CC Posterior Direito	0,89(0,76-1,05)	1,1(0,9-1,2)	1,0(1,0-1,1)
Bulbo Direito	–	1,2(1,1-1,3)	1,2(1,1-1,3)
Ramo interno Direito	–	1,0(0,8-1,1)	1,0(0,9-1,1)
CC Anterior Esquerdo	0,94(0,8-1,04)	1,0(0,9-1,1)	1,0(0,9-1,1)
CC Lateral Esquerdo	0,9(0,76-1,09)	1,1(0,9-1,2)	1,1(0,9-1,2)
CC Posterior Esquerdo	0,9(0,76-1,1)	1,1(1,0-1,2)	1,1(0,95-1,15)
Bulbo Esquerdo	–	1,3(1,1-1,30)	1,2(1,1-1,3)
Ramo interno Esquerdo	–	1,0(0,85-1,1)	1,0(0,9-1,1)

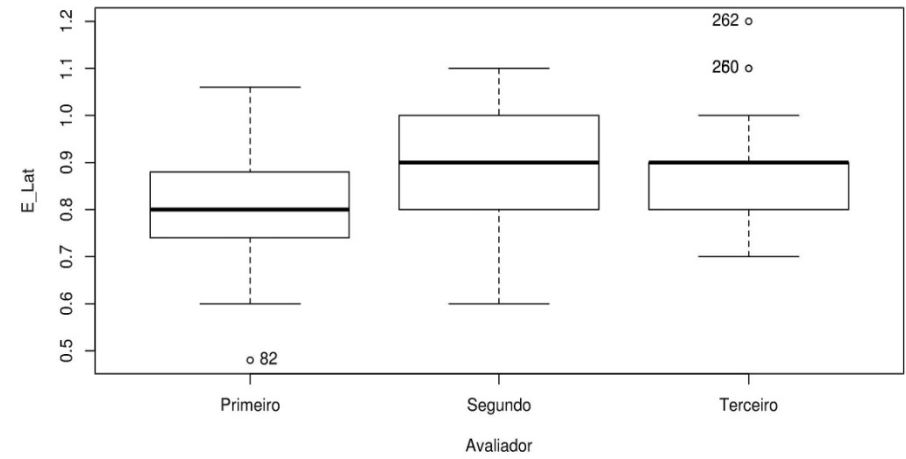
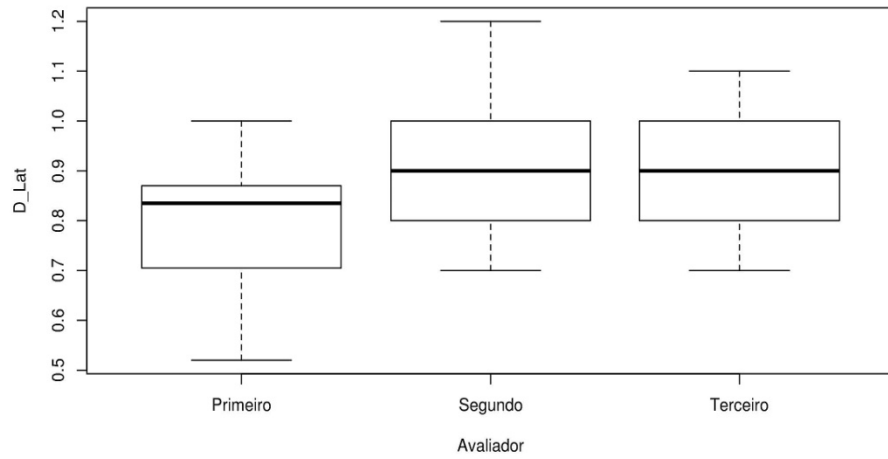
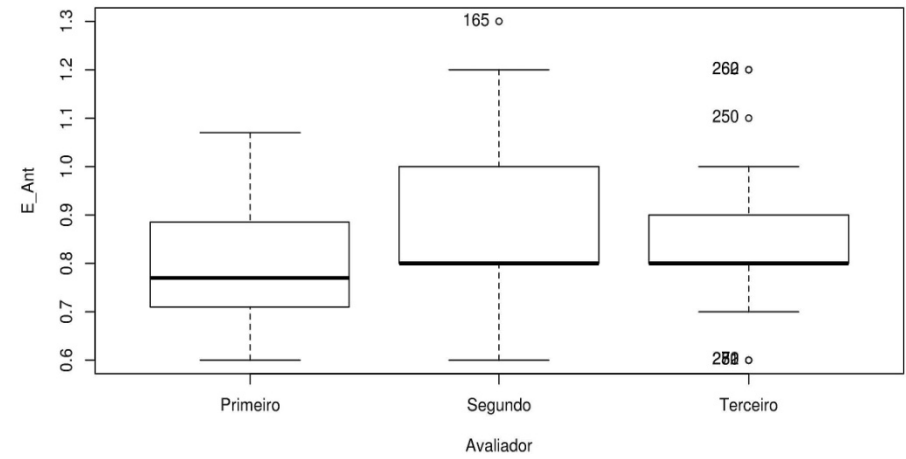
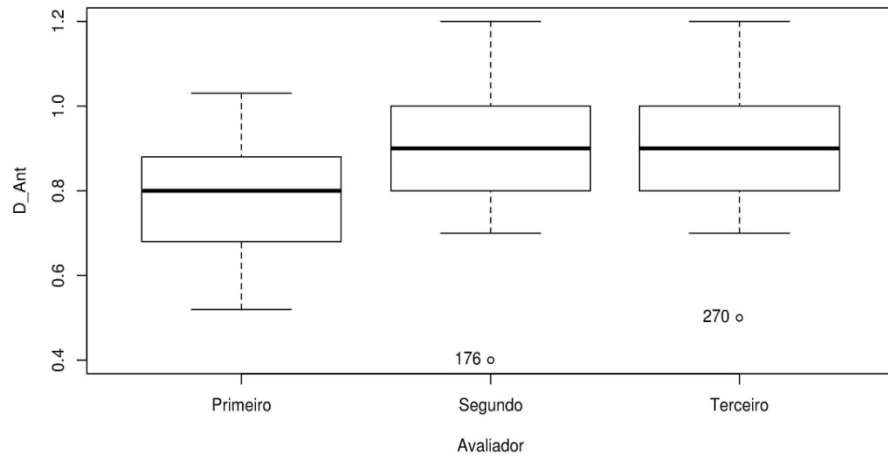
CC = carotida comum, mediana (p25-p75).

Tabela 7. Mediana e percentis 25 e 75 dos diversos segmentos avaliados na EMI pelo aparelho (medida semiautomatizadas) e pelos observadores A e B nos controles.

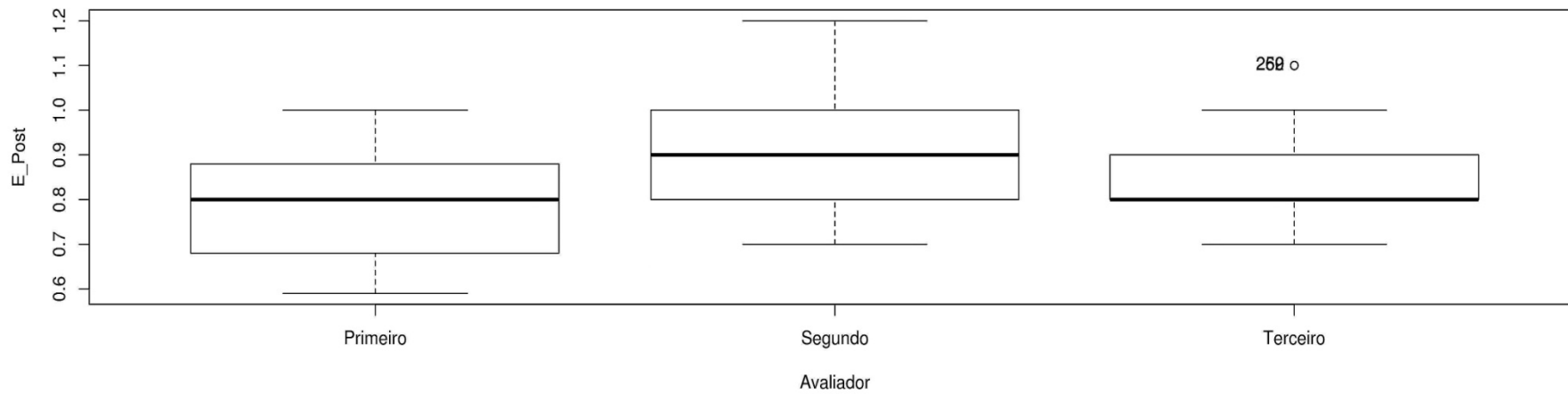
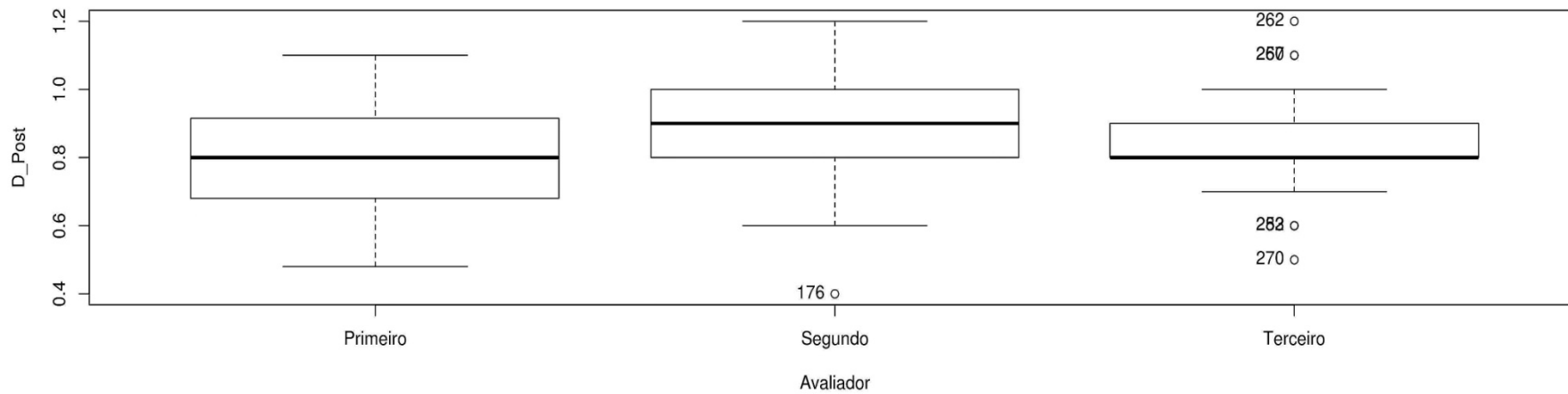
Variáveis	Aparelho	A	B
CC Anterior Direito	0,8(0,68-0,88)	0,8(0,8-1,0)	0,9(0,8-1,0)
CC Lateral Direito	0,8(0,7-0,86)	0,9(0,8-1,0)	0,9(0,8-1,0)
CC Posterior Direito	0,8(0,68-0,9)	0,9(0,8-1,0)	0,8(0,8-0,9)
Bulbo Direito	–	1,1(1,0-1,2)	1,1(1,0-1,2)
Ramo interno Direito	–	0,8(0,7-0,9)	0,8(0,8-0,9)
CC Anterior Esquerdo	0,77(0,7-0,88)	0,8(0,8-1,0)	0,8(0,8-0,9)
CC Lateral Esquerdo	0,75(0,76-1,09)	0,9(0,8-1,0)	0,9(0,8-0,9)
CC Posterior Esquerdo	0,8(0,68-0,88)	0,9(0,8-1,0)	0,8(0,8-0,9)
Bulbo Esquerdo	–	1,1(1,0-1,2)	1,1(1,0-1,2)
Ramo interno Esquerdo	–	0,8(0,7-0,9)	0,8(0,8-0,9)

CC = carotida comum, mediana (p25-p75).

