Ana Cecília Diniz Oliveira

EFEITO DO RAMIPRIL SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do Título em Mestre em Medicina Translacional

SÃO PAULO
2013

Ana Cecília Diniz Oliveira

EFEITO DO RAMIPRIL SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do Título em Mestre em Medicina Translacional

ORIENTADORA: Profa. Dra. EMILIA INOUE SATO

COORDENADORA: Profa. Dra. DULCE ELENA CASARINI

SÃO PAULO
2013

Oliveira, Ana Cecília Diniz.
Efeito do ramipril sobre a função endotelial e células progenitoras endoteliais em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. /Ana cecília diniz Oliveira.—Sã0 Paulo, 2013.

xvi, 57f

(Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: "Effect of ramipril on endothelial function and endothelial progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus".

1.Lúpus eritematoso sistêmico. 2.Endotélio. 3.Ramipril

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

CHEFE DO DEPARTAMENTO: Prof. DR. ALVARO NAGIB ATALLAH

COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO : Profa. Dra. DULCE ELENA CASARINI

Ana Cecília Diniz Oliveira

EFEITO DO RAMIPRIL SOBRE A FUNÇÃO ENDOTELIAL E CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Maria Cristina de Oliveira Izar

Prof. Dr. Eduardo Ferreira Boba Neto

Dr. Luiz Carlos Latorre

Dr. Alexandre Wagner Silva de Souza

Dedicatória

Aos meus pais, responsáveis por quem me tornei. São minha alma e minha consciência.

Ao meu amor, por toda paciência e companhia e por me fazer rir nos momentos mais estressantes.

Aos meus irmãos, por serem sempre meus melhores amigos.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom de minha vida, pela saúde e força para trabalhar e pela inspiração diária.

À Profª Dra. Emilia Inoue Sato, por ter ensinado, com paciência e paixão, teoria , prática e postura médica e acadêmica. É uma honra fazer parte de sua convivência e é um exemplo a ser seguido.

Ao médico Luiz Machado pela avaliação e coleta dos pacientes e pelo apoio incondicional.

Ao Dr. Alexandre Wagner Silva de Souza pela amizade e pelo ensinamento durante a residência médica e a pós-graduação.

À mestra Maria Izabel Arismendi pela ajuda fundamental na orientação das técnicas de cultura celular e citometria de fluxo e também à biomédica Vanessa Ferreira pela colaboração no laboratório.

Aos meus queridos amigos de residência médica em reumatologia, Ana Letícia, Daniele Freitas, Vanessa Miranda, Natália Machado, Cintia Camargo e Fernando Vilela, por tornarem a residência tão prazerosa e estimulante.

Aos colegas do grupo de doenças autoimune pelo apoio, pela amizade e pelas discussões científicas de alto nível : Edgard, Frederico, Céu, Henrique e Roberto.

Aos funcionários do Laboratório de Reumatologia da UNIFESP, em especial Maria Teresa Costa pela grande ajuda na coleta de sangue das participantes do estudo.

Aos funcionários da Disciplina da Reumatologia pelo suporte administrativo durante todo projeto : Rita de Souza , Patrícia Pontes e Joaquina.

A todos que fazem parte do Programa de Medicina Translacional.

À Dra. Neusa Pereira da Silva pelos ensinamentos em relação às técnicas e procedimentos laboratoriais.

Ao setor de Lípides da Disciplina de Cardiologia da UNIFESP, onde foram realizados os exames de avaliação da função endotelial, em especial ao Dr. Francisco Helfenstein, Dr. Carlos Manoel Monteiro e Luciano Monteiro.

Aos meus sogros e minhas cunhadas: Samuel, Maria Luiza, Beatriz e Carolina por terem tornado minha vida em São Paulo mais acolhedora e familiar.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo apoio financeiro , tronando possível a realização deste estudo - processo número 2011/056997.

“A dúvida não é uma condição agradável, mas a certeza é absurda”.

Voltaire

SUMÁRIO

Dedicatória----------v
Agradecimentos----------vi
LISTA DE FIGURAS----------xii
LISTA DE TABELAS----------xiii
LISTA DE ABREVIATURAS----------xiv
Resumo----------xvi
1.INTRODUÇÃO----------01
1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico----------02
1.2 Endotélio e sua função----------03
1.3 Avaliação da função endotelial ----------04
1.4 Células progenitoras endoteliais----------05
1.5 EPCs, função endotelial e ramipril----------06
2.OBJETIVOS----------08
2.1 Objetivo geral----------09
2.2 Objetivos específicos----------09
3.MÉTODOS----------10
3.1 Critérios de inclusão----------11
3.2 Critérios de não inclusão/exclusão----------11
3.3 Desenho de estudo----------12
3.4 Avaliação dos pacientes ----------12
3.5 Exames laboratoriais----------12
3.6 Exames para avaliação geral e atividade da doença----------12
3.7 Avaliação de função endotelial----------13
3.8 Reprodutibilidade da ultrassonografia da artéria braquial com VMF----------14
3.9 Quantificação das células progenitoras endoteliais----------14
3.10 Análise estatística----------21
4.RESULTADOS----------24
4.1 Características demográficas----------26
4.2 Medicações----------27
4.3 Avaliação da função endotelial----------28
4.4 Quantificação de EPCs monocíticas----------29
4.5 Quantificação de EPCs hemangioblásticas----------29
4.6 Viabilidade celular na citometria----------30

4.7 Efeitos colaterais----------30
4.8 Análise do SLEDAI ----------30
4.9 Análise de dados clínicos laboratoriais----------30
5.DISCUSSÃO----------31
6.CONCLUSÕES----------35
7.REFERÊNCIAS----------37
8.ANEXOS----------46
ABSTRACT----------56
FONTES CONSULTADAS ----------57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.Fotomicrografia de cultura de células progenitoras endoteliais de um paciente ----------17

Figura 2. Análise da citometria de fluxo das EPCs de uma amostra de um paciente---21

Figura 3. Fluxograma com a abordagem dos pacientes----------24

Figura 4. Perfil dos fatores de não-inclusão----------25

Figura 5. Composição dos Grupo Intervenção e Grupo Controle----------26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clinicas, demográficas e níveis de LDL colesterol do Grupo Controle e Grupo Intervenção----------26

Tabela 2: Medicações usadas pelo Grupo Controle e Grupo Intervenção no início do estudo----------27

Tabela 3. Vasodilatação mediada pelo fluxo nos tempos zero e após 12 semanas no Grupo Controle e Grupo Intervenção----------28

Tabela 4. Vasodilatação mediada por Nitroglicerina nos tempos zero e após 12 semanas no Grupo Controle e Grupo Intervenção----------28

Tabela 5. - Número unidades formadoras de colônias no Grupo Controle e Grupo Intervenção nos tempos zero e apos 12 semanas----------29

Tabela 6. Número de EPCs, quantificados por citometria de fluxo no Grupo Controle e Grupo Intervenção no início e após 12 semanas----------29

Tabela 7. SLEDAI no Grupo Controle e Grupo intervenção----------30

LISTAS DE ABREVIATURAS

ACR ➔American College of Rheumatology

Anti-KDR ➔Anti-*Kinase insert Domain Recept*or

AR ➔Artrite reumatoide

BRA ➔Bloqueador do Receptor de Angiotensina

DAC ➔Doença Arterial Coronariana

DCV ➔Doença Cardiovascular

Dil-ac-LDL➔*1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine percholorate-labeled acetylated low-density lipoprotein*

DLP➔ dislipidemia

DM➔diabetes mellitus

DMEM➔meio Dulbecco modificado por Eagle

DMSO➔dimetilsulfóxido

DP ➔Desvio padrão

ELISA ➔*enzyme-linked immunosorbent assay*

EDTA ➔ ácido etilenodiaminotetracético

EPCs ➔Células Progenitoras Endoteliais

ES ➔esclerose sistêmica

EULAR ➔ liga européia contra reumatismo

EUSTAR ➔ Grupo de estudo de pesquisa clínica em escleroderma do EULAR

FITC ➔ isotiocianato de fluoresceína

FITC-UEA-1 ➔ *fluorescein isothiocyanate-conjugated Ulex europaeus agglutinin type I*

FMO ➔ fluorescência menos um

FSC ➔ dispersão frontal

GM-CSF ➔Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos

HAS➔ hipertensão arterial

HDL➔ lipoproteína de alta densidade

IECA ➔Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina

IFN-γ ➔interferon gama

IL➔Interleucina

IMC ➔Índice de Massa Corpórea

KDR➔ *kinase insert domain receptor*

LDL ➔lipoproteína de baixa densidade

LES ➔Lupus Eritematoso Sistêmico

MHz ➔Megahertz

mm. ➔ milímetros

PE➔ ficoeritrina

PerCP➔proteína clorofila peridinina

PBMC ➔Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS➔salina tamponada com fosfato

Pg/mL➔ picograma por mililitro

RPM ➔Rotação Por Minuto

SFB➔ soro fetal bovino

TCLE➔ termo de consentimento livre e esclarecido

TNF ➔ sigla em inglês para fator de necrose tumoral

VEGF ➔ fator de crescimento derivado do endotélio

VMF ➔Vasodilatação Mediada pelo Fluxo

VMN ➔Vasodilatação Mediada pela Nitroglicerina

UFC ➔Unidade Formadora de Colônia

UNIFESP➔ Universidade Federal de São Paulo

US ➔Ultrassom

µL➔ microlitros

7 AAD➔ 7-Aminoactinomicina D

Resumo

Introdução: As doenças cardiovasculares (DCV) são causa de morbimortalidade no LES. A disfunção endotelial e o número reduzido de células progenitoras endoteliais (EPCs) são alguns dos fatores que contribuem para o aumento dos eventos coronarianos nos pacientes com LES. Em pacientes com doença coronariana, o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), como o ramipril, mostrou redução da morbimortalidade cardiovascular. Não há estudo que tenha avaliado o efeito do ramipril sobre a função endotelial e EPCs em pacientes com LES. **Objetivos:** Avaliar o efeito do ramipril sobre a função endotelial e o número de EPCs. **Métodos:** 41 pacientes com LES (>18anos) e sem fatores de risco cardiovascular, foram divididas randomicamente em 2 grupos: grupo intervenção (GI) que recebeu 10mg/dia de ramipril por 12 semanas e grupo controle (GC), sem intervenção. A função endotelial foi avaliada através de ultrassonografia da artéria braquial, com medidas da vasodilatação mediada pelo fluxo (VMF) e vasodilatação induzida pela nitroglicerida (VMN) nos tempos zero e após 12 semanas. As EPCs foram quantificadas por citometria de fluxo e cultura celular. **Análise estatística:** Foi utilizado o programa *SPSS for Windows* versão 17 (*SPSS Inc*). Os dados foram apresentados como média e desvio-padrão. A análise foi intent to treat . Foi utilizado o teste *t de Student* para variáveis com distribuição normal e o teste exato de Fisher para variáveis categóricas. O ANOVA de medidas repetidas foi usado para a comparação intragrupo e intergrupos. Valor de $p<0,05$ foi considerado significante. **Resultados**: 37 pacientes com LES foram randomizados, 18 no GI e 19 no GC. Todos os pacientes foram do sexo feminino. Não houve diferença nas características basais entre os dois grupos em relação a idade, duração de doença, pressão arterial, níveis de LDL colesterol, IMC, VMF , uso de imunossupressores e SLEDAI. Houve aumento significativo da VMF no GI (6.17±4.18% vs 11.14±5.4%, $p<0.001$), sem diferença no GC (5.37±3.91% vs 5, 02±3.62%, $p=0.630$), após 12 semanas. Foi observado aumento do número de unidades formadoras de colônia de EPCs no GI (21.3±10.4 vs 31.6±8.5, $p<0.001$), sem diferença no GC (24.8±13.5 vs 25.8±11.6, $p=0.714$). Não houve diferença em relação ao número de EPCs quando avaliadas por citometria de fluxo no GI (0.013±0.025 vs 0.02±0.03 $p=0.734$) e no GC (0.0175±0.024 vs 0.012±0.016, $p=0.734$).**Conclusão**: O ramipril melhorou a função endotelial e aumentou o número de EPCs avaliadas por cultura celular de pacientes com LES e sem fatores de risco cardiovascular.

1.INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

O LES é uma doença inflamatória que acomete múltiplos sistemas, caracterizada por produção de autoanticorpos, depósitos de complexos imunes teciduais e amplo espectro de manifestações. Sua patogênese, provavelmente, resulta da interação de fatores ambientais dentro de um contexto de susceptibilidade genética(1). Com a melhora do tratamento houve mudança no padrão da mortalidade (2), reconhecido desde 1976 como uma curva bimodal, onde a mortalidade precoce é devida a atividade da doença ou infecção, e a tardia, principalmente por doença cardiovascular (DCV) (3). Em países desenvolvidos, 30% dos óbitos de mulheres com LES são causados por doença arterial coronariana (DAC) (4). A taxa de infarto do miocárdio nestas pacientes, com idade entre 35 a 44 anos, é cerca de 52 vezes maior que a observada no estudo de Framinghan (5) e a incidência anual de cardiopatia isquêmica no LES é estimada em 1,3% a 1,5% (6).

Métodos não invasivos têm sido usados para o estudo de aterosclerose subclínica no LES. Avaliações com ultrassom (US) de carótidas detectaram placas em 37 a 50% dos pacientes com esta doença, e, a maioria não encontrou associação apenas com fatores de risco tradicionais para DAC (7-9). Mais de 30% das pacientes com LES apresentaram anormalidades de perfusão miocárdica em estudos de cintilografia e SPECT (tomografia computadorizada com emissão fotoacústica marcada com dipiridamol) (10,11). Lima *et al* e El-Magadmi *et al* através de estudos com US de artéria braquial mostraram que pacientes com LES apresentam menor vasodilatação mediada pelo fluxo (VMF), independente da presença de fatores de risco tradicionais para doença aterosclerótica (12,13).

Pacientes com LES têm elevada prevalência de fatores de risco tradicionais como hipertensão arterial, *Diabetes mellitus*, menopausa precoce e maiores níveis séricos de triglicérides, que contribuem para o desenvolvimento de DAC, quando comparado com controles (14,15). Contudo, estes fatores não explicam por si só, a precocidade da aterosclerose e suas conseqüências, nesses pacientes (16,17).

Fatores intrínsecos ao LES parecem contribuir para a disfunção endotelial e o aumento do risco de DCV (16). Alguns desses fatores são: a proteína C reativa , fibrinogênio, interleucina-6 , anticorpos antifosfolípides, anti-β2-glicoproteina-I, anticorpo antilipoproteína

de baixa densidade oxidada (anti-LDL-ox), anti-*heat shock protein*, fatores de coagulação anormais (como inibidor do ativador de plasminogênio), homocisteína e lipoproteínas (13,18).

Recentemente alguns estudos têm mostrado também que a diminuição do número de células progenitoras endoteliais (EPCs) observada nos pacientes com LES pode ter um importante papel na disfunção endotelial (19,20).

1.2 Endotélio e sua função

O endotélio, que era considerado apenas uma barreira física entre o sangue e os tecidos subjacentes, apresenta múltiplas e complexas funções, sendo essencial para a manutenção da homeostase vascular. As células endoteliais são capazes de detectar mínimas alterações na pressão arterial, no fluxo sanguíneo, no sistema de coagulação e no sistema imune/inflamatório (21,22). As células endoteliais também são responsáveis pela síntese de diversas substâncias com ação vasodilatadora e antiadesiva plaquetária, como a prostaciclina, fator hiperpolarizador derivado do endotélio e o óxido nítrico (NO), e, de substâncias com ação vasoconstrictora, como a endotelina-1, a prostaglandina H2 e o tromboxano. Além disso, controlam a adesão e migração de leucócitos através do vaso (pela expressão de ICAM - intercellular adhesion molecule-1 e VCAM - vascular cell adhesion molecule) e são fonte de fator de Von Willebrand, de ativador tissular de plasminogênio e do inibidor-1 do ativador do plasminogênio (23). Através da síntese destas substâncias, o endotélio saudável assegura o balanço entre fatores pró-trombóticos e anticoagulantes e mantém o tônus vascular, controlando o fluxo sangüíneo e a pressão arterial (24, 25, 26).

A disfunção endotelial caracteriza-se por incapacidade de relaxamento dos vasos arteriais em resposta a diferentes estímulos que levam à liberação de NO (vasodilatação dependente do endotélio). Entretanto, são capazes de dilatar sob a ação da nitroglicerina, um vasodilatador que atua diretamente no músculo liso vascular (vasodilatação independente do endotélio) (27).

Em 1980, Furchogott e Zawadzki (28) demonstraram que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina foi dependente da presença do endotélio e evidenciaram que este efeito foi mediado por um fator humoral lábil, conhecido como fator de relaxamento dependente do endotélio, que depois foi demonstrado ser um radical livre, o óxido nítrico.

A integridade do endotélio pode ser afetada por tabagismo, dislipidemia, senilidade, hipóxia, *Diabetes mellitus*, arteriosclerose, hipertensão arterial e por doenças que cursam com processos inflamatórios sistêmicos (39). Já foi referido que o uso de algumas drogas, como estatinas, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor de angiotensina (BRA) e aspirina melhoram a função endotelial em pacientes com hipertensão arterial e DAC (30). Foi demonstrado que o uso de estatinas em pacientes com LES também promove benefícios à função endotelial (31). Um estudo já demonstrou que o uso de IECA melhorou a função endotelial em pacientes com artrite reumatoide (AR), normotensos e sem doença coronariana (32).

1.3 Avaliação da função endotelial

Existem vários métodos para avaliação da função endotelial, incluindo a angiografia de artérias coronárias ou dos membros com avaliação do diâmetro do vaso em resposta a injeção de acetilcolina ou metacolina; pletismografia, que é a medida do volume sangüíneo em uma região; e a ultrassonografia da artéria braquial com avaliação da VMF (33).

US da artéria braquial com avaliação da VMF é um dos métodos mais utilizados para avaliação da função endotelial em estudos clínicos. A função dependente do endotélio é avaliada através da liberação de NO em resposta ao aumento do fluxo e ao *shear stress*, resultando em vasodilatação, podendo ser medida como índice de função vasomotora (34,35). A função independente do endotélio é avaliada através da resposta ao efeito direto do NO no vaso que pode ser obtida através da administração de nitrato (34,35). Trata-se de método barato, não invasivo, seguro e rápido, embora tenha a desvantagem de ser operador-dependente e requerer cooperação do paciente (33).

O valor preditivo da VMF da artéria braquial para predizer disfunção endotelial coronariana aferida pelo fluxo sangüíneo coronariano é de 95%, sugerindo ser disfunção endotelial um fenômeno sistêmico (34).

1.4 Células progenitoras endoteliais

As EPCs são uma pequena subpopulação das células mononucleares, com frequência variando entre 0.01%–0.0001% das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), quando avaliadas por citometria de fluxo (36, 37). As EPCs são recrutadas para os sítios de

dano vascular e vão contribuir para a manutenção e o reparo do endotélio (38), contribuindo para a reperfusão do tecido isquêmico (38,39). A mobilização das EPCs é regulada positivamente por determinadas citocinais angiogênicas, principalmente, pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), após evento isquêmico ou trauma vascular (40).

Existem dois tipos principais de EPCs, com diferentes origens e morfologias, ambos com capacidade de reendotelização e neovascularização. O primeiro tipo é constituído por células provenientes da medula óssea, um subtipo das células progenitoras hematopoiéticas, denominadas EPCs hemangioblásticas e são quantificadas através da citometria de fluxo. Segundo orientação do grupo de estudo clínico de esclerodermia do EULAR (EUSTAR) são consideradas EPCs as células simultaneamente marcadas por três anticorpos: anti-CD34, anti-CD133 e anti-*Kinase insert Domain Recepto*r(anti-KDR) (41).

O segundo tipo de EPC é constituído por células derivadas de monócitos $CD14^+$ diferenciados e são denominadas EPCs monocíticas. Diferentemente das EPCs hemangioblásticas, estas células são avaliadas por sua capacidade em se diferenciar e proliferar precocemente na presença de fatores de crescimento endotelial, sendo quantificadas pelo número de unidades formadoras de colônias (UFCs). (41,42,43).

Recentemente foi proposto que, em seres humanos saudáveis, os níveis de EPCs circulantes sejam um marcador da função endotelial (44,45). As EPCs melhoram a resposta endotelial, inibem a progressão da aterosclerose e aumentam a função ventricular após infarto agudo do miocárdio (IAM) (46). Baixos níveis de EPCs circulantes têm sido considerados, além de marcador de disfunção endotelial, um importante fator de risco para DCV (44).