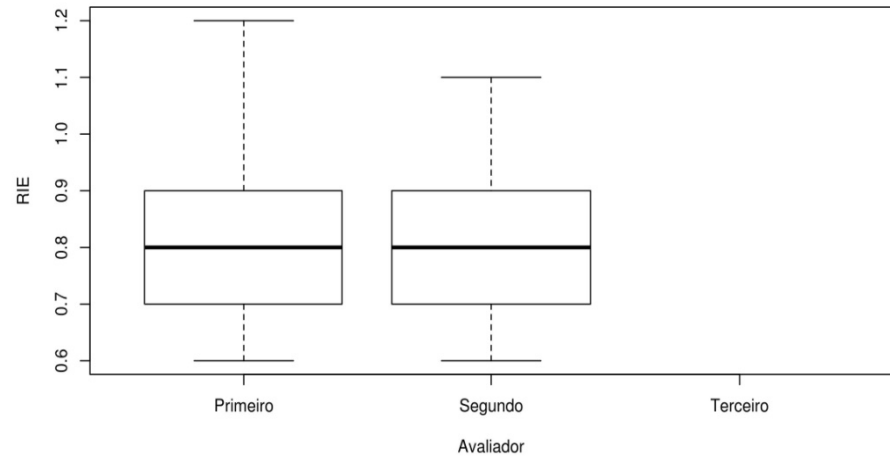
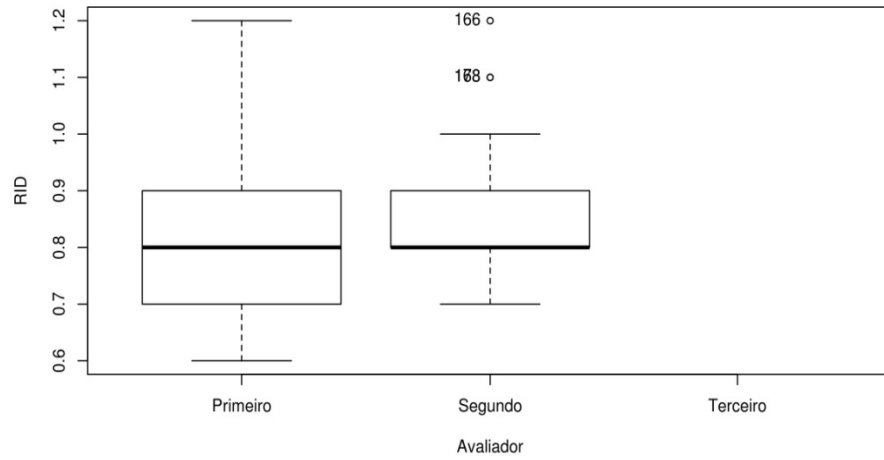
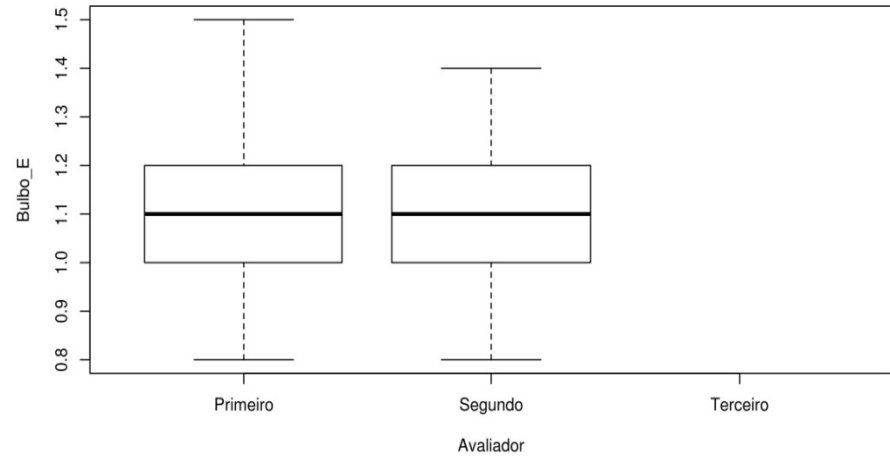
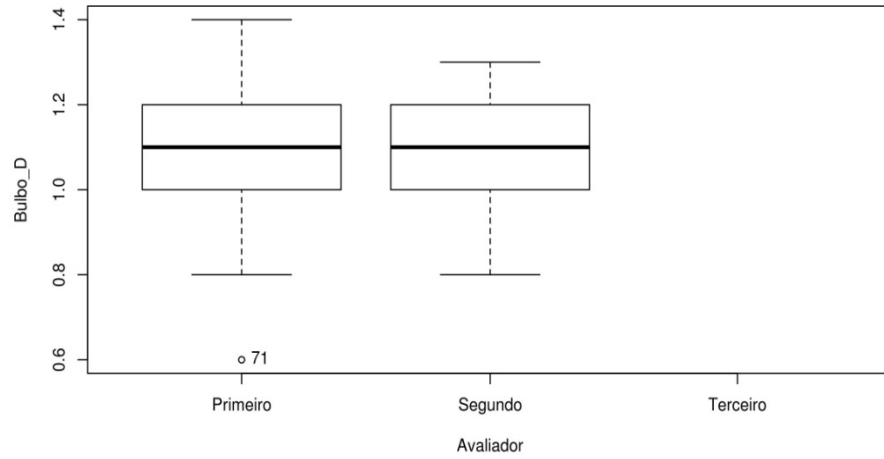
Comparações entre as medidas semiautomatizadas (aparelho = primeiro) e as realizadas pelos observadores A (segundo) e B (terceiro) nos diversos segmentos (carótida comum direita e esquerda anterior, lateral e posterior; bulbo direito e esquerdo, ramo interno direito e esquerdo) realizadas no grupo **Controle** como nas Figuras 10 A, 10 B e 10 C respectivamente e no grupo **DAC** Figuras 11 A, 11 B e 11 C respectivamente.



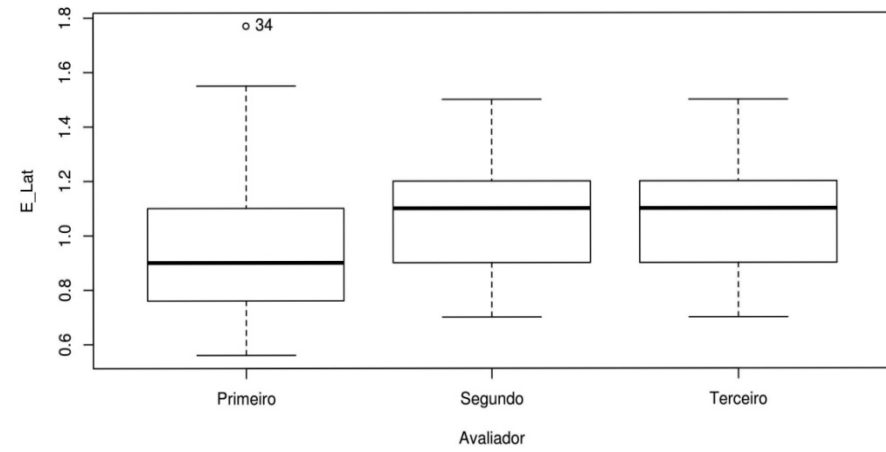
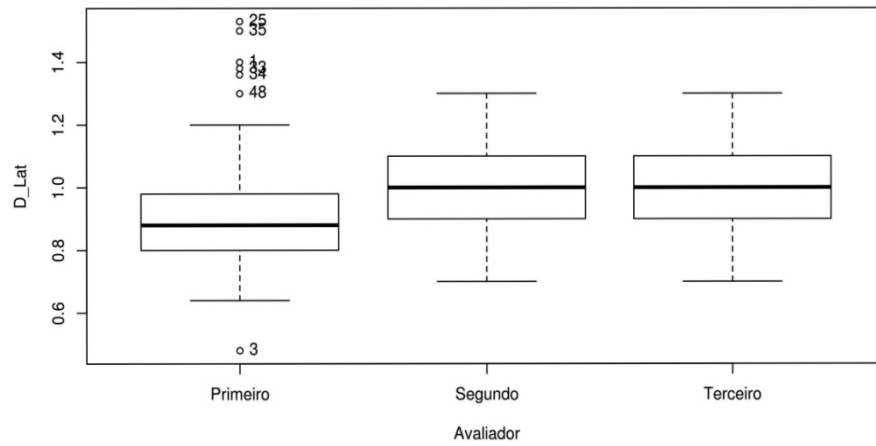
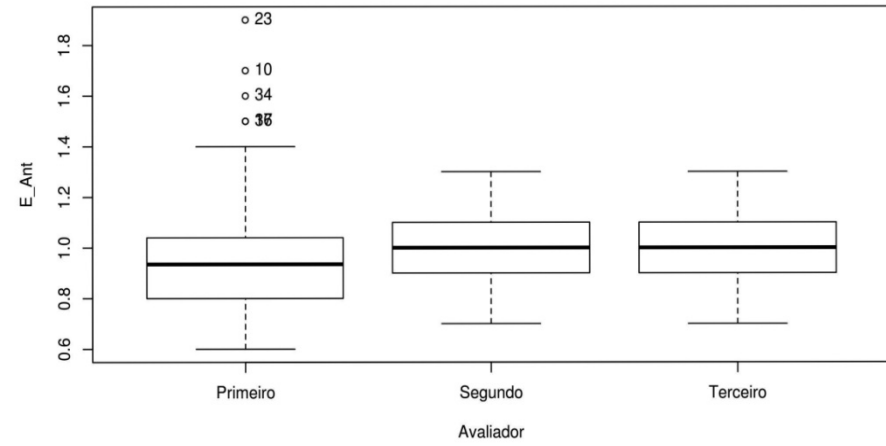
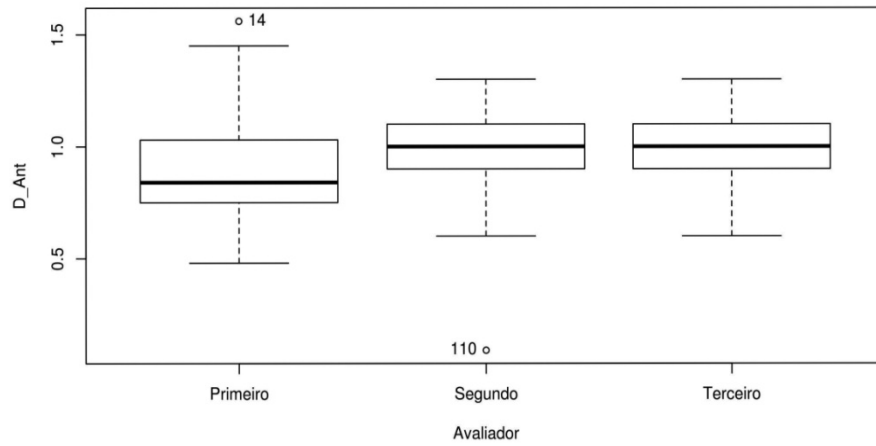
Controle
Figura 10 A



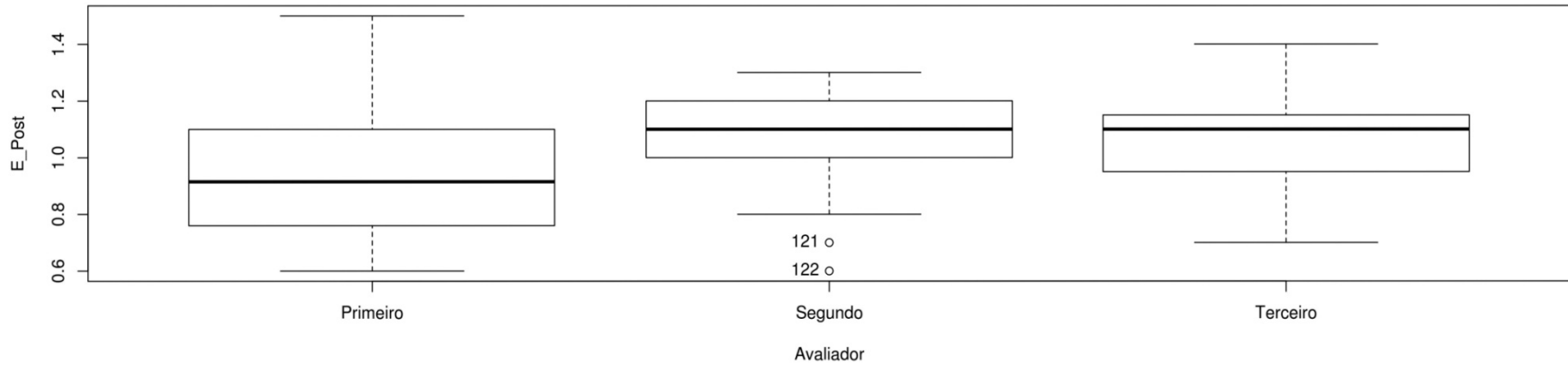
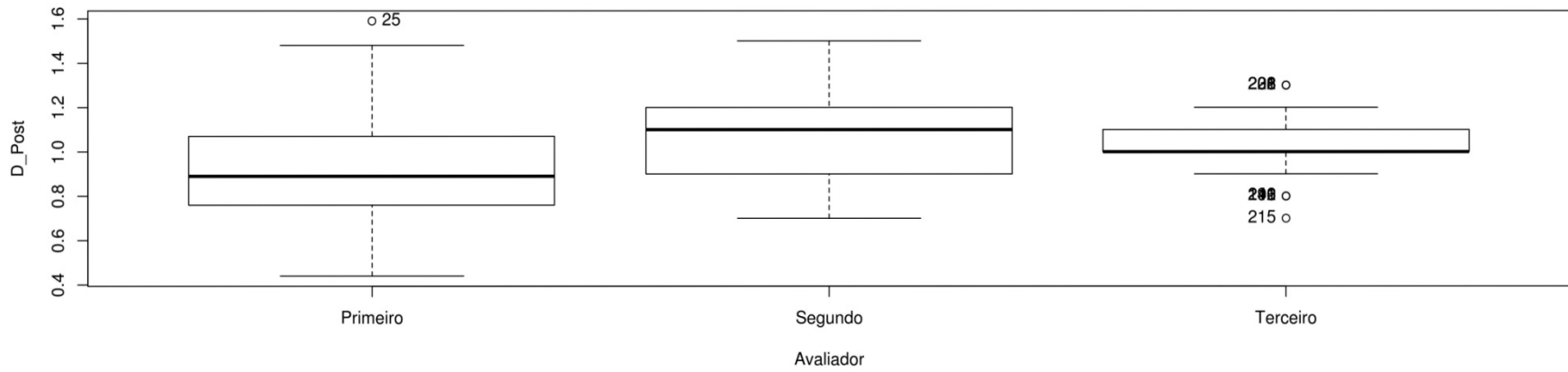
Controle
Figura 10 B



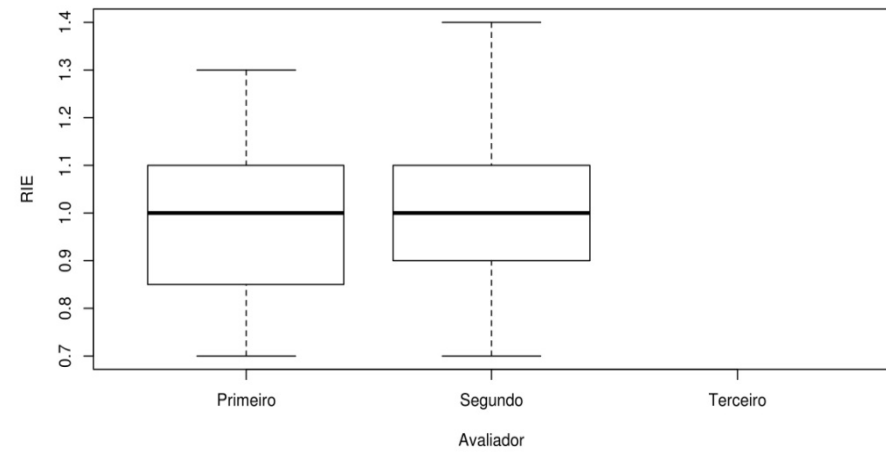
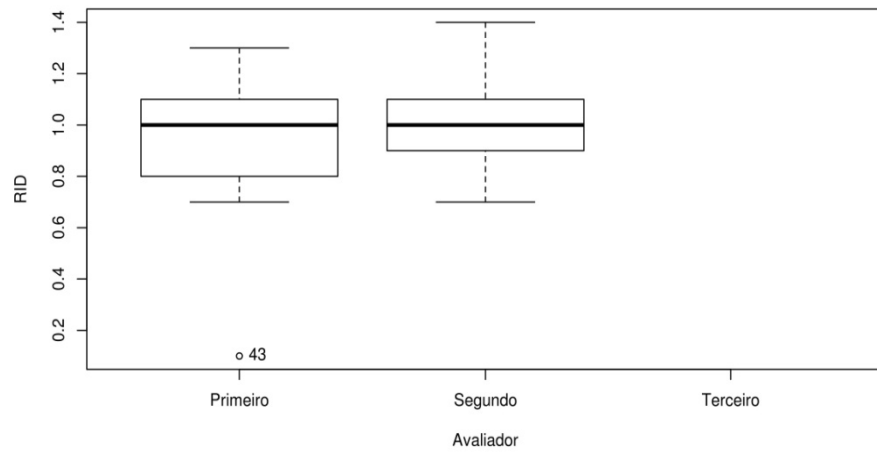
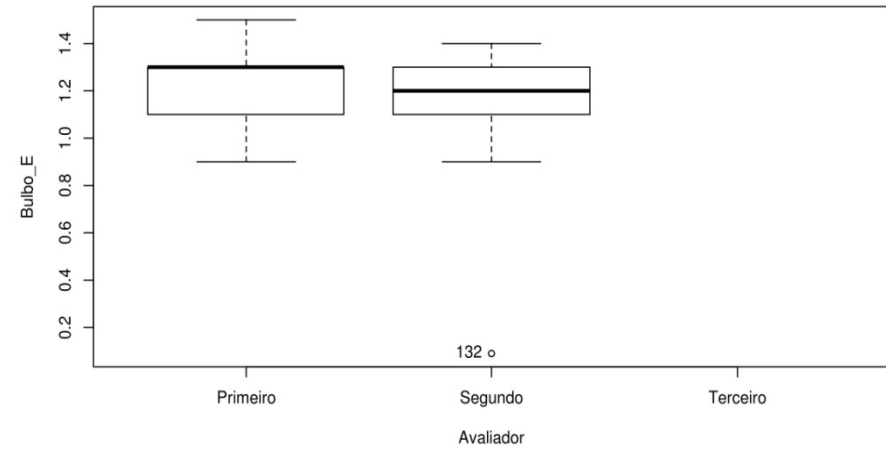
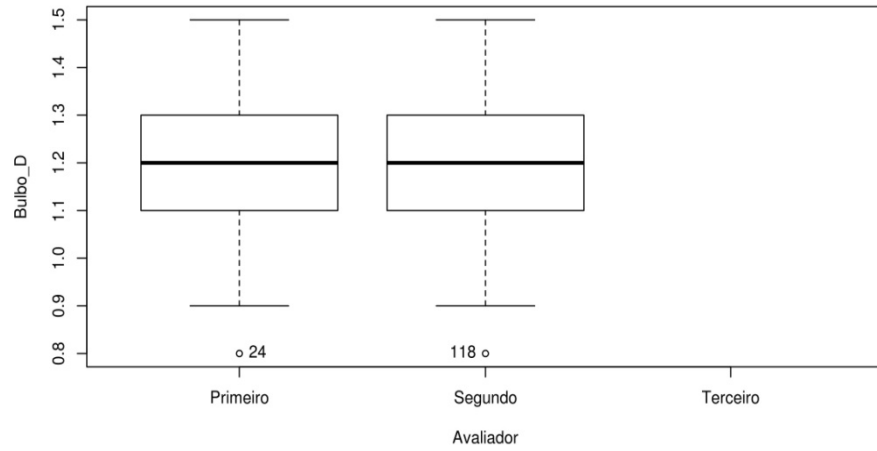
**Controle
Figura 10 C**



DAC
Figura 11 A



DAC
Figura 11 B



DAC
Figura 11 C

Na análise de regressão linear múltipla, pelos valores dos coeficientes, percebe-se que na presença de DAC aumenta a EMI, em média, em 0,15 mm. As medidas do bulbo são 0,12 mm maiores do que as da carótida comum; as do ramo interno são 0,11 mm menores do que as da carótida comum. As medidas manuais foram maiores dos que as semiautomatizadas (observador A em 0,072 mm e observador B em 0,063 mm). As duas examinadoras não apresentaram diferença apreciável entre si e, não houve diferença apreciável entre as medidas do lado direito e esquerdo. Foram dados como referência para análise os controles, a carótida comum e o lado esquerdo (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de regressão linear múltipla das medidas semiautomatizadas e interobservadores da EMI carotídea nos vários segmentos.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	IC 95%	p
Controle*	-	-	-	-
DAC	0,15 mm	0,010	0,132 a 0,169	<0,001
Carótida comum*	-	-	-	-
Bulbo	0,122 mm	0,0123	0,010 a 0,147	<0,001
Ramo interno	-0,111 mm	0,0123	-0,135 a -0,087	<0,001
Semiautomatizadas*	-	-	-	-
Examinador A	0,072 mm	0,016	0,041 a 0,103	<0,001
Examinador B	0,063 mm	0,016	0,032 a 0,093	<0,001
Lado esquerdo*	-	-	-	-
Lado direito	-0,013 mm	0,009	-0,031 a 0,005	0.164
Constante	0,883	0,014	0, 856 a 0,911	<0,001

*valores de referência, IC= intervalo de confiança.

Houve boa concordância interobservador A x B (entre 0,73 e 0,91) e concordância razoável (entre 0,62 e 0,64) nas medidas semiautomatizadas e nas

realizadas pelo observador A, avaliadas pelo coeficiente de correlação intraclassa (Tabela 9).