Algumas situações alteraram o número e a função das EPCs, como a idade, alguns medicamentos e determinadas doenças. Em relação à idade, quanto mais avançada, menor o número e função das EPCs (47). Os fatores de risco cardiovasculares tradicionais, como hipertensão arterial, *Diabetes mellitus*, altos níveis de LDL, tabagismo e insuficiência renal terminal também estão associados a redução do número e função das EPCs.(48-52).

Por outro lado, o estrógeno aumenta o número e a função destas células, tanto *in vitro*, como *in vivo* (53, 54). Além disso, algumas drogas como glitazonas, IECAs e estatinas têm demonstrado aumentar o número de EPCs circulantes ou melhorar sua migração, em pacientes com DCV (55,56,57).

O exercício físico também parece aumentar os níveis de EPCs, bem como aumentar sua capacidade proliferativa e diminuir sua apoptose. (46,58).

Em relação às doenças reumáticas, existem estudos que demonstraram que na AR há aumento das EPCs na sinóvia, responsável pela neovascularização do pannus (59), em contraste com a depleção destas células no sangue periférico (60). Além disso a redução dos níveis de EPCs foi correlacionada com atividade da doença e altos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), com melhora após terapia anti-TNF (60). Na esclerose sistêmica dois estudos encontraram resultados conflitantes (61,62).

Moonen et al (63), em 2007 referiram significativa redução do nível de células CD34+/CD133+ em pacientes com LES quando comparadas com mulheres sadias. As UFCs também foram significativamente reduzidas nas pacientes com a doença.

Westerweel et al (20), em 2007, estudando pacientes com LES em remissão encontraram menores níveis de células tronco hematopoiéticas (HSC) e EPCs quando comparado aos controles saudáveis, o que poderia contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose precoce nesta doença.

Lee et al (19), em 2007, comparando pacientes com LES e controles saudáveis concluíram que havia redução significativa das EPCs nos pacientes e que a maior expressão de interferon tipo I foi preditor independente de depleção das EPCs e de disfunção endotelial.

Grisar et al em 2008 (64) demonstraram que embora o número de EPCs nas pacientes com LES não fosse reduzido quando comparados aos controles saudáveis, a função (capacidade de adesão e migração) destas células estava significantemente comprometida.

1.5 EPCs, função endotelial e ramipril

Ramipril é um IECA que inibe a conversão da angiotensina I em angiotensina II e também impede a inativação da bradicinina (65).

Os estudos, Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) e o European Trial on Reduction of Cardiacs Events With Perindopril in Stable Coronary Artery Disease (EUROPA), mostraram a efetividade dos IECA, como o ramipril e o perindopril, na redução da morbidade e mortalidade de DCV em pacientes com doença estabelecida ou de alto risco

cardiovascular (66,67). Interessantemente, os benefícios mostrados nestes estudos foram além do esperado apenas pelo efeito hipotensor destas drogas (32).

Os IECA também estão associados à redução da atividade vascular do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e das espécies reativas de oxigênio, redução da ativação de importantes vias de sinalização intracelular e a melhora da fibrinólise e da função endotelial, contribuindo para redução da progressão da aterosclerose (68-70).

Apesar de estar estabelecido na literatura que pacientes com LES apresentam disfunção endotelial e menor número de EPCs, não há trabalho avaliando o efeito dos IECAs na função endotelial e no número de EPCs nestes pacientes.

2.OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral: Avaliar o efeito do ramipril sobre a função endotelial em pacientes com LES.

2.2 Objetivos específicos: Avaliar o efeito do ramipril sobre o número de EPCs hemangioblásticas e monocíticas em pacientes com LES.

3.MÉTODOS

3. Métodos

Foram convidadas a participar do estudo, pacientes em seguimento regular no ambulatório de Doenças Reumáticas Autoimunes do Hospital São Paulo/UNIFESP, segundo os critérios de inclusão e exclusão.

3.1 Critérios de inclusão

1) Preencher pelo menos 4 critérios para classificação de LES do Colégio Americano de Reumatologia de 1982, modificado em 1997 (ANEXO 1)

2) Idade acima de 18 anos

3) Medicamentos para o tratamento de LES estáveis há pelo menos 3 meses

4) Assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido

3.2 Critérios de não inclusão/exclusão

1) Pacientes com doença coronariana comprovada

2) Uso de estatinas ou de IECA nos últimos 6 meses

3) Uso de ciclofosfamida nos últimos 6 meses

4) Hipertensão arterial (PA sistólica > 140 mmHg ou diastólica >90 mmHg) ou uso de anti-hipertensivo

5) Creatinina ≥ 1,4 mg/dl

6) *Diabetes mellitus* – Glicemia de jejum ≥ 126mg/dl em duas ocasiões ou glicemia casual ≥ 200mg/dl quando acompanhada de sintomas clássicos ou uso de hipoglicemiante (*American Association of Clinical Endocrinologists*)

7) Colesterol de baixa densidade (LDL) >149 mg/dL

8) Tabagismo nos últimos 12 meses

9) Gravidez

10) Menopausa – última menstruação espontânea há mais de um ano e/ou uso de terapia de reposição hormonal e/ou irregularidade menstrual ou amenorréia há menos de um ano, confirmada por dosagem de FSH >40 UI/L

11) História de angioedema

3.3 Desenho de estudo

O estudo foi controlado, prospectivo e randômico.

Os pacientes com LES que aceitaram participar do estudo foram alocados aleatoriamente, através de tabela de randomização computadorizada, em um dos grupos:

- Grupo Intervenção (GI): os pacientes receberam ramipril 10mg/dia por 12 semanas (5mg/dia por 2 semanas e depois 10 mg/dia por mais 10 semanas).

- Grupo Controle (GC): controle, sem uso do ramipril.

Para assegurar a adesão dos pacientes ao protocolo e averiguar possíveis efeitos colaterais, foram realizados contatos telefônicos com os pacientes após 2ª e 6ª semanas do início do estudo. O tratamento do LES continuou sendo realizado pelo médico responsável pelo seguimento do paciente.

3.4 Avaliação dos pacientes

Todas as avaliações foram realizadas nos tempos zero e após 12 semanas

Os dados demográficos e relativos à doença foram anotados em uma ficha protocolo (Anexo 1,2,3) e armazenados em banco de dados no programa *Microsoft Office Excel 2007*.

3.5 Exames laboratoriais

Foram coletados 30 ml de sangue periférico para a realização dos exames para avaliação da atividade da doença, quantificação e cultura de EPCs. A cultura de células foi feita logo após a coleta e o soro foi guardado a -70º C.

3.6 Exames para avaliação geral e atividade da doença:

Os seguintes exames foram realizados no Laboratório Central do Hospital São Paulo segundo as técnicas de rotina: hemograma, velocidade de hemossedimentação, creatinina, glicemia, dosagem de colesterol e frações e triglicérides (após jejum de 12 horas) e exame do sedimento urinário (Urina tipo I) e fizeram parte da avaliação de rotina destes pacientes.

A pesquisa de anticorpo anti-DNA foi realizada através da imunofluorescência indireta utilizando a *Chritidia luciliae* como substrato, e as dosagens de CH100 e C2 foram realizados através da técnica de imunohemólise radial, segundo rotina do laboratório de Imuno-Reumatologia da UNIFESP/Hospital São Paulo.

3.7 Avaliação de função endotelial

A função dependente e independente de endotélio foi avaliada no início do estudo e após 12 semanas, através de US da artéria braquial. Os exames foram realizados por profissional experiente e utilizando aparelho de US de alta resolução (*Hewlett Packard* modelo *Image Point*®, USA) e transdutor linear de 7,5 mHz, com avaliação da VMF. Para avaliação da função independente do endotélio foi utilizada nitroglicerina sublingual na dose de 0,4mg, exceto nos pacientes que apresentarem alguma contraindicação à administração da nitroglicerina.

Os pacientes foram orientados a ficar em jejum de 12 horas e sem medicações vasoativas por quatro meias vida ou 12 horas antes do estudo. O exame foi realizado em sala tranquila com controle de temperatura e após 10 minutos de descanso. Os pacientes foram colocados em posição supina e a artéria braquial foi localizada cerca de 7 cm acima do epicôndilo medial. As imagens foram gravadas para medidas de velocidade de fluxo e do diâmetro basal arterial. Posteriormente, o esfigmomanômetro foi posicionado no antebraço e insuflado até uma pressão de pelo menos 50 mmHg acima da pressão sistólica, durante 5 minutos para induzir hiperemia reativa e aumento de fluxo. Quarenta e cinco a 60 segundos após a desinsuflação do manguito foram capturadas imagens para as medidas de velocidade de fluxo e do diâmetro arterial. Após repouso de 15 minutos foram adquiridas novas imagens para medidas basais (fluxo e diâmetro) e administrado 0,4mg de nitroglicerina sublingual com novas medidas após 4 minutos. As diferentes fases do exame foram gravadas em CD para posterior análise por examinador experiente, que desconhecia a etapa do exame e o grupo a qual pertencia a paciente.

A porcentagem da VMF (VMF%) e da VMN (VMN%) foram calculadas segundo as fórmulas abaixo:

$$\text{VMF\%} = \frac{\text{Diâmetro após aumento do fluxo} - \text{Diâmetro de base}}{\text{Diâmetro de base}} \times 100$$

$$VMN\% = \frac{\text{Diâmetro após nitroglicerina} - \text{Diâmetro de base}}{\text{Diâmetro de base}} \times 100$$

3.8 Reprodutibilidade da ultrassonografia da artéria braquial com VMF

Para avaliar a reprodutibilidade do método, oito indivíduos saudáveis foram avaliados pelo mesmo examinador, por duas vezes, com intervalo de uma semana.

Foi aplicado teste t-Student para comparação de médias do diâmetro basal (mm), diâmetro da hiperemia (mm) e da VMF (%). Nas duas aferições, não houve diferença entre os diâmetro de base (3,35±0,63mm vs 3,45±0,62mm; p=0,753), diâmetro da hiperemia (3,74±0,56mm vs 3,95±0,70mm; p=0,513) e na VMF (12,6±7,7% vs 14,8±5,9%; p=0,522).

Para avaliação da variância, foi aplicado o teste de Levene. Nas duas aferições, não houve diferença entre os diâmetros de base (p=0,915), diâmetro da hiperemia (p=0,757) e na VMF (p=0,568).