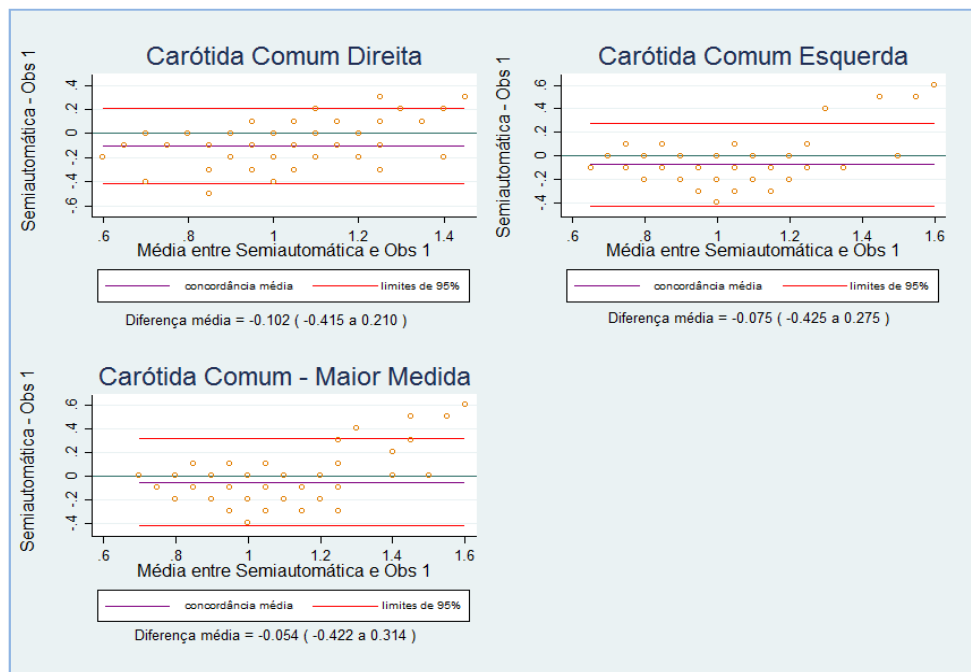
Tabela 9- Concordância da medida semiatomizada (aparelho) X observador A e interobservador (observador A x B) avaliada pelo coeficiente de correlação intraclassa.

Variável	SA x A			AxB		
	CCI	IC 95%	p	CCI	IC 95%	p
CC Direito	0,64	0,49-0,74	<0,001	0,89	0,84-0,92	<0,001
Bulbo Direito	*	*	*	0,85	0,78-0,90	<0,001
Ramo interno Direito	*	*	*	0,73	0,61-0,81	<0,001
CC Esquerdo	0,62	0,48-0,74	<0,001	0,90	0,86-0,93	<0,001
Bulbo Esquerdo	*	*	*	0,79	0,70-0,92	<0,001
Ramo interno Esquerdo	*	*	*	0,91	0,87-0,94	<0,001

A = Observador A, B= Observador B, SA = semiautomática, CC = carótida comum, IC = intervalo de confiança, CCI = coeficiente de correlação intraclassa.

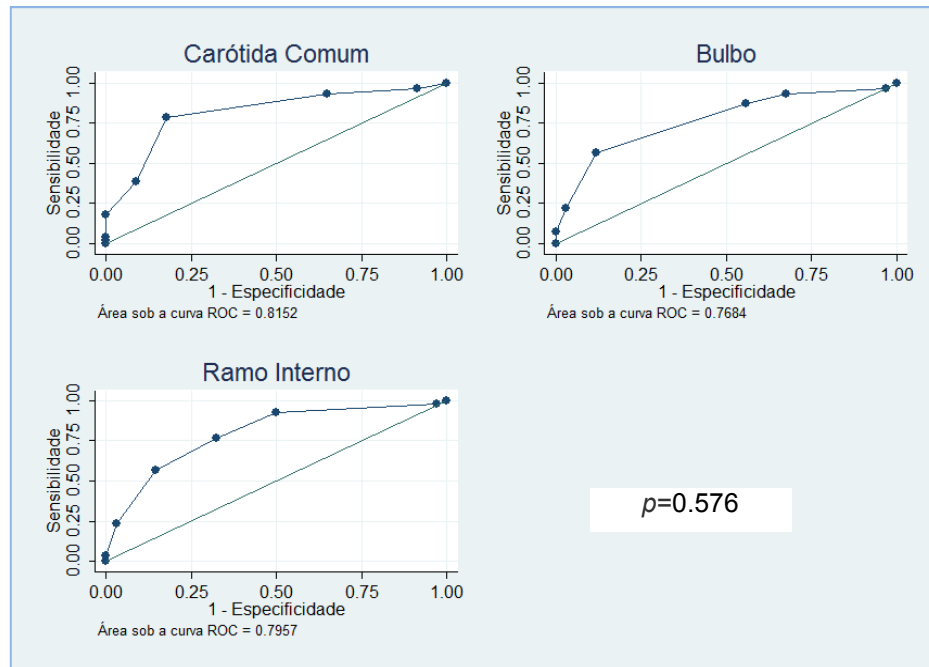
Pelos gráficos de Bland-Altman percebe-se uma diferença sistemática entre as medidas semiautomáticas e do observador A (semiautomática maior) a partir de aproximadamente 1,25 mm, sendo concordantes até esse valor (Figura 12).

Figura 13- Gráficos de Bland e Altman para avaliação da concordância interobservador da EMI na Carótida Comum Direita, Esquerda e na maior medida entre as duas.



Não houve diferença entre o desempenho da carótida comum, bulbo e ramo interno quando avaliados pela curva ROC (Figura 13).

Figura 14- Curvas ROC das medidas da EMI para os segmentos da carótida comum, bulbo e ramo interno.



O desempenho das medidas (Figura 13) dos vários segmentos da carótida (carótida comum, bulbo e ramo interno) não foi diferente quando analisada a área sob a curva ROC que foi aproximadamente de 0,8. Porém, foi melhor o desempenho da carótida comum e ramo interno para identificar os pacientes com DAC precoce com uma razão de verossimilhança positiva de 4,4 e 3,8, respectivamente (Tabela 10).

Tabela. 10. Avaliação da acurácia da medida da EMI pela ultrasonografia da artéria carótida.

Variável	Sensibilidade (%) IC 95%	Especificidade (%) IC 95%	AUC (Curva ROC) IC 95%	RVP	RVN
Carótida comum	78(0,66-0,87)	82(0,67-0,92)	0,82 (0,74-0,91)	4,4	0,3
Bulbo	93(0,83-0,97)	19(0,19-0,49)	0,77 (0,67-0,86)	1,4	0,2
Ramo Interno	56(0,43-0,69)	85(0,70-0,94)	0,80 (0,70-0,89)	3,8	0,5

ASC = área sob a curva ROC; RVP = razão de verossimilhança positiva; RVN = razão de verossimilhança negativa.

8. Discussão

No Brasil, até o presente estudo, ainda não havia sido documentado o uso da reatividade microvascular cutânea como ferramenta para a avaliação da presença de doença aterosclerótica em jovens, bem como sua associação com o espessamento miointimal carotídea.

8.1. Função microvascular cutânea

A piora da vasodilatação dependente do endotélio, observada na disfunção endotelial, é causada por diferentes distúrbios, podendo ser observada na circulação cutânea, sugerindo que possa refletir a disfunção vascular sistêmica em magnitude e mecanismos subjacentes (Mahé et al., 2012).

Existem várias técnicas não invasivas para a avaliação da função e estrutura vascular e o grau de rigidez do vaso, que apresentam uma associação com a doença cardiovascular, incluindo a vasodilatação mediada pelo fluxo da artéria braquial, velocidade da onda de pulso e a espessura médio-intimal carotídea (Holowatz et al., 2008).

O recente desenvolvimento da técnica de laser *speckle* de contraste que avalia a função microvascular cutânea, permitiu, em tempo real, a observação das mudanças do fluxo sanguíneo cutâneo mediante de estímulos fisiológicos ou farmacológicos (Mahé et al 2012), sendo mais uma técnica não invasiva de avaliação da função vascular.

Normalmente o óxido nítrico é liberado das células endoteliais em resposta a diferentes receptores, especialmente as forças de cisalhamento causadas pelo fluxo sanguíneo. Estes estímulos, liberam óxido nítrico que têm uma meia-vida muito curta e facilmente atravessam as barreiras biológicas, e então se difundem do endotélio para a camada de músculo liso, ativando a guanilato ciclase, aumentando a concentração do GMPc e induzindo a vasodilatação (Flammer & Lüscher, 2010).

O grupo de pacientes com DAC apresentou maior índice de massa corpórea (IMC) e circunferência da cintura, níveis mais elevados de triglicérides e níveis mais baixos de HDL-c do que os controles, e cerca de 30% tinham diabetes tipo 2. Essas características clínicas apontam para a presença de síndrome metabólica, que é conhecida por alterar a função endotelial microvascular (Serne et al., 2006).

Estudos anteriores já haviam demonstrado alterações estruturais (artéria carótida) e funcionais (artéria braquial) da função macrovascular sistêmica em indivíduos jovens com história de infarto do miocárdio (Coppola et al., 2009). No presente trabalho, demonstrou-se que, de maneira similar, a função endotelial microvascular sistêmica também se encontra bastante alterada em indivíduos com doença arterial coronária de início precoce.

Além disso, foi observada uma resposta da vasodilatação deprimida com o estímulo do NPS (vasodilatação independente do endotélio) no grupo DAC em relação aos controles. Esta alteração da vasodilatação independente do endotélio sugere que os pacientes podem ter uma diminuição da sensibilidade da camada de músculo liso vascular ao óxido nítrico ou, de maneira alternativa e mais provável, alterações estruturais da parede arterial microvascular (Deanfield et al., 2007; Reriani et al., 2011).

Além das alterações da função microvascular no grupo de pacientes com DAC, foi observada uma diferença significativa da espessura médio-intimal carotídea, entre os grupos. A medida da EMI estabelecida pela Sociedade Americana de Ecocardiografia de 2008 na parede posterior da carótida comum foi validada como marcador de doença subclínica e de aumento de risco cardiovascular (Polak et al., 2010). A EMI está associada ao início do processo aterosclerótico e capaz de prever eventos cardiovasculares futuros (Darabian et al., 2013).

O processo aterosclerótico é também inflamatório, podendo alterar a homeostase vascular com liberação componentes que estimulam a proliferação e espessamento do músculo liso vascular, causando um ciclo que perpetua o dano endotelial (Szmítka et al.; 2003 Parte-II) e, poderiam explicar as alterações da resposta vasodilatadora encontradas neste grupo.

Estes dados encontrados no desenvolvimento da doença aterosclerótica, foram reforçados pelos estudos de necrópsias os quais, demonstraram que a doença se inicia na infância e progride na vida adulta associada à exposição aos fatores de risco, que nos indivíduos jovens está associada com uma ocorrência de 80% de infarto agudo do miocárdio (Rubin et al., 2012).

Um estudo realizado em 19 pacientes com hipercolesterolemia que estavam em uso de estatinas, quando aplicado o teste de HRPO, provou que a vasodilatação na microcirculação pode ser melhorada pela terapia com estatinas (Bingelli et al. 2003).

8.2. Espessura médio-intimal carotídea

A utilização da ultrassonografia das carótidas é um método não invasivo e relativamente simples, validado desde a década de 1980 (Oren et al., 2003). É crescente o interesse, particularmente na avaliação da espessura médio-intimal (EMI) como preditor de risco cardiovascular (Polak et al. 2009; Robertson et al., 2012).