3.8.1 Variabilidade intraobservador do diâmetro de base:

Coeficiente de correlação intra-classe (CCI) = 0,896 (95% de intervalo de confiança, 0,639 a 0,973, p<0,001). Coeficiente de variação = 4,4%

3.8.2 Variabilidade intraobservador do diâmetro da hiperemia:

Coeficiente de correlação intra-classe (CCI) = 0,838 (95% de intervalo de confiança, 0,388 a 0,965, p=0,002). Coeficiente de variação = 4,4%

3.9 Quantificação das células progenitoras endoteliais

Foram quantificados os dois tipos principais de EPCs: monocítica e hemangioblástica, através de cultura celular e citometria de fluxo, respectivamente.

3.9.1 Isolamento de células progenitoras endoteliais e ensaio de formação de colônias:

Este protocolo de cultura celular foi desenvolvido no laboratório da Disciplina de Reumatologia da UNIFESP/Hospital São Paulo, baseado nas orientações do EUSTAR (41) e

seguindo as recomendações do fabricante do meio de cultura Endocult (Stemcell Technologies, Washington, Estados Unidos).

Protocolo de avaliação das EPCs por cultura de células:

1. Coletado 10 mL de sangue venoso em tubo com EDTA (BD - Becton Dickinson , California, Estados Unidos) de cada participante do estudo;

2. Preparado uma diluição 1:1 utilizando 10 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) em tubo cônico de 50 mL e homogeneizar;

3. Acrescentado, cuidadosamente, 10 mL do sangue diluído a um tubo cônico de 15 mL contendo 5 mL de Ficoll-Paque Plus com densidade de 1.077g/mL (GE Heathcare, Uppsala, Suécia).

4. Centrifugado os tubos por 30 minutos a 1500 RPM (rotações por minuto). Após centrifugação foram observadas quatro camadas distintas: a) camada inferior, composta de eritrócitos e polimorfonucleares; b) camada transparente, constituída pelo reagente Ficoll-Paque Plus; c) camada estreita de coloração branca e fosca, composta por células mononucleares do sangue periférico (PBMC), posicionada acima da camada transparente; d) camada amarelada, constituída por plasma, localizada na região superior do tubo;

5. Aspirado a camada branca fosca e colocá-la em um tubo cônico de 15 mL completando o volume para 15 mL com PBS para realização de lavagem;

6. Centrifugado por 15 minutos a 1500 RPM;

7. Descartado o sobrenadante, suspenso o *pellet* em PBS completado o volume para 15 mL para nova lavagem;

8. Centrifugado por 15 minutos a 1500 RPM;

9. Descartado o sobrenadante e suspenso o *pellet* constituído por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em 1 mL de meio de cultura específico para cultivo de células endoteliais preparado conforme descrito posteriormente.

10. Realizado contagem celular da suspensão de células na câmera de Neubauer para obtenção da concentração celular desejada. A contagem foi realizada em dois quadrantes dispostos de maneira oposta na câmara de Neubauer, em seguida a média dos dois quadrantes foi calculada. O número obtido foi multiplicado pelo volume da suspensão de células (1), pelo

fator de correção da câmara de Neubauer (10.000) e pelo fator de diluição do azul de tripan (10);

11. Distribuido 2 mL de meio de cultura específico para cultivo de células endoteliais em cada poço da placa revestida com fibronectina contendo 6 poços (BD - Becton Dickinson);

12. Acrescentado $5x10^6$ células da amostra em cada poço da placa. Todas as amostras foram realizadas em duplicata;

13. A placa de cultura foi mantida durante 48 horas em estufa a 37° C em atmosfera contendo 5% de CO_2 e 95 % de umidade;

14. Após a incubação, aspirado e dispensado três vezes o líquido (meio de cultura + células) de forma enérgica, com o auxílio de pipeta Pasteur. As células que permaneceram aderidas foram consideradas células endoteliais maduras, macrófagos e monócitos, sem interesse para o protocolo. Transferido o sobrenadante, que continham as células de interesse para um novo tubo cônico de 15 mL;

15. Realizado nova contagem de células na câmera de Neubauer;

16. Acrescentado $1x10^6$ células em cada poço da placa revestida com fibronectina de 24 poços (BD Becton Dickinson) e completado com meio de cultura para um volume final de 1 mL;

17. A placa de cultura foi mantida na estufa durante 72 horas nas mesmas condições anteriores de cultivo;

18. Ao término das 72 horas, aspirado e devolvido delicadamente o líquido de cada poço da placa, desprezando-o em seguida com o auxílio de pipeta Pasteur;

19. Adicionado 1 mL de PBS a cada poço, aspirado e devolvido delicadamente o PBS, desprezando-o em seguida com o auxílio de pipeta Pasteur;

20. Acrescentado 300 µL de metanol a cada poço, aguardado 5 minutos, retirado o metanol com pipeta de Pasteur.

21. Acrescentado 300 µL da solução corante Giemsa 1% (EMD Chemicals Inc., New Jersey, Estados Unidos) diluída em água destilada (1:20) e após 2 a 5 minutos, retirado com pipeta Pasteur.

22. Ao término da coloração, lavado a placa diretamente em água corrente e realizada a contagem, das UFCs de EPCs ao microscópio invertido (Olympus, New York, Estados Unidos). As UFCs são caracterizadas por agrupamentos celulares circundados por células alongadas e espiculadas. (figura 1)

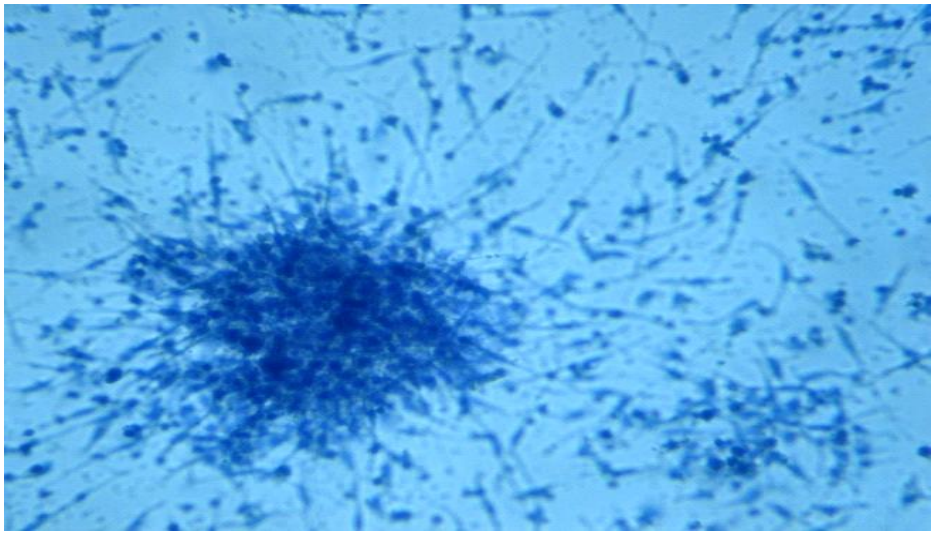


Figura 1: Fotomicrografia de cultura de células progenitoras endoteliais de um paciente, corada com Giemsa 1%, obtida em nosso laboratório, mostrando uma UFC de EPC. Foi utilizado um microscópio invertido (Olympus CK2), aumento de 200 x.

Para o preparo do meio de cultura foi utilizado o meio específico para células endoteliais Endocult (Stemcell Technologies), do seguinte modo:

1. Acrescentado 2 mL de suplemento a cada 8 mL de meio basal

2. Acrescentado 10 µL de solução de antibióticos – Penicilina G + Estreptomicina + Anfotericina B (Invitrogen, Califórnia, Estados Unidos).

3.9.2 Citometria de fluxo:

Este protocolo foi baseado em revisão de estudos de EPCs em doenças reumáticas (41):

A obtenção de PBMC seguiu as etapas 1 a 8 descritas no protocolo de cultura celular, demonstrado anteriormente e procedeu-se ao congelamento das células obtidas conforme descrito a seguir:

1. Congelamento: Ressuspendido o pellet obtido em 1 mL de meio de congelamento contendo: 15 mL de DMSO - Dimetilsulfóxido (Merck Millipore, Massachusetts, Estados

Unidos), 35 mL de meio de cultura DMEM (CULTILAB, São Paulo, Brasil) e 50 mL de soro fetal bovino (CULTILAB). Transferida a suspensão para um criotubo e mantida a -80° C até o descongelamento. Todas as amostras de PBMCs (pacientes e controles) foram mantidas a -80° C por 2 a 6 semanas antes de serem avaliadas por citometria. Para cada participante foi congelado um criotubo

2. Descongelamento: retirado o criotubo do freezer -80ºC, descongelado rapidamente em banho-maria a 37ºC e transferida a suspensão celular para um tubo cônico de 15 mL com 5 mL de PBS contendo soro fetal bovino (SFB) a 2% e azida sódica a 0,01% (Merck Millipore, Massachusetts, Estados Unidos)

3. Centrifugado por 5 minutos a 1500 RPM;

4. Descartado o sobrenadante e suspenso o *pellet* conforme descrito a seguir;

5. Foi realizada a compensação do citômetro antes de cada leitura das amostras testes. Para compensação o *pellet* de PBMCs foi suspenso em 300 µL da solução: PBS + SFB a 2% + azida sódica a 0,01% e distribuído em 10 tubos cônicos de 2 mL:

- Tubo 1 (não marcado): 50 µL da suspensão celular;

- Tubo 2 (contém todos os anticorpos empregados na marcação): 29 µL da suspensão celular + 1 µL de 7 AAD (Southern Biotechnology Associates Inc., Alabama, Estados Unidos) + 10 µL de anti-KDR-APC (R&D Systems, Inc., Minnesota, Estados Unidos) + 5 µL de anti-CD34-FITC (Southern Biotechnology Associates Inc.) + 5 µL de anti-CD133-PE (Miltenyi Biotec, Califórnia, Estados Unidos);

- Tubo 3 (controles isotípicos): 30 µL da suspensão celular + 10 µL de IgG ligado a APC (R&D Systems, Inc.) + 5 µL de IgG ligado a FITC (R&D Systems, Inc.) + 5 µL de IgG ligado a PE (R&D Systems, Inc.);

- Tubo 4 [compensação de fluorescência – fluorescence minus one (FMO) para anti-KDR]: 39 µL da suspensão celular + 1 µL de 7 AAD + 5 µL de anti-CD34-FITC + 5 µL de anti-CD133-PE;

- Tubo 5 (FMO para anti-CD133): 34 µL da suspensão celular + 1 µL de 7 AAD + 10 µL de KDR-APC + 5 µL de anti-CD34-FITC;