O último consenso da Sociedade Americana de Ecocardiografia em 2008, elaborou um padrão de avaliação da EMI, com o intuito de identificar os pacientes assintomáticos de maior risco (Stein et al 2008). Estabeleceu a avaliação do espessamento da parede posterior da carótida comum em 3 angulações de insonação (anterior, lateral e posterior), em um total de 18 medidas (Stein et al 2008; Darabian et al., 2013). Observou que a presença de placa ou EMI maior ou igual ao percentil 75 para gênero, idade e etnia era indicativa de aumento de risco para doença cardiovascular (Stein et al 2008).

Estudos recentes têm avaliado a medida da EMI nos diversos segmentos (carótida comum, bifurcação e ramo interno) com o intuito de aumentar a acurácia da predição do risco cardiovascular em associação aos escores existentes. Os escores de risco foram limitados em prever infarto agudo do miocárdio (IAM) quando avaliaram pacientes que apresentavam risco intermediário ou baixo (Darabian et al. 2013, Stein et al., 2012; Inaba et al., 2012).

Foi demonstrado em metanálise que a sensibilidade, a especificidade e a razão de chances diagnóstica da EMI para o diagnóstico de DAC foi de 68%, 61,5% e 3,2 quando medida na carótida comum e de 79%, 74,4% e 7,9 quando medida no ramo interno. A baixa especificidade da EMI da carótida comum estava relacionada ao espessamento que ocorre antes do desenvolvimento da doença aterosclerótica (Darabian et al., 2013). Os resultados da avaliação das medidas da EMI mostraram que a acurácia da predição de eventos futuros era maior quando as medidas do bulbo e ramo interno foram associadas com a carótida comum (Inaba et al., 2012).

Um estudo realizado em 3254 indivíduos para a avaliação da EMI de segmento específico da carótida demonstrou que a EMI em todos os segmentos (carótida comum, bulbo e ramo interno) teve uma associação significativa como os fatores de risco para doença cardiovascular. (Polak et al. 2009) e os autores sugeriram que esse achado poderia se relacionar ao desenvolvimento de DAC no futuro.

No presente estudo todas as medidas isoladamente se associaram à DAC precoce, porém empregando-se o ponto de corte tradicional (1,0 mm) a medida no bulbo não demonstrou bom desempenho como teste diagnóstico.

Um estudo realizado em 2456 indivíduos com idade inferior a 50 anos, empregando o coeficiente de correlação intraclassa (CCI), para avaliar a concordância interobservador e intraobservador da medida da EMI na carótida comum, observou CCI de 0,97(95% de IC, 0,96 a 0,98; $p < 0,0001$) e 0,93 (95% de IC, 0,91 a 0,94; $p < 0,0001$) respectivamente (Lorenz et al. 2006). No presente estudo foi observada boa concordância interobservador nas medidas da EMI nos três segmentos (carótida comum, bulbo e ramo interno), e razoável nas medidas realizadas pelo observador A empregando os métodos semiautomatizado e manual.

Um estudo que avaliou a concordância da medida da EMI em 50 indivíduos utilizou as medidas semiautomatizadas e manuais realizados por dois observadores cegados. Obteve pela análise do CCI uma variabilidade interobservador de 0,95 de 0,94 para as medidas semiautomatizadas e manuais respectivamente. As medidas manuais intraobservador apresentaram CCI de 0,96 para o operador A e 0,91 para o

observador B. Os autores concluíram que as medidas semiautomatizadas e manuais foram equivalentes (Vanoli et al., 2013).

Neste estudo, as medidas da EMI nos diversos segmentos apresentaram acurácia semelhante. Possivelmente, com o emprego de populações maiores e protocolos padronizados será possível aumentar a acurácia diagnóstica das medidas associadas especialmente na população de indivíduos jovens com escores de risco intermediário. Desse modo, a definição de novos pontos de cortes para o segmentos do bulbo e ramo interno poderão ser definidos e testados quanto a sua sensibilidade e especificidade, além de reprodutibilidade.

8.3. Limitações

O pequeno número de indivíduos da amostra não permite conclusões definitivas sobre os marcadores de risco cardiovascular em pacientes com DAC precoce, em geral; todavia, gera hipóteses para estudos maiores futuros. Também não é possível a inferência de causalidade entre disfunção endotelial, anormalidade estrutural (espessamento mioíntimal) e DAC devido às diferentes formas de medida da espessura médio-intimal, no que se refere a uma normatização das medidas dos segmentos do bulbo e ramo interno.

9. Resultados Gerais

Neste estudo, em que se procurou avaliar a função microvascular sistêmica e a espessura médio-intimal carotídea (EMI) em indivíduos com doença arterial coronariana precoce e em indivíduos controle, comprovou-se que:

1- Os pacientes com doença aterosclerótica coronariana de início precoce apresentaram alterações significativas da reatividade microvascular sistêmica, em relação ao grupo controle. A disfunção endotelial microvascular se acompanhou de marcada redução da função do músculo liso vascular, esta última associada com maior espessura medio-intimal carotídea.

2- A aferição da espessura médio-intimal realizada nos diversos segmentos da carótida se associou de forma significativa com a presença de doença aterosclerótica precoce. Não houve diferença entre o desempenho das medidas na carótida comum, bulbo e ramo interno quando avaliados pela curva ROC (aproximadamente 0,8).

3- Houve boa concordância interobservador A x B (entre 0,73 e 0,91) e concordância razoável (entre 0,62 e 0,64) nas medidas semiautomatizadas e nas realizadas pelo observador A, avaliadas pelo coeficiente de correlação intraclass.

4-Pelos gráficos de Bland-Altman percebe-se uma diferença sistemática entre as medidas semiautomáticas e do observador A (semiautomática maior) a partir de aproximadamente 1,25 mm, sendo concordantes até esse valor.

5-A análise de regressão linear múltipla demonstrou que:

- a. Indivíduos com DAC apresentaram uma medida de EMI em média maior nos segmentos da carótida comum e no bulbo foram maiores do que a carótida comum, sendo estatisticamente significativos.
- b. Também demonstrou que as medidas da EMI no ramo interno foram 0,11 mm menores que nos segmentos da carótida comum.
- c. As medidas da EMI manuais interobservadores foram maiores que as medidas semiautomatizadas e não houve diferença apreciável interobservadores, assim como entre o lado direito e esquerdo das carótidas.

10. Conclusões:

O LSCI discriminou de forma significativa os indivíduos com DAC dos indivíduos sem doença (controles), demonstrando nítida diferença da vasodilatação (resposta deprimida) através dos diferentes estímulos. Apesar do grupo DAC estar em uso de várias medicações, não teve influência significativa na resposta à vasodilatação. Na análise da espessura médio-intimal foi também significativamente aumentada no grupo com DAC.

11. Perspectivas futuras

As novas técnicas de avaliação das alterações da função endotelial são promissoras, podendo vir a ter uma maior utilização identificando os indivíduos com doença cardiovascular de início precoce. Devido à associação da EMI com a doença arterial coronária, as alterações nos vários segmentos da carótida também poderão ser úteis na identificação de indivíduos com maior risco de eventos cardiovasculares, e o conhecimento do melhor ponto de corte para as medidas pode oferecer informações adicionais às medidas padronizadas.

12. Referências Bibliográficas

Anderson, T. J., Uehata, A., Gerhard, M. D., Meredith, I. T. Knab S., Delagrangé D., et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation. **Journal American College of Cardiology**, 26: 1235-41; 1995

Agarwal S C., Allen J., Murray A., Purcell I F. Laser Doppler assessment of dermal circulatory changes in people with coronary artery disease. **Microvascular Research**, 84: 55-59; 2012

Altman DG. Practical statistics for medical research. London: **Chapman & Hill**; 1991.

Ando J. & Yamamoto K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. **Antioxidants & Redox Signaling**, 15:1389-03; 2011

Anoop S., Misra, A., Meena, K., Luthra, K. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular and coronary heart diseases. **Indian Journal Medical Research**, 132: 363-78; 2010

Bachman J. M., Willis B. L., Ayers C. R., Kera, Berry J.D. Association between family history and coronary heart disease death across long-term follow-up in men: The Cooper Center Longitudinal Study. **Circulation**, 125: 3092-98; 2012

Binggeli C., Spieker L. E., Corti R., Sudano I. Stojanovic V., Hayoz D. et al. Statins enhance postischemic hyperemia in the skin circulation of hypercholesterolemic patients. A monitoring test of endothelial dysfunction for clinical practice? **Journal of the American College of Cardiology**, 42: 71-7; 2003.

Boer M. P., Meijer, R. I., Wijnstok N. J., Jonk A.M., Houben A. J., Stehouwer C. D., et al. Microvascular dysfunction: A potential Mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. **Microcirculation**, 19: 5-18; 2012

Bonetti P. O., Lerman, L. O., Lerman, A. Endothelial dysfunction. A marker of atherosclerotic risk. **Atherosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology**, 23: 168-75; 2003

Chapman CML., Beilby J., P. Humphries S. E., Palmer, L. J., Thompson P. L., Hung J. Association of an allelic variant of interleukin-6 with subclinical carotid atherosclerosis in Australian community population. **The European Society of cardiology**, 24: 1494-99; 2003

Cobble M & Bale B. Carotid intima-media thickness: knowledge and application to everyday practice. **Postgraduate Medicine**, 122: 10-18; 2010

Coppola G., Corrado E., Piraino D., Carella M., Muratori L., Camarda P. et al. Carotid intimal-media thickness and endothelial function in young patients with history of myocardial infarction. **International Angiology**; 28:120-126; 2009

Cracowski J.L., Minson, C. T., Salvat-Melis, M., Halliwill, J. R. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. **Pharmacological Science**, 27: 503-08; 2006

Dai G., Kaazempur-Mofrad M. R., Natarajan S., Zhang, Y., Vaughn S., Blackman, B. R., et al. A. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and-resistant regions of human vasculature. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101: 14871-76; 2004.

Darabian S., Hormuz M., Latif M.A., Pahlevan S., Budoff M. J. The role carotid intimal thickness testing and risk prediction in the development of coronary atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, 15: 1-4; 2013

Davies, P.F. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. **Nature Clinical Practice, Cardiovascular medicine**, 6: 16-26; 2009.

Davis P. H., Dawson J. D., Mahoney L. T., Lauer R. M. Increased Carotid intimal-Medial Thickness and Coronary Calcification. Are related in Young and Middle-Aged Adults. The Muscatine Study. **Circulation**, 100: 838-42; 1999

Deanfield J. E., Halcox J. P, Rabelink T. J. Endothelial function and dysfunction. Test and clinical relevance. **Circulation**, 115: 1285-95; 2007

Debbabi H., Bonnin P., Ducluzeau P. H., Lefthériotis, G., Levy B.I. Noninvasive assessment of endothelial function in the skin microcirculation. **American Journal of Hypertension**, 23: 541-46; 2010

Di Geso L, Zardi EM, Afeltra A, Salaffi F., Carotti F. Gutierrez M., et al. Comparison between conventional and automated software-guided ultrasound assessment of bilateral common carotid intima-media thickness in patients with rheumatic diseases. **Clinical Rheumatology**, 31: 881-84; 2012

Doneen A. & Bale, B. F. Carotid intima-media thickness testing as an asymptomatic Cardiovascular disease identifier and method for making therapeutic decision **Postgraduate Medicine**, 125: 108-23; 2013.