- Tubo 6 (FMO para anti-CD34): 34 µL da suspensão celular + 1 µL de 7 AAD + 10µL de KDR-APC + 5 µL de anti-CD133-PE;

- Tubo 7 – anti-CD3 ligado a APC: 25 µL da suspensão celular + 1 µL de anti CD3 ligado a APC (Biolegend, Califórnia, Estados Unidos);

- Tubo 8 – anti-CD3 ligado a FITC: 25 µL da suspensão celular + 1 µL de anti CD3 ligado a FITC (Biolegend);

- Tubo 9– anti-CD3 ligado a PE: 25 µL da suspensão celular + 1 µL de anti CD3 ligado a PE (Biolegend);

- Tubo 10– anti-CD3 ligado a PerCP: 25 µL da suspensão celular + 1 µL de anti-CD3 ligado a PerCP (Biolegend);

6. Para as amostras testes, o *pellet* descongelado foi suspenso em 150 µL da solução: PBS + SFB a 2% + azida sódica a 0,01% e a suspensão celular foi distribuída em 2 tubos cônicos de 2 mL:

- Tubo A: (anticorpos): 29 µL da suspensão celular + 1 µL de 7 AAD + 10µL de anti-KDR-APC + 5 µL de anti-CD34-FITC + 5 µL de anti-CD133-PE;

- Tubo B (controles isotípicos): 30 µL da suspensão celular + 10 µL de IgG ligado a APC + 5 µL de IgG ligado a FITC + 5 µL de IgG ligado a PE;

7. Deixado os tubos no gelo por 40 minutos;

8. Centrifugado os tubos por 5 minutos, a 1500 RPM;

9. Descartado o sobrenadante por inversão vigorosa;

10. Suspenso o *pellet* em 500µL da solução – PBS + 2% de SFB + 0,01% de azida e transferido para tubos de citometria (BD - Becton Dickinson);

11. Realizada a leitura dos tubos no citômetro FACS Canto II (BD Becton Dickinson)

Para cada amostra avaliada foram adquiridos, em média, 450.000 eventos. As análises foram realizadas com programa Flow-Jo na seguinte ordem:

- Primeira etapa: Determinação da população de células linfomonucleares no gráfico FSC x SSC estabelecendo o *gate* desejado;

- Segunda etapa: Determinação das células 7AAD negativas, ou seja, as células viáveis dentro do *gate* de linfomononucleares;

- Terceira etapa: Determinação das células CD34 positivas dentro do *gate* de 7 AAD negativas;

- Quarta etapa: Determinação das células CD133 positivas/KDR positivas dentro do *gate* CD34 positivas;

- Painel final: células linfomononucleares 7AAD negativas/CD34 positivas/CD133 positivas/KDR positivas (Figura 2).

O número absoluto de EPCs foi dividido pela quantidade de células linfomononucleares viáveis (7AAD negativas) e multiplicado por 100, originando a porcentagem das EPCs apresentadas no estudo .

Conforme descrito acima, durante os experimentos de citometria foram utilizadas duas metodologias: a de controles isotípicos e a técnica de *fluorescence minus one* (FMO). Entretanto, após analise no Flow-Jo a metodologia de FMO demonstrou ser mais adequada para a melhor definição das populações celulares, sendo este o método utilizado no estudo.

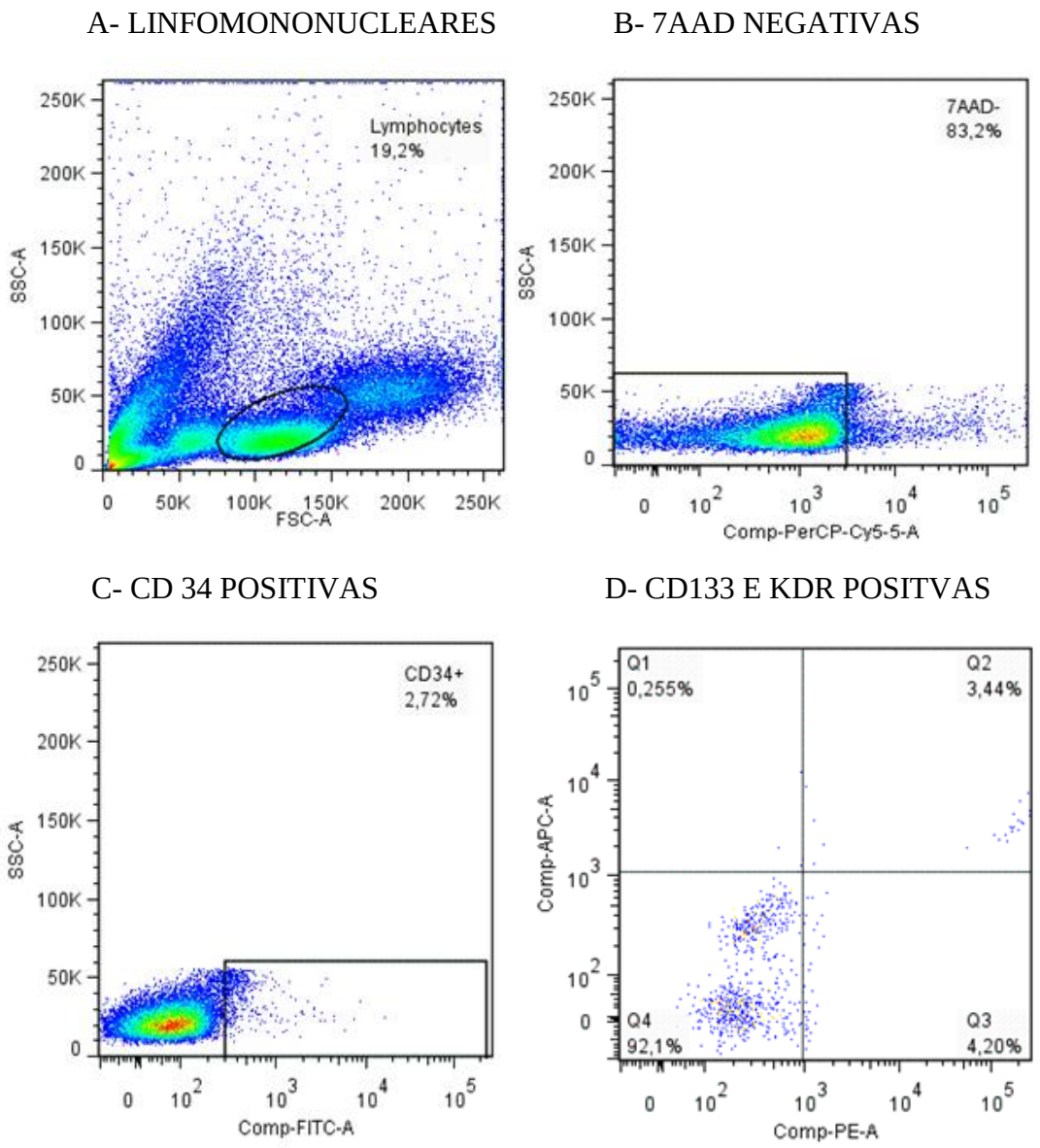


Figura 2**:** Análise da citometria de fluxo das EPCs de uma amostra de um paciente. A: identificação das células linfomononucleares, localizadas no interior do círculo ovalado; B: identificação das células linfomononucleares viáveis (7 AAD negativas), localizadas no retângulo à esquerda; C: identificação das células linfomononucleares viáveis e CD 34 positivas, localizadas no retângulo à direita; D: identificação das células linfomononucleares viáveis, CD 34 positivas e CD133 positivas/KDR positivas**,** localizadas no retângulo superior direito, que correspondem as EPCs.

3.10 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa *SPSS for Windows* versão 17 (*SPSS Inc*). Os dados são apresentados como média e desvio-padrão com intervalo de confiança de 95%. A análise foi realizada considerando os grupos para os quais os pacientes foram inicialmente randomizados (intent to treat). Os dados foram avaliados através de teste de

normalidade e teste de variância. O teste *t de Student* foi utilizado para variáveis com distribuição normal. O teste exato de Fisher foi usado para variáveis categóricas e *o* ANOVA de medidas repetidas para a comparação intra-grupo nos dois tempo e intergrupos. Valor de $p<0,05$ foi considerado significante.

4.RESULTADOS

4. Resultados

A inclusão dos pacientes foi realizada no ambulatório de Doenças Reumáticas Autoimunes da Disciplina de Reumatologia da UNIFESP/EPM.

Foram convidados 243 pacientes para participar do projeto (Figura 3). Na entrevista inicial e após revisão de prontuário foram excluídos 190 pacientes por preencherem pelo menos um dos critérios de exclusão (Figura 4). Dezesseis pacientes não quiseram participar por motivos diversos (não poderem comparecer às coletas, já terem participado de outros estudos ou simplesmente por falta de vontade). Trinta e sete pacientes foram incluídas no estudo e todas assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). (ANEXO 5)

O estudo teve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP/HSP – Protocolo CEP 0869/10. (ANEXO 6)