Eichner J. E., Dunn S. T., Perveen G., Thompson D. M., Stewart K. E., Stroehla B. C., et al. Apolipoprotein E Polymorphism and Cardiovascular Disease: A HuGe (Human Genome Epidemiology) **American Journal of Epidemiology**, 155: 487-95; 2002

Eifert S., Rasch A., Beiras-Fernandez A., Nollert G., Reichart B., Lohse P. Polymorphisms in APOE, NOS3, and LIPC gene may be risk factors for cardiac

adverse events after primary CABG. **Journal of Cardiothoracic Surgery**, 19: 46-54; 2009

Finn A.V., Kolodgie F. D., Virmani R. Correlation between carotid intimal/ medial thickness and atherosclerosis. A point of view from pathology. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, 30: 177-81; 2010.

Flammer .A. J. & Lüscher, T. F. Human endothelial dysfunction: EDRFs. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, 126: 1005-13; 2010.

Flammer A. J., Anderson T., Celermajer D. S., Creager M. A., Deanfield J., Ganz P. et al. The assessment of endothelial function. From research into clinical practice. **Circulation**, 126: 753-67; 2012.

Furchgott R. F. & Zawadziki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-76; 1980.

George A. & Movahed A. - Coronary artery Calcium Scores: Current Thinking and Clinical Application. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**, 2: 87-92; 2008.

Glass C.K. & Witztum J.L. Atherosclerosis: The road ahead. **Cell Press**, 104:503-16; 2001.

Granger D., Rodrigues S. F., Yildirim A., Senchenkova, E. Y. Microvascular responses to cardiovascular risk factors. **Microcirculation**, 17: 192-05; 2010.

Greenland P., Bonow R.O., Brundage B.H., Budoff M.J., Eisenberg M.J., Grundy S.M. et al. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment

and in evaluation of patients with chest pain. **Journal of the American College of Cardiology**, 49: 378-02; 2007.

Grundy S.M., Cleeman, J. I., Merz, C. N., Brewer, H. B., Clark L. T., Hunninghake D. B. et al. Implication of recent clinical trials for National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines-NECP report. **Circulation**, 110: 227-39; 2004

Grundy S.M., Becker D., Clark L.T., Cooper R.S., Denke M. A., Howard J. et al. Third report of the National Cholesterol Education Program (NECP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) final report. **Circulation**, 106: 3143-421; 2002

Hansell J, Henareh, L., Agewall, S., Norman M. Non invasive assessment of endothelial function-relation between vasodilatory responses in skin microcirculation and brachial artery. **Clinical Physiology and Function Imaging**, 24: 317-22; 2004

Holowatz L. A., Thompson-Torgerson C. S., Kenney W.L. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. **Journal of Applied Physiology**, 105: 370-72; 2008

Humeau-Heurtier A., Buard B., Mahe, G., Abraham P., Laser speckle contrast imaging of the skin: interest in processing the perfusion data. **Medical & Biological Engineering & Computing**, 50: 103-5; 2012 (1).

Humeau-Heurtier A., Mahé, G., Durand S., Henrion, D., Abraham P. Laser speckle contrast imaging: Multifractal analysis of data recorded in healthy subjects. **Medical Physics**, 39: 5849-57; 2012 (2).

Humphries S.E., Luong L. A., Ogg M. S., Hawe E., Miller G. J. The interleukin-6 -174G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and

systolic blood pressure in healthy men. **European Heart Journal**, 22: 2243-52, 2001.

Inaba Y., Chen J.A., Bergmann S.R. Carotid plaque, compared with carotid intima-media thickness, more accurately predicts coronary artery events: A meta-analysis. **Atherosclerosis**, 220: 128-33; 2012.

Iribarren C., Go AS, Husson G., Sidney S., Fair J. M., Quertermous T. et al. Metabolic syndrome and early-onset coronary artery disease. **Journal of the American College of Cardiology**, 48: 1800-07; 2006.

Inci MF, Özkan F, Ark B., Vurdem Ü. E., Ege M. R., Sincer I. et al. Sonographic evaluation for predicting the presence and severity of coronary artery disease. **Ultrasound Q.**, 29: 125-30; 2013.

Juonala M., Viikari J.S., Laitinen T., Marniemi J., Helenius H, Rönnemaa T. Interrelations between brachial endothelial function and carotid intima-media thickness in young adult. The cardiovascular risk in young Finns study. **Circulation**, 110: 2918-23; 2004.

Klausen K., Borch-Johnsen K., Feld-Rasmussen B., Jensen G., Clausen P., Scharling H., et al. Very low levels of microalbuminuria are associated with increases risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. **Circulation**, 110: 32-5, 2004.

Kenney W. L., Joseph G. C., Lacy M. A. Cutaneous microvascular dysfunction correlates with serum LDL and LOX-1 receptor concentrations. **Microvascular Research**, 85: 112-17; 2013.

Klein L. W. & Nathan S. Coronary artery disease in young adults. **Journal of the American College of Cardiology**, 41: 529-31; 2003.

Levy B. I., Ambrosio, G., Pries, A. R., H.A.J. Struijker-Boudier Microcirculation in Hypertension A New Target for Treatment? **Circulation**, 104: 735-40; 2001.

Li D. & Mehta J. Intracellular Signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis. **Circulation Research**, 104: 566-568; 2009.

Lin J.S., Olson C.M., Johnson E.S. & Whitlock E.P. The ankle-brachial index for peripheral artery disease screening and cardiovascular disease prediction among asymptomatic adults: A systematic evidence review for the U.S. preventive services task force. **Annals of Internal Medicine**, 159: 333-41; 2013.

Lorenz. M. W., Kegler, S., Steinmetz, H., Markus, H. S., Sitzer M Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). **Stroke**, 37: 87-92; 2006.

Mahé G., Humeau-Heurtier, A., Durand, S., Leftheriotis G., Abraham, P. Assessment of skin microvascular function and dysfunction with laser speckle contrast imaging. **Circulation Cardiovascular imaging**, 5: 155-63; 2012.

Mcglinchey P. G., Spence, M. S., Patterson, C. C., Allen, A. R., Murphy, G., Savage, D. A. Cytokine gene polymorphisms in ischemic heart disease: investigation using family-based tests of association. **Journal of Molecular Medicine**, 82: 756-761; 2004.

Negi I. S. & Nambi V. The role of carotid intimal thickness and plaque imaging in risk stratification for coronary heart disease. **Current Atherosclerosis Reports**, 14: 14:115-123, 2012.

Oren, A., Vos, L. E., Uiterwaal, C. S. Gorbee D. E. Bots M. L. Cardiovascular risk factors and increased carotid intima-media thickness in healthy young adults: the

Atherosclerosis Risk in Young Adults (ARYA) Study. **Archives of Internal Medicine**, 163: 1787-92; 2003.

Otaki, Y., Gransar, H., Berman, Dey D, Lin FY, Achenbach S. et al. Impact of family history of artery disease in young individuals (from confirm registry) **American Journal of Cardiology**, 111: 1881-86; 2013.

Otto CM; The Practice of Clinical Echocardiography 3rd Ed. 2007.**Saunders**.

Paiva M.S, Oliveira I. R., Oliveira L.A. R. R., Mota F.R. S., Paiva H. Proteína C reativa como marcador prognóstico pós-intervenção coronária percutânea. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, 14: 71-5; 2006.

Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I., Reiner Z., Verschuren M. et al. European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). **European Heart Journal**, 33: 1635-701; 2012.

Peters, S.A. & Bots, M.L. Carotid Intima-Media Thickness Studies: Study Design and Data Analysis. **Journal of Stroke**, 15: 38-48; 2013.

Polak J. F., Person, S. D., Wei G. S. Godreau A, Jacobs DR Jr, Harrington A et al. Segment specific associations of carotid intima-media thickness with cardiovascular risk factors: the coronary artery development in young adults (CARDIA) Study. **Stroke**, 41: 9-15; 2010.

Reriani M. K., Lerman, L. O., Lerman, A. Endothelial function as functional expression of cardiovascular risk factors. **Biomarkers in Medicine**, 4: 351-60, 2010.

Robertson C.M., Fowkes F.G.R., Price J.F. Carotid intima-media thickness and prediction of vascular events. **Vascular Medicine**, 17: 239-48, 2012.

Roman M. J., Kizer J. R., Best L. G., Lee E. T., Howard B. V., Shara N. M et al. Vascular biomarkers in the prediction of clinical cardiovascular disease. The strong heart study. **Hypertension**, 59: 29-35, 2012.

Roustit M., Millet C., Blaise S., Dufournet, B., Cracowski, J. L. Excellent reproducibility of laser speckle contrast imaging to assess skin microvascular reactivity **Microvascular Research**, 80: 505-11, 2010.

Rubin J.B. & Borden W.B. Coronary heart disease in young adults. **Current Atherosclerosis Reports**, 14: 140-49; 2012.

Senarathna J., Rege, A., Li, N., Thakor, N. Laser speckle de contrast imaging: theory instrumentation and applications. **Biomedical Engineering, IEEE**, 6: 99-110; 2013

Serne E.H., Jongh R. T., Eringa E.C., Ijzerman R. G. Boer M. P. Stehouwe C. D. A. Microvascular dysfunction: causative role in the association between hypertension, insulin resistance and the metabolic syndrome? **Essays Biochemistry**, 42: 163-76; 2006.

Shanker J. & Kakkar V.V. Implications of genetic polymorphisms in inflammation-induced atherosclerosis. **Cardiovascular medicine Journal**, 4: 30-37; 2010.

Shireman PK. & Pearce WH. Endothelial cell function: Biologic and physiologic functions in health and disease. *Advances in clinical Medicine*; **American Roentgen Ray Society**, 166: 7-13; 1996.

Silva MC. P., Janssens A. C. J., Hofman A., Witteman J.C. M., Duijn C. M. Apolipoprotein E gene is related to mortality only in normal weight individuals: The Rotterdam study. **European Journal Epidemiology**, 23: 135-42; 2008.

Simon A, Megnien JL, Chironi G. The value of carotid intima-media thickness for predicting cardiovascular risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 30: 182-5; 2010.

Sitia S. Tomasoni, L., Atzeni, F., Ambrosio, G. Cordiano C, Catapano A. et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. **Autoimmunity Reviews**, 9: 830-34; 2010.

StataCorp. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: **StataCorp LP**. 2011.

Stein J.H., Korcarz, C. E., Hurst, R. T., Lonn, E., Kendall C. B., Mohler E. R. et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: A consensus statement from the American Society of Echocardiography carotid intima-media thickness task force. Endorse by the society for Vascular Medicine. **Journal American Society of Echocardiography**, 21: 93-111; 2008.

Szmitko PE. Wang, C. H., Weisel, R. D., de Almeida, J. Anderson T. J., Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation Part I. **Circulation**, 108: 1917-23; 2003.

Szmitko PE., Wang, C. H., Weisel R. D., Jeffries G. A., Anderson T. J., Verma S. Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II. **Circulation**, 108: 2041-48; 2003.

Tuttolomondo A., Di Raimondo D., Pecoraro R., Arnao V., Pinto A. Licata, G. Atherosclerosis as an inflammatory disease. **Current Pharmaceutical Design**, 18: 4266-88; 2012.

U.S. Preventive Services Task force. Using nontraditional risk factors in coronary heart disease risk assessment: U. S. preventive Task force recommendation statement. **Annals of Internal Medicine**, 151: 474-82; 2009.

Vanoli, D., Lindqvist, P., Wiklund, U. Henein M, Näslund U. Fully automated on-screen carotid intima-media thickness measurement: A screening tool for subclinical atherosclerosis. **Journal of Clinical Ultrasound**, 41: 333-39; 2013.

Weir, Matthew R. Microalbuminuria and cardiovascular disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, 2: 581-90; 2007.

13. Anexos

13.1. Anexo I

Aprovação do CEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ASSISTÊNCIA A SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CARTA DE APROVAÇÃO

Prezados Senhores,

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Cardiologia reuniu-se em 07 de junho de 2011 e aprovou por unanimidade:

- 1- Protocolo "Doença Arterial Coronariana de início precoce: estudo de marcadores clínicos, genéticos e de imagem".
- 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisa registrada neste CEP sob o nº.0332/11-05-2011 e de responsabilidade da Investigadora Principal Andréa Rocha de Lorenzo.

Relatórios parciais deverão ser apresentados em 09 de dezembro de 2011 e 09 de junho de 2012.

Rio de Janeiro, 13 de junho de 2011.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mônica Moura de Vasconcelos', written over a horizontal line.

Mônica Moura de Vasconcelos
Coordenadora do CEP do INC

Dra. Mônica Moura de Vasconcelos
Instituto Nacional de Cardiologia
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Ministerio da Saúde
Matr. 6229686 - CRM nº 5237539-9




MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ASSISTÊNCIA A SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CARTA DE APROVAÇÃO

Prezados Senhores:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Cardiologia reuniu-se em 12 de Fevereiro de 2008 e aprovou por unanimidade o Projeto "Investigação de marcadores genéticos e novos fatores de risco em pacientes com doença arterial coronariana precoce", sob responsabilidade da investigadora principal Dra. Andréa Rocha de Lorenzo, sendo registrado neste CEP sob o n. "0182/12.12.07.

Rio de Janeiro, 12 de Fevereiro de 2008.


Ivan Luiz Cordovil de Oliveira
Coordenador do CEP

13.2. Anexo II

Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisa: Alterações da função microvascular cutânea e da espessura médio-intimal carotídea em indivíduos com doença arterial coronária de início precoce.

(A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre fatores que podem aumentar o risco de doença aterosclerótica das artérias em pessoas jovens. A doença aterosclerótica das artérias ocorre pelo entupimento desses vasos por placas de gordura. O risco de isso ocorrer depende de uma predisposição da própria pessoa (chamada de predisposição genética) e do estilo de vida da pessoa, ou seja, se ela fuma, se tem níveis elevados de gordura no sangue, muitas vezes ocasionados por uma alimentação inadequada, etc. Os fatores genéticos que facilitam o aparecimento de doença nas artérias se relacionam ao código genético presente em todas as células que compõe o corpo. Esse código determina todas as características da pessoa (cor dos olhos, tipo de sangue, por exemplo), inclusive a predisposição a ter determinadas doenças. Esta pesquisa utilizará modernas técnicas de Genética e Biologia Molecular que permitem verificar se o código genético está “normal” ou “correto” ou se existe alguma troca (mutação). Algumas trocas não causam problemas, mas outras aumentam o risco para o desenvolvimento de doenças. No caso da doença aterosclerótica das artérias, já foram descobertas várias mutações que podem aumentar o risco da doença. Por isso é importante pesquisar se existem estas mutações e quais alterações estas mutações podem causar na pessoa que as tem. Caso concorde em participar, você será solicitado a comparecer a este hospital para se submeter a diversos exames clínicos e laboratoriais. Serão realizados exames de sangue (colhido em veia do braço). A coleta de sangue implica em uma dor leve durante a introdução da agulha na pele e na veia do braço. Pode surgir uma vermelhidão no local da picada imediatamente após a coleta ou mesmo se mantendo até três dias após. O sangue será usado para dosagens bioquímicas e extração do DNA (material genético) que será armazenado para análise de marcadores genéticos relacionados a doenças cardiovasculares. Será feito também uma tomografia computadorizada das

coronárias (artérias do coração), exame que não necessita de contraste, mas que emite uma pequena quantidade de radiação, que não afeta a sua saúde, mas não deve ser feito por gestantes; um ecocardiograma (exame do coração através de ultrassom, que não necessita de contraste e não emite radiação) e Doppler de carótida (exame das artérias do pescoço através de ultrassom, que também não necessita de contraste e não emite radiação), além de exame de reatividade capilar com acetil-colina e nitroglicerina sem a introdução dessas substâncias por via intramuscular ou venosa, mas por via dérmica, através do Laser Doppler fluxometria sem dano ou perigo ao paciente e vídeocapilaroscopia com visualização do capilar através de microscópio de fibra óptica.

Todos os exames são gratuitos. Os resultados serão encaminhados ao seu médico por você. Durante o estudo você será informado de qualquer nova descoberta significativa sobre os resultados de exames, que possa alterar sua vontade de continuar participante deste estudo.

Será feito um acompanhamento através de consultas por telefone, a cada ano, durante 10 anos, com o objetivo de saber seu estado de saúde, podendo eventualmente ser necessária sua presença no INC e /ou Hospital Universitário Clementino Fraga Filho para realização de novos exames, o que lhe será comunicado e explicado.

Todas as informações são confidenciais, e seu nome ou qualquer identificação não serão divulgados os resultados desta pesquisa poderão servir para publicações em revistas, jornais e/ou congressos médicos.

Este estudo permitirá o conhecimento melhor das doenças do coração. Este fato pode beneficiar seu tratamento atual e futuro e de outras pessoas portadoras desta doença. É possível, entretanto, que nenhum benefício a sua saúde ocorra durante ou após este estudo ser completado. Não haverá recompensa financeira pela participação nesta pesquisa. A qualquer momento você poderá desistir de participar, sem que haja prejuízos para você. A não concordância com a inclusão no estudo aqui proposto também não acarretará nenhum prejuízo para o tratamento que recebe habitualmente. Caso você decida sair da pesquisa após seu início, você deverá comunicar ao médico do estudo com a Dra. Elaine Guimarães de Souza CRM 5258126-0 Tel. Cel.: 99186623 e orientadores Dra. Andrea Rocha de Lorenzo Tel.: 9531 6994, Dra. Glaucia Maria Moraes de Oliveira Tel.: 9603 5580.

Em virtude de considerar claras e satisfatórias as informações acima expostas, e ficando estabelecido que minhas dúvidas sejam esclarecidas sempre que solicitar,

Eu _____
_____, de RG: _____ aceito, voluntariamente, ser
incluído neste estudo na presente data:

Rio de Janeiro, ____ de _____ de 20 ____.

Testemunha 1: _____ RG: _____

Testemunha 2 : _____ RG: _____

13.3. Anexo III

I. Ficha para a coleta de dados dos pacientes.

Projeto: Alterações da função microvascular cutânea e da espessura médio-intimal carotídea em indivíduos com doença arterial coronária de início precoce.

Ficha de coleta de dados – Instituto Nacional de Cardiologia, INC

A – Identificação do coletor de dados:

Data da coleta de dados: ___/___/___ Coleta realizada por: _____

B – Identificação:

Nome completo: _____ Prontuário: _____

Diagnóstico no Pront.: _____

Data de adm.: ___/___/___ (dd/ mm /aaaa) 99/99/9999 .NI

Idade do 1º Evento: _____ anos

Data de Nascimento: ___/___/___ (dd/mm /aaaa) 99/99/9999.NI

Idade: _____ anos

Cor da pele: 1.branca 2.negra 3.mestiça 4.outra 9.NI

Sexo: 1.M 2.F Nac.: _____

Trabalhava: 1.Sim 2.Não 3.Aposentado 4.Do lar 5.Estudante 9.NI

Procedente: _____

Renda familiar em SM: 1. <2 2. 2-5 3. 5-10 4. >10

Profissão: _____

Grau de instrução: 1. 1º grau incompleto 2. 1º grau completo 3. 2º grau incompleto 4. 2º grau completo 5. 3º grau incompleto 6. 3º grau completo 7. analfabeto 9.NI

Endereço: _____

CEP: _____ - _____

Bairro: _____ Município: _____

Estado: _____

Tel.: (____) _____ - _____ Tel.: (____) _____ - _____

C – Historia da Doença Atual:

Queixa principal: 1.dor torácica 2.dispnéia 3.palpitação 4.outra* 9.NI

*Qual? _____

Data da QP: ___/___/___ (dd / mm / aaaa) 99/99/9999 .NI

Relato de dor ? 1.Sim 2.Não 9.NI

Localização: 1.retroesternal 2.precordial 3.torácica 4.dorso 5.outra 9.NI

Irradiação: 1.MSE 2.mandíbula 3.epigástrio 4.MSD 5.outra 9.NI

Intensidade: 1.leve 2.moderada 3.forte 9.NI

Classificação: 1.Angina pectoris típica 2.Angina pectoris atípica 3.Dor não-anginosa 9.NI

Episódio anterior há: 1.<48h 2.>48h e <2meses 3.>2meses 4.Não houve 9.NI

Nº de episódios nos últimos 7 dias: _____ Mesmas características? 1.Sim 2.Não 9.NI