Figura 3 - Fluxograma com a abordagem dos pacientes

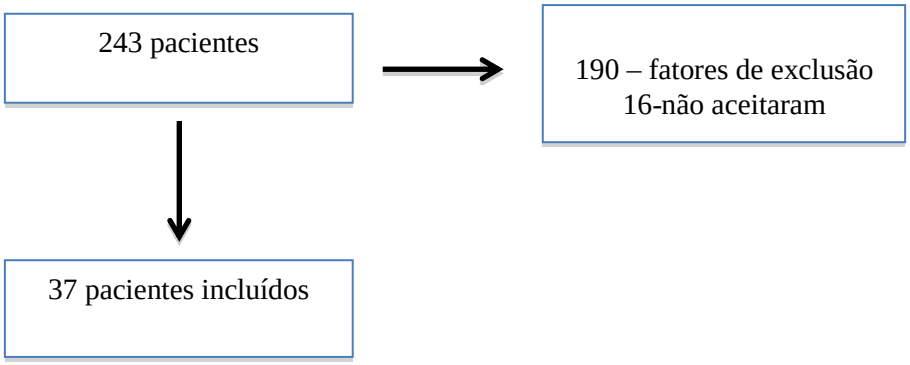


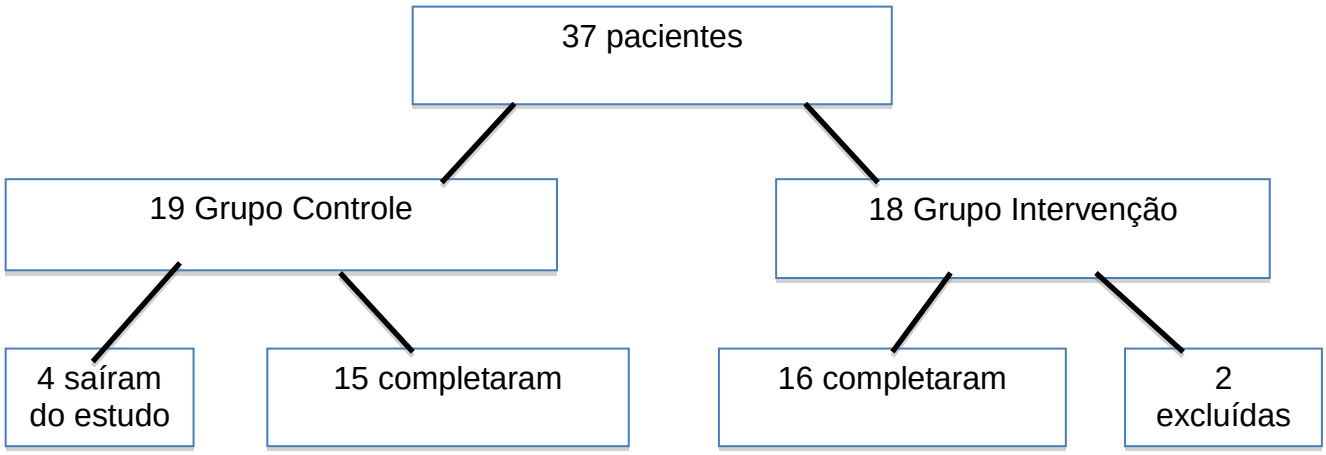
Figura 4- Perfil dos fatores de não-inclusão

HAS= hipertensas e/ou uso de anti-hipertensivos; DM= diabéticas; SAI= superposição com outras doenças autoimunes; IRC= creatinina >1,4 mg/dL; DLP= LDL> 149mg/dL e/ou uso de estatinas; CFA=uso de ciclofosfamida.

As 37 pacientes foram randomizadas. Dezenove pacientes entraram no grupo controle (GC) e 18 no grupo intervençãoo (GI). (Figura 5)

Após randomização e início da coleta 6 pacientes saíram do estudo, sendo dois do GI e quatro do GC. Diversos motivos foram alegados para a saída do estudo. No GC, uma paciente mudou-se do estado de São Paulo e não pode comparecer para a avaliação final, uma paciente perdeu seguimento e outras duas após randomização e avaliação inicial, retiraram o consentimento. No GI, uma paciente teve a doença reativada durante o seguimento e teve suas medicações de base modificadas e outra relatou cefaleia com o uso da medição e quis sair do estudo.

Figura 5 - Composição dos GI e GC



4.1 Características demográficas

As características demográficas basais das pacientes encontram-se na tabela 1. Os dois grupos apresentavam características demográficas e clínicas comparáveis.

Tabela 1 – Características clinicas, demográficas e níveis de LDL colesterol dos GC e GI

	GC (n=19)	**GI (n=18)**	**p**
Sexo feminino	**100%**	**100%**	
Idade (anos)	**34,8 ± 6,7**	**34,1 ± 8,8**	**p=0,793**
Raça B/NB %	**26,3 / 73,7**	**38,9 / 61,1**	**p=0,414**
Tempo de doença (anos)	**8,7 ± 5**	**8,1 ± 6**	**p=0,918**
PAM (mmHg)	**87,1 ± 9,3**	**90 ± 8,7**	**p=0,508**
LDL	**91 ± 23**	**93 ± 24**	**P=0,110**
IMC	**25,5 ± 2,6**	**25,3 ± 3,3**	**p=0,781**
SLEDAI	**1,6 ± 2,6**	**1,4 ± 1,7**	**p=0,802**

B=branco; NB= não branco; PAM=pressão arterial média; IMC= índice de massa corporal

4.2 Medicações

Não houve diferença significativa entre os grupos na porcentagem de pacientes em uso dos diferentes medicamentos relacionados ao LES (Tabela 2). Não houve alteração significativa dos medicamentos após 12 semanas.

Tabela 2 – Medicações usadas pelos GC e GI no início do estudo

	CONTROLE (n=19)	**INTERVENÇÃO (n=18)**	**p**
Hidroxicloroquina (%)	**89,5**	**94,4**	**p=1,00**
Metotrexate (%)	**21,1**	**16,7**	**p=1,00**
Micofenolato (%)	**15,8**	**16,7**	**p=1,00**
Azatioprina (%)	**21,1**	**33,3**	**p=0,476**
Leflunomida (%)	**0**	**5,6**	**p=0,486**
Sulfassalazina (%)	**5,2**	**0**	**p=0,486**
Prednisona ≤ 7,5mg (%)	**31,6**	**22,2**	**p=0,714**
Prednisona >7,5mg (%)	**10,5**	**16,7**	**p=0,660**

4.3 Avaliação da função endotelial

Não houve diferença significativa da VMF entre o GI **(6,17 ± 4,18%)** e GC (**5,37 ± 3,91%**) no tempo zero (T0), mostrando que os grupos eram comparáveis. Após 12 semanas (T12) houve aumento significativo da VMF no GI, sem alteração significativa no GC. (Tabela 3)

Tabela 3 – Vasodilatação mediada pelo fluxo nos tempos zero e após 12 semanas no GI e no GC.

	GC N=19 (VMF%)	**GI N=18 (VMF %)**	**p intergrupo**
T0	**5,37 ± 3,91**	**6,17 ± 4,18**	**p=0,556**
T12	**5,02 ± 3,62**	**11,14 ± 5,4**	**p <0,001**
p intragrupo	**p = 0,630**	**p <0,001**	

A VMN foi semelhante no tempo zero e após as 12 semanas, tanto no GI quanto no GC (Tabela 4).

Tabela 4 – Vasodilatação mediada por Nitroglicerina nos tempos zero e após 12 semanas no GI e no GC.

	GC n=19 (VMN%)	**GI n=18 (VMN %)**	**p intergrupo**
T0	**15 ± 8,7**	**15,6 ± 8,9**	**p=0,482**
T12	**15,6 ± 7,02**	**17,44 ± 8,36**	**p=0,482**
p intragrupo	**p = 0,360**	**p = 0,360**	

4.4 Quantificação de EPCs monocíticas

A quantificação de EPCs através de cultura celular mostrou números comparáveis de UFCs no GI (**21,3 ± 10,4)** e no GC(**24,8 ± 13,5)** no tempo zero. Após 12 semanas, o GI apresentou aumento significativo de UFCs (**31,6 ± 8,5%),** o que não foi observado no GC **(25,8 ± 11,6)** (Tabela 5).

.

Tabela 5- Número unidades formadoras de colônias (UFCs) nos grupos GC e GI nos tempos zero e apos 12 semanas

	GC (UFC)	**GI (UFC)**	**p intergrupo**
TO	**24,8 ± 13,5**	**21,3 ± 10,4**	**p=0,377**
T1 2	**25,8 ± 11,6**	**31,6 ± 8,5**	**p=0,09**
p intragrupo	**p = 0,714**	**p <0,001**	

4.5 Quantificação de EPCs hemangioblásticas

A quantificação de EPCs através da citometria de fluxo, não mostrou diferença significativa entre os grupos no tempo zero e nem intra-grupos, comparando os tempos zero e após 12 semanas (Tabela 6).

.

Tabela 6 – Número de EPCs, quantificados por citometria de fluxo nos grupos GI e GC nos tempos 0 e após 12 semanas de estudo

	GC (%)	**GI (%)**	**p intergrupo**
T 0	**0,017 ± 0,024**	**0,013 ±0,025**	**p=0,785**
T12	**0,012 ±0,016**	**0,020 ±0,030**	**p=0,785**
p intragrupo	**p = 0,734**	**p=0,734**	

4.6 Viabilidade celular na citometria

A média geral da porcentagem de células 7AAD negativas (células viáveis) foi de 84±13%, (80,8±14 no GI e 86±13 no GC) no T0 e 84,9±10% (81,6±11 no GI e 88,1±8% no GC) no T12, não havendo diferença significativa entre os grupos nos dois tempos.

4.7 Efeitos colaterais

Apenas uma paciente do GI referiu sintomas após uso do ramipril, que foi cefaléia. Esta paciente não continuou no estudo.

4.8 Análise do SLEDAI

Todas as pacientes se encontravam fora de atividade, com media de SLEDAI < 2, no início e no fim do estudo. Houve redução significativa do SLEDAI no GC, no T12 (Tabela 7).

Tabela 7- SLEDAI

	GC	**GI**	**p intergrupo**
T0	**1,6±2,6**	**1,4±1,7**	**p = 0,802**
T12	**0,9±1,6**	**1,7±1,7**	**p = 0,178**
p intragrupo	**p = 0,04**	**p=0,215**	

4.9 Análise de dados clínicos laboratoriais

Não houve alteração significativa após 12 semanas, nos dois grupos, na pressão arterial, nos níveis de LDL colesterol e no IMC.

5.DISCUSSÃO

5. Discussão

Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito do ramipril na função endotelial e nas células progenitoras endoteliais em pacientes com LES sem fator de risco tradicional para DCV. Neste estudo foi demonstrado que o uso do IECA (ramipril) por 12 semanas aumentou significativamente a dilatação induzida por aumento do fluxo, mostrando que houve melhora da função endotelial de pacientes com LES. Além disso, os pacientes que usaram ramipril apresentaram aumento significativo no número de unidades formadoras de colônia de EPCs. Este resultado sugere que a melhora da função endotelial observada com o uso de IECA possa estar relacionada também ao aumento do número destas células.

Conquanto a mortalidade geral em pacientes com LES tenha reduzido nas últimas quatro décadas, a mortalidade cardiovascular não tem diminuído com o decorrer do tempo (71,72,73). A ocorrência desses eventos reflete a interação dinâmica entre os fatores de risco específicos e tradicionais para DCV, duração do processo inflamatório e efeitos adversos do tratamento.

A disfunção endotelial é um evento precoce na patogênese da aterosclerose e é demonstrada através da perda de sua propriedade antitrombótica, antiproliferativa, e vasodilatadora (74,75). O método mais frequentemente utilizado para acessar a função endotelial e o escolhido para este trabalho, é a US da artéria braquial através da vasodilatação mediada pelo fluxo(74).

Há evidência que pacientes com LES tenham função endotelial comprometida (12,13,76). No estudo de Lima et al, a média da VMF% destas pacientes foi de 5.0±5.0% enquanto a das controles saudáveis foi de 12.0±6.0% (12). No estudo atual, a média geral da VMF% dos grupos antes da intervenção, foi semelhante ao encontrado anteriormente, ratificando a disfunção endotelial nestas pacientes.

Alguns estudos de intervenção em pacientes com LES, tentaram demonstrar medidas eficazes em melhorar a função endotelial (31,77,78). O uso de estatina e de ômega-3 promoveram aumento significativo da VMF% após 8 e 24 semanas de intervenção, respectivamente quando comparados ao grupo controle (31,77).

Em relação aos IECA, já está estabelecido que seu uso reduz a morbimortalidade cardiovascular em pacientes com doença estabelecida ou com alto risco de DAC (66,67). Este efeito vai além da ação hipotensora desta classe, sendo também associado ao seu potencial em

reduzir o estresse oxidativo, reduzir vias de sinalização e melhorar função endotelial (68,69).

Com relação às doenças reumáticas, foram encontrados dois estudos avaliando o efeito benéfico da IECA na função endotelial, em pacientes com artrite reumatóide. Flammer et al avaliaram o uso de IECA em onze pacientes com AR sem fatores de risco para doença coronariana. Após 8 semanas houve melhora na função endotelial no grupo intervenção (aumento na VMF de 2.85±1.49% para 4.00±1.81%), sem alteração significativa no grupo placebo (de 2.85±1.49% para 2.84±2.47%) (32). Contudo Tikiz et al não encontraram melhora na função endotelial após 8 semanas de quinapril em 15 pacientes com AR (79).

Nosso estudo também demonstrou o efeito benéfico do uso de IECA na função endotelial em pacientes com doença inflamatória autoimune, sem outros fatores de risco para DAC.

As células progenitoras endoteliais são fundamentais no reparo vascular e angiogênse (36) e se relacionam com a função endotelial. Já está comprovado que o menor número de EPCs está relacionado a maior risco cardiovascular em pacientes com DAC estabelecida (80). Muitos estudos foram realizados na tentativa de descobrir os aspectos fisiopatológicos e potencial terapêutico destas células. Contudo, não existe consenso acerca da melhor método a ser empregado para sua quantificação, dificultando a comparação entre os diversos estudos. Optamos por seguir as orientações do EUSTAR, realizando avaliação de EPCs através de citometria e de cultura (41).

A maioria dos estudos em pacientes com LES evidenciou reduzidos níveis de EPCs quando comparados a controles (19,20,63,81,82). Westerweel *et al* (20), demonstraram que mesmo sem atividade da doença, pacientes com LES possuíam menor número de EPCs hemangioblásticas que indivíduos saudáveis.

O número e a função das EPCs podem ser reguladas positivamente por algumas intervenções, como, o uso de estatinas, prática de exercício físico, eritropoietina e glitazona (55,83-85). Em modelos animais submetidos a sobrecarga pressórica, o uso de ramipril demonstrou aumento do número e da mobilização de EPCs, e este aumento esteve associado à melhora no remodelamento cardíaco (56). Estudos prévios avaliaram o uso de IECA ou BRA em pacientes com fatores de risco cardiovascular e demonstraram que o uso dessas drogas promoveram aumento no número de EPCs. (86,87).

Um estudo com doze pacientes com LES demonstrou aumento do número de EPCs após tratamento com imunoglobulina (88). Nenhum estudo até então, havia avaliado o efeito

de ramipril nas EPCs em pacientes com LES.

Neste estudo o número de EPCs monocíticas aumentou significativamente, após intervenção com o rampril. Não houve, contudo, alteração significativa do número de EPCs avaliadas através da citometria de fluxo, que avalia principalmente as EPCs hemangioblásticas.

Em 2005 Bahlmann et al demonstraram em estudo controlado, em pacientes diabéticos, que o uso de BRA aumentou o número de EPCs avaliados através de cultura celular, sem, contudo, ter observado aumento significativo de células hematopoiéticas CD34+ através de citometria de fluxo (86).

O mecanismo pelo qual o uso de IECAs e BRAs aumentam o número de UFCs de EPCs não é totalmente elucidado. Os resultados do presente estudo e o de Bahlmann et al, (86) demonstrando aumento de EPCs em cultura celular, sugere que a ação destes medicamentos seja mais evidente nas EPCs de origem monocíticas.

Os resultados deste estudo nos permite sugerir que o antihipertensivo de escolha para pacientes com LES seja os inibidores da enzima de conversão da angiotensina, pois, além do controle da hipertensão arterial, este grupo de medicamentos demonstrou efeito adicional de melhorar a função endotelial nestes pacientes, podendo assim, reduzir o risco de doença cardiovascular. Não

Estudos adicionais com longo tempo de seguimento são necessários para avaliar o impacto do uso de IECAs na morbimortalidade cardiovascular nos pacientes com LES.

As limitações deste estudo foram:

1- Amostra reduzida, principalmente pela dificuldade de encontrar pacientes que não apresentassem os fatores de não inclusão. Estes foram bem rígidos, com a finalidade de avaliar o efeito do ramipril na disfunção endotelial associada apenas ao LES, e não a outros fatores de risco cardiovascular.
2- Embora o índice de atividade não fizesse parte dos critérios de inclusão/exclusão, como os pacientes tinham que estar com medicação relacionado ao LES estável há pelo menos 3 meses, participaram apenas pacientes com baixos escores de SLEDAI. Dessa forma não foi possível avaliar o uso do ramipril em pacientes com doença ativa.
3- O uso de células congeladas para avaliação de EPC através de citometria, provavelmente não alterou os resultados, pois a viabilidade celular foi maior que 80%.

6.CONCLUSÕES

6. Conclusões

1) O uso do ramipril melhorou a função endotelial de pacientes com LES, demonstrada através do aumento da vasodilatação mediada pelo fluxo

2) Ramipril promoveu aumento significativo do número de EPCs de origem monocíticas, avaliadas através de cultura celular

3) Não houve alteração significativa no número de EPCs hemangioblásticas avaliadas através da citometria de fluxo.

7.REFERÊNCIAS

7. Referências bibliográficas

1. Tutuncu ZN, Kalunian KC. The definition and classification of Systemic Lupus Erythematosus. Dubois' Lupus Erythematosus. 7ª Ed. Filadélfia - EUA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Cap 2, p.16.

2. Kao AH, Sabatine JM, Manzi S. Uptade on vascular disease in systemic lupus erythematosus. Curr Opin Rheumatol. 2003; 15: 519-27.
3. Urowitz MB, Bookman AAM, Koehler BE *et al*. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. Am J Med. 1976;60: 221-5.

4. Aranow C. Ginzler EM. Epidemiology of cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. Lupus. 2000;9:166-9.

5. Manzi S, Meilahn EN, Rairie JE, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framinghan atudy. Am J Epidemiol. 1997;145:408-415.

6. Bruce IN, Gladman DD, Urowitz MB. Premature atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am. 2000;26:257-278.

7. Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, et al. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1999;42:51-60.

8. Roman MJ, Shanker BA, Davis A et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2003;349:2399-406.

9. Souza AWS, Hatta FS, Miranda Jr. F, Sato EI. Atherosclerotic plaque in carotid arteries in systemic lupus erythematosus: frequency and associated risk factors. São Paulo Med J. 2005;123:137-42.

10. Bruce IN, Gladman DD, Ibanez D, et al. Single photon emission computed tomography dual isotope myocardial perfusion imaging in women with systemic lupus erythematosus, II: predictive factors for perfusion abnormalities. J Rheumatol. 2002;30:288-291.

11. Sella EMC, Sato EI, Barbieri A. Coronary artery angiography in systemic lupus erythematosus patients with abnormal myocardial perfusion scintigraphy. Arthritis Rheum. 2003;48:3168-75.

12. Lima DSN, Sato EI, Lima VC *et al*. Brachial endothelial function is impaired in patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 2002;29:292-7.

13. El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y *et al.* Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women. Circulation. 2004;110:399-404

14. Petri M, Perez-Gutthann S, Spence D, Hochberg MC. Risk factors for coronary artery disease in patients with systemic lupus erythematosus. Am J Med. 1992;93:513-9.

15. Bruce IN, Urowitz MB, Gladman DD *et al*. Risk factors for coronary heart disease in women with systemic lupus erythematosus: the Toronto Risk Factor Study. Arthritis Rheum. 2003;48(11):3159-67.

16. Esdaile JM, Abrahamowicz M, Grodzicky T *et al*. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2001;44(10):2331-7.

17. Lee AB, Godfrey T, Rowley KG *et al*. Traditional risk factor assessment does not capture the extent of cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus. Int Med J. 2006;36:237-43.

18. Frostegard J. SLE, atherosclerosis and cardiovascular disease. J Int Med. 2005;257:485-95.

19. Lee PY, Li Y, Richards HB, Chan FS, Zhuang H, Narain S, et al. Type I interferon as a novel risk factor for endothelial progenitor cell depletion and endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2007;56:3759-3769.

20. Westerweel PE, Luijten RKMA, Hoefer IE, Koomans HA, Derksen RHWM, Verhaar MC. Haematopoietic and endothelial progenitor cells are deficient in quiescent systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2007;66:865-870.

21. Michel CC. Capillaries, caveolae, calcium and cyclic nucleotides: a new look at microvascular permeability. J Mol Cell Cardiol. 1998;30:2541-46.

22. Nascimento CA, Patriarca G, Heiman CH. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: Luz PL, Laurindo FR, Chagas ACP. Endotélio & Doenças Cardiovasculares. Editora Ateneu,São Paulo, 2003;1-16.

23. Marsh SA, Coombes JS. Exercise and the endothelial cell. Int J Cardiol. 2005; 99: 165-9.

24. Pearson JD. Normal endothelial cell function. Lupus. 2000;9(3):183-8

25. Lele RD. Causation, prevention and reversal of vascular endothelial dysfunction. J Assoc Physicians India. 2007 Sep;55:643-51.

26. Bijl M. Endothelial activation, endothelial dysfunction and premature atherosclerosis in systemic autoimmune diseases. Neth J Med. 2003 Sep;61(9):273-7.

27. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. Prog. Cardiovascular. Dis 1997;39:287-324.