Outros sinais e sintomas: _____

Dispnéia: 1.Sim 2.Não 9.NI Sudorese: 1.Sim 2.Não 9.NI

Palpitação: 1.Sim 2.Não 9.NI Náusea/vômitos: 1.Sim 2.Não 9.NI

Lipotímia: 1.Sim 2.Não 9.NI Outros: _____

D – Antecedentes e fatores de risco:					
Diagnósticos de base e comorbidades (Consideramos recente evento com <6 meses):					
Sedentarismo	1.Sim 2.Não 9.NI	Obesidade (IMC> 30)	1.Sim 2.Não 9.NI		
Estresse	1.Sim 2.Não 9.NI	Etilismo	1.Sim 2.Não 9.NI		
Tabagismo atual	1.Sim 2.Não 9.NI	Carga tabágica: _____ maços x ano (ativo ou não)			
Ex-tabagista	1.Sim 2.Não 9.NI	Há quanto tempo? ___ 1.dias 2.meses 3.anos 9.NI			
HAS (PA>140x90 ou tto)	1.Sim 2.Não 9.NI	Há quanto tempo? ___ 1.dias 2.meses 3.anos 9.NI			
Em TTO?	1.Sim 2.Não 9.NI	Regular?	1.Sim 2.Não 9.NI		
DM tipo 1	1.Sim 2.Não 9.NI	Há quanto tempo? ___ 1.dias 2.meses 3.anos 9.NI			
DM tipo 2	1.Sim 2.Não 9.NI	Data: ___/___/___ (dd/ mm / aaaa).NI			
Dislipidemia	1.Sim 2.Não 9.NI	Data: ___/___/___ (dd/ mm / aaaa).NI			
AVE hemorrágico	1.Sim 2.Não 9.NI	Data: ___/___/___ (dd/ mm / aaaa).NI			
AVE isquêmico	1.Sim 2.Não 9.NI	H. Fam de Morte súbita? 1.Sim 2.Não 9.NI			
AVE não especificado	1.Sim 2.Não 9.NI				
Hist. familiar de DAC	1.Sim 2.Não 9.NI				
Hist fam. DAC precoce (H<55a, M<65)	1.Sim 2.Não 9.NI				
Angina instável	1.Sim 2.Não 9.NI				
Insuf. coronar. crônica	1.Sim 2.Não 9.NI				
Dç. Vascular periférica	1.Sim 2.Não 9.NI				
IAM prévio	1.Sim 2.Não 9.NI	Data: ___/___/___ (dd / mm / aaaa).NI			
PTCA prévio	1.Sim 2.Não 9.NI	Data: ___/___/___ (dd / mm / aaaa).NI			
CRVM prévia	1.Sim 2.Não 9.NI	Data: ___/___/___ (dd / mm / aaaa).NI			
IVE (FE< 40%)	1.Sim 2.Não 9.NI	Class. NYHA: 1.I 2.II 3.III 4.IV 9.NI			
IVD	1.Sim 2.Não 9.NI	Critério: _____			
Aneurisma de aorta?	1.Sim 2.Não 9.NI	Critério: _____ Diam aorta no Eco: _____			
Arritmias / Distúrbios de condução?	1.Sim 2.Não 9.NI	Quais? _____			
Dçs valvares?	1.IAo 2. EAo 3. IM 4. EM, 5. IT 6. Não 9.NI	Grave? 1. Sim 2. Não 9. NI			
DPOC	1.Sim 2.Não 9.NI	Moderada? 1. Sim 2. Não 9. NI			
		Hipotireoidismo 1.Sim 2.Não 9.NI			
Outras doenças: _____					
Uso de drogas ilícitas	1.Cocaína 2.Outras* 3.Não 9.NI	*Outras: _____			
Uso de anticoncepcional:	1. Sim 2. Não 9. NI	Nome/dose: _____			
G _ P _ C _ A _	DM gestacional: 1. Sim 2. Não 9. NI	HA na gravidez: 1. Sim 2. Não 9. NI			
Menopausa:	1. Sim 2. Não 9. NI	Idade menopausa: _____			
Medicações atuais	Nome	Dose	Medicações atuais	Nome	Dose
B-bloqueador:			Fibrato:		
AAS:			Hipoglicemiante:		
Diurético:			Insulina:		
IECA:			Amiodarona:		
Estatina:			Digoxina:		
Nitrato:			Clopidogrel:		
Antagonista de Ca ²⁺ :			Cumarínico:		
ARA II:			Ticlopidina:		
Outras: _____					

E – Exame Físico:

PA: _____ X _____ mmHg (999 X 999.NI)

FR: _____ irpm (99.NI)

FC: _____ bpm (999. NI)

Tax.: _____ , _____ (99,9. NI)

Peso (Kg):

Altura (m): _____ IMC: _____

Cintura:

Quadril:

RCQ:

Dispnéico

1.Sim 2.Não 9.NI

Palidez de mucosas

1.Sim 2.Não 9.NI

Edema

1.Sim 2.Não 9.NI

Aparelho Cardiovascular:

Bulhas?

1. Norm 2. Hipo 3. Hiper 9.NI

B3?

1. Sim 2.Não 9.NI

Ritmo regular?

1. Sim 2. Não 9.NI

B4?

1. Sim 2.Não 9.NI

Sopro?

1.Sistólico 2.Diastólico 3.Não 9.NI

Foco? 1. aórtico 2.mitral 3.tricúspide 4.pulmonar 5.aórtico acessório
6.pancardíaco 9.NI

Quantas cruzes em 6? 1. (1) 2. (2) 3.(3) 4.(4) 5.(5)6.(6) 9.NI

Turgência
patológica?

jugular

1. Sim 2. Não 9. NI

Pulsos periféricos?

1. Amplo/Normal 2.Reduzido/Alterado* 9.NI

*Que região? _____

Sopro carotídeo?

1. Sim 2. Não 9. NI

Aparelho Respiratório:

Estertores? 1. Sim 2. Não 9.NI

Sibilos? 1. Sim 2. Não 9.NI

F – ECG:

Código da parede: 1.anterior 2.lateral 3.inferior 4.posterior/dorsal 5.nenhuma 9.NI

ECG: 1.normal 2.anormal 3.não fez 9.NI

Data: ___/___/___ (dd / mm / aaaa)

Supra de ST: _____

Parede: _____

Isquemia: _____

Parede: _____

Infra de ST: _____

Parede: _____

Infarto: _____

Parede: _____

Inversão de onda T: _____

Parede: _____

HVE: 1. Sim 2. Não 9. NI

Arritmias/Distúrbios de condução? 1. Sim 2. Não 9. NI

Quais? _____

Outros diagnósticos? _____

I – Exames laboratoriais:				
Séries branca e vermelha:				
	Valor:	Data (dd / mm/ aaaa):	Valor:	Data (dd/mm aaa):
Hematócrito (%):			Hemoglobina:	
Leucócitos:			Bastões:	
Bioquímica:				
Colesterol total:			Uréia:	
HDL:			Creatinina:	
LDL:			Na ⁺ :	
Triglicerídeos:			K ⁺ :	
Glicose:			Acido úrico:	
CK:			Bilirrubina direta:	
CK-MB:			Bilirrubina indireta:	
TGO:			Hemoglicosilada	
TGP:			VHS	
Gama-GT:			PCR-ultrassensível	
Fosfatase alcalina:			Apo A	
TSH			Apo B	
Insulina			Fibrinogenio	
Beta-HCG				

Cateterismo	1.Sim 2.Não	Data: ___/___/___ (dd / mm / aaaa)	99/99/9999 .NI
Código do segmento:	1.anterior 2.lateral 3.inferior 4.posterior/dorsal 9.NI		
Indicação:	1. Primária	2. Tardia	3. Resgate 4. Estratificação 9. NI
Grau de lesão:	Código de coleta:		
Tronco: _____	M1: _____	1.0 a 49% (normal, leve)	
ACDA: _____	M2: _____	2.50 a 69% (moderada)	
D1: _____	ACD: _____	3.70 a 99% (grave)	
D2: _____	DP: _____	4.100% (oclusão)	
ACx: _____	VP: _____	9.NI	
Hipocinesia?	1. Sim 2. Não	Segmentos: _____	
Acinesia?	1. Sim 2. Não	Segmentos: _____	
Discinesia	1. Sim 2. Não	Segmentos: _____	
Função ventricular:	1.normal 2.disf. leve 3.disf. leve-mod 4.disf. mod 5.disf. mod-grave 6.disf. grave 9.NI		
Fração de ejeção:	_____ % 99 NI		

ECO (mais recente):		Fez? 1.Sim 2.Não 9.NI			
Código do segmento: 1.anterior 2.septo anterior 3.septo inferior 4.inferior 5.infero-lateral 6. antero-lateral 7.apical 9.NI					
Data: _____ / _____ / _____ (dd/mm/aaaa)		99/99/9999.NI			
AO: _____ mm	9.NI	VED: _____ mm	99.NI		
AE: _____ mm	9.NI	VES: _____ mm	99.NI		
SIV: _____ mm	9.NI	PP: _____ mm	99.NI	VD _____ mm	99.NI
FE Teicholz (%): _____		99.NI			
FE Simpsons (%): _____		99.NI			
Função diastólica	1.Normal	2.déficit de relaxamento	3.Pseudo-normal	4.Restrictivo	9.NI
Função Sistólica de VE:		1. normal 2.disf. leve 3.disf. moderada 4. disf. grave 9.NI			
Hipocinesia difusa:		1. Sim 2. Não			
Hipocinesia:		1. Sim 2. Não	Segmentos: _____		
Acinesia:		1. Sim 2. Não	Segmentos: _____		
Discinesia:		1. Sim 2. Não	Segmentos: _____		
Doppler:		1.Insuficiência	1. mitral 2.aórtica 3. tricúspide 4.pulmonar 9.NI		
		2. Estenose	1. mínima 2. leve 3. moderada 4. severa 9. NI		
Derrame pericárdico moderado/grave:		1. Sim 2.Não 9. NI	VCI: 1. normal 2. congesta		1. Sim 2.Não 9. NI
Outros diagnósticos?		1. Sim 2. Não 9. NI	Quais? _____		

Teste de esforço:

Data: ___/___/___ (dd/mm/aaaa) 99/99/9999.NI

Fez? 1.Sim, c/ isquemia 2.Sim, s/ isquemia 3.Sim, s/ informação 4.Não 9.NI

METS alcançados: ___ 99.NI

Cintilografia:

Data: ___/___/___ (dd/mm/aaaa) 99/99/9999.NI

Fez? 1.Sim, c/ isquemia 2.Sim, s/ isquemia 3.Sim, s/ informação 4.Não 9.NI

Segmentos isquêmicos: ___ 99.NI

ECO de estresse:

Data: ___/___/___ (dd/mm/aaaa) 99/99/9999.NI

Fez? 1.Sim, c/ isquemia 2.Sim, s/ isquemia 3.Sim, s/ informação 4.Não 9.NI

Segmentos isquêmicos: ___ 99.NI

Outro exame: 1.Sim 2.Não 9.NI **Qual?** _____ 0.Não fez

Data: ___/___/___ (dd/mm/aaaa) 99/99/9999.NI

Laudo: _____ 0.Não fez

Duplex Scan de carótidas		1.Sim 2.Não	Data: ___/___/___ (dd/mm/aaaa) 99/99/9999.NI
EMI (mm): Ant. D: ___ Lat. D: ___ Post D: ___		Ant. E: ___ Lat. E: ___ Post. E: ___	
BI D: ___ RID: ___		BIE: ___ RIE: ___	
Presença de placa: 1. Sim 2. Não 9.NI			
Tipo de placa: 1. Lipídica 2. Cálctica 3. Mista 9. NI			
Superfície: 1. Regular 2. Irregular 3. Mista 4. Erosão 9. NI			
Esquerdo:		Direito:	
Carótida comum: ___/___/___		Carótida comum: ___/___/___	
Bulbo: ___/___/___		Bulbo: ___/___/___	
Ramo interno: ___/___/___		Ramo interno: ___/___/___	
Ramo externo: ___/___/___		Ramo externo: ___/___/___	
		1.0 a 49% (normal, leve)	
		2.50 a 69% (moderada)	
		3.70 a 99% (grave)	
		4.100% (oclusão)	
		9.NI	
Obs: preenchimento: cod placa / cod superfície / cod % obstrução			

J – Tratamentos realizados:	
PTCA	1.Primária 2.Tardia 3.Resgate 4.Após estratificação 5. Não Fez
Data:	___/___/___ (dd / mm / aaaa) 99/99/9999 .NI
Stent?	1.Farmacológico 2.Não revestido 3.Não fez 9.NI
Com sucesso?	1.Sim 2.Não 9.NI
Vasos abordados:	
Tronco:	1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não M1: 1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não
ACDA:	1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não M2: 1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não
D1:	1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não ACD: 1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não
D2:	1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não DP: 1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não
ACx:	1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não VP: 1.Sim, stent 2.Sim, s/ stent 3.Não

CRVM:	
1.Sim 2.Não	Data: ___/___/___ (dd / mm / aaaa) 99/99/9999 .NI
Safena:	1.uma 2.duas 3.três 4.quatro 5.cinco 9.NI
Mamária:	1.uma 2.duas 9.NI
Completa?	1.Sim 2.Não 9.NI
Vasos abordados:	
Tronco:	1.Sim 2.Não M1: 1.Sim 2.Não
ACDA:	1.Sim 2.Não M2: 1.Sim 2.Não
D1:	1.Sim 2.Não ACD: 1.Sim 2.Não
D2:	1.Sim 2.Não DP: 1.Sim 2.Não
ACx:	1.Sim 2.Não VP: 1.Sim 2.Não