28. Furchgott R, Zawadzki JVB. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288:373-6

29. Gordon JL, Lavoie KL, Arsenault A, Ditto B, Bacon SL. Health behaviors and endothelial function. J Behav Med. 2008; 31: 5-21.

30. Mensah GA. Healthy endothelium: the scientific basis for cardiovascular health promotion and chronic disease prevention. Vascular Pharmacology. 2007; 46: 310-4.

31. Ferreira GA, Navarro TP, Telles RW *et al.:* Atorvastatin therapy improves endothelial-dependent vasodilation in patients with systemic lupus erythematosus: an 8 weeks controlled trial. *Rheumatology* (Oxford) 2007; 46: 1560-5.

32. Flammer AJ, Suadno I, Hermann F *et al* . Angiotensin- Converting Enzyme Inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis. Circulation.2008; 117: 2262-2269.

33. Tousoulis D, Antoniedes C, Stefanadis C. Evaluating endothelial function in humans: a guide to invasive and non-invasive techniques. Heart. 2005; 91: 553-8.

34. Kiss E, Soltesz P, Der H, Kocsis Z, Tarr T, Bhattoa H et al. Reduced flow-mediated vasodilation as a marker for cardiovascular complications in lupus patients. Journal of Autoimmunity, 2006; 27: 211-7.

35. Correti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the international brachial artery reactivity task force. J Am Coll Cardiol. 2002; 39: 257-65.

36. Yoder MC, et al. Redifining endothelial progenitor cells via clonal analyses and hematopoietic stem/progenitor cell principals.Blood. 2007; 109,1801-1809.
37. Westerweel PE, Verhaar MC. Endothelial progenitor cell disfunction in rheumatic disease. Nat Rev Rheumatol 2009; 5: 332-40.
38. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Zee R, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 1997; 275: 964-7.
39. Schatteman GC, et al. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2007;292,H1-H18
40. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J 1999; 18:3964–72
41. Distler JH, Allanore Y, Avouac J, Giacomelli R, Guiducci S, Moritz F *et al.* EULAR Scleroderma Trials and Research group. EULAR Scleroderma Trials and Research group statement and recommendations on endothelial precursor cells. Ann Rheum Dis. 2009;68(2):163-68.
42. George J, Shmilovich H, Deustsh V, Miller H, Keren G, Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. Tissue Engineering. 2006;12:331-5.
43. Khan SS, Solomon MA, McCoy Jr JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. Citometry Part B (Clinical Citometry). 2005; 64B: 1-8.
44. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. N.Engl J Med 2003;348:593–600.
45. Hill Jm ,Ouyyumit FAA. Endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction. Vox sanguinis. 2004;87:31-7.
46. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. Circulation. 2004; 109: 220-6.
47. Uemura T, Higashi Y, Nishioka K, Jitsuiki D, Goto C, Nakamura S, et al. Relationship between CD34 AC133 CD45 endothelial progenitor cells and cardiovascular risk factors . Hypertension. 2007;50:e130

48. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. Circ Res. 2001;89:E1-E7.
49. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation. 2002;106:2781-2786.
50. Zhou B, Ma FX, Liu PX, Fang ZH, Wang SL, Han ZB, et al. Impaired therapeutic vasculogenesis by transplantation of OxLDL-treated endothelial progenitor cells. J Lipid Res. 2007;48:518-527.
51. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, et al. Smoking cessation rapidly increase circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1442-1447.
52. Choi JH, Kim KL, Huh Wet al. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1246-1252.
53. Masuda H, Kalka C, Takahashi T et al. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. Circ Res. 2007;101:598-606.
54. Lemieux C, Cloutier I, Tanguay JF. Menstrual cycle influences endothelial progenitor cell regulation: A link to gender differences in vascular protection? International Journal of Cardiology. 2009; 136, 200–210
55. Wang CH,Ciliberti N,Li SH et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy. Circulation. 2004;109: 1392-400.
56. Muller P, Kazakov A, Jagoda P et al. ACE inhibition promotes upregulation of endothelial progenitor cells and neoangiogenesis incardiac pressure overload. Cardiovascular Research. 2009;83,106-114
57. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. Circulation 2001;103:2885–2890.
58. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2005; 12: 407-14.

59. Ruger B, Giurea A, Wanivenhaus AH, et al. Endothelial precursor cells in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Arthiritis Rheum. 2004;50:2157-66.

60. Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, et al. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. Circulation. 2005;111:204-11.

61. Allanore Y, Batteux F, Avouac J, Assous N, Weill B, Kahan A. Levels of circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol. 2007;25:60-6.

62. .Kuwana M, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. Lancet. 2004;364:603-10.

63. Moonen JRAJ, Leeuw Kd, Seijen XJGYv et al. Reduced number and impaired function of circulating progenitor endothelial cells in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Research and Therapy. 2007;9: R84.

64. Grisar J, Steiner CW, Bonelli M, Karonitsch T, Schwarzinger I, Weigel G, Steiner G, Smolen JS. Systemic lupus erythematosus patients exhibit functional deficiencies of endothelial progenitor cells. Rheumatology. 2008;47:1476-1483.

65. Min TQ, Zhu CJ, Xiang WX et al. Improvement in endothelial progenitor cells from peripheral blood by ramipril therapy in patients with stable coronary artery disease.Cardiovascular Drugs and Therapy. 2004; 18, 203-209.

66. Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary disease: randomized, double-blind,placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). Lancet. 2003; 362, 782-788.

67. Yusuf S, Sleight P, Pogue J et al. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients: The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. N Engl J Med. 2000; 342,145-153.

68. Zhang H, Schmeisser A, Garlichs CD et al. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res*. 1999;44:215–222.

69. Hamdan AD, Quist WC, Gagne JB, Feener EP. Angiotensin-converting enzyme inhibition suppresses plasminogen activator inhibitor-1 expression in the neointima of balloon-injured rat aorta. *Circulation*.1996;93:1073–1078.

70. Dohi Y, Criscione L, Pfeiffer K, Luscher TF. Angiotensin blockade or calcium antagonists improve endothelial dysfunction in hypertension: studies in perfused mesenteric resistance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994;24:372–379.

71. Biernatsky S, Boivin JF, Joseph et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2006; 54: 2550-7.

72. Bjornadal I, Yin L, Granath F, Klares-Kog L, Ekbom A. Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95. J Rheumatol 2004; 31: 713-9.

73. Urowitz MB, Gladman DD, TOM BDM , Ibañez D, Farewell VT. Changing Patterns in Mortality and Disease Outcomes for Patients with Systemic Lupus Erythematosus.J Rheumatol 2008;35:2152–8.

74. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. Circulation 2007; 115: 1285-95.

75. Poredos P. Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis. Clin Appl Thromb Hemost 2001; 7: 276-80.

76. Johnson SR, Harvey PJ, Floras JS et al. Impaired brachial artery endothelium dependent flow mediated dilation in systemic lupus erythematosus: preliminary observations. Lupus 2004; 13: 590-3.

77. Wright SA, O'prey FM, Mchenry MT et al.A randomized interventional trial of omega-3-polyunsaturated fatty acids on endothe- lial function and disease activity in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 2008; 67: 841-8.

78. Tam LS, Li EK, Leung VY et al. Effects of vitamins C and E on oxidative stress markers and endothelial function in patients with systemic lupus erythematosus: a double blind, placebo controlled pilot study. J Rheumatol 2005; 32: 275-82.

79. Tikiz C, Utuk O, Pirildar T et al. Effects of Angiotensin-converting enzyme inhibition and statin treatment on inflammatory markers and endothelial functions in patients with long-term rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 2005 Nov;32(11):2095-101.

80. Werner N, Kosiol S, Schiegl T et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. N Engl J Med; 2005;353:999–1007.

81. Denny MF, Thacker S, Mehta H et al. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. Blood. 2007; 110 (8): 2907-15.

82. Baker JF, Zhang L, Imadojemu S et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in SLE in the absence of coronary artery calcification. Rheumatol Int. 2012; 32(4): 997-1002.

83. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K et al. Increase in circulanting endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary disease. Circulation 2001; 103:2885-2890.

84. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. Blood. 2004;104: 921–926.

85. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizesbone marrow-derived endothelial progenitor cells. J Clin Invest. 2001; 108:399–405.

86. Bahlmann FH, Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D. Stimulation of Endothelial Progenitor Cells : A New Putative Therapeutic Effect of Angiotensin II Receptor Antagonists. Hypertension . 2005;45:526-9

87. Wang CH, Verma S, Hsieh IC et al. Enalapril increases ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization through manipulation of the CD26 system. J Mol Cell Cardiol. 2006;41:34–43.

88. Coppolino G, Campo S, Bolignano D, Sturiale A, Giacobbe MS, Loddo S et al. Effect of immunoglobulin treatment on endothelial progenitor cells in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2008;67(7):1047-8.

8.ANEXOS

ANEXO 1

Critérios de classificação para LES do Colégio Americano de Reumatologia, Revisado em 1997

Critério	Definição
1. Erupção malar	Eritema malar fixo, plano ou elevado
2. Erupção discóide	Placas eritematosas elevadas com cicatrização queratótica e rolhas foliculares com cicatrização atróficas nas lesões antigas.
3.Fotossensibilidade	Exantema cutâneo como resultado de uma reação não usual a luz solar, por relato do paciente ou observação do médico.
4. Úlceração oral	Ulceração oral e nasofaríngea, usualmente indolores, observadas por um médico.
5. Artrites	Não erosiva comprometendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à pressão, tumefação ou derrame.
6. Serosites	a) Pleurite, história convincente de dor pleural ou atrito auscultado por médico ou evidência de derrame pleural ou b) Pericardite documentada por ECG ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.
7. Desordem renal	a) Proteinúria persistente, superior a 0,5 g por dia ou superior a 3+ ou b) Qualquer tipo de cilindros celulares.
8. Desordens neurológicas	Convulsões, na ausência de outras causas ou Psicose, na ausência de outras causas.
9. Desordens hematológicas	a) Anemia hemolítica ou b) Leucopenia menor de 4000 por mm^3 em duas ou mais ocasiões ou c) Linfopenia menor de 1500 mm^3 em duas ou mais ocasiões ou d)Trombocitopenia menor de 100.000 por mm^3 na ausência de drogas que a provoquem.
10. Anticorpo antinuclear	Anticorpo antinuclear em título anormal por imunofluorescência indireta ou ensaios equivalentes em qualquer momento e na ausência de drogas que causem lúpus induzido por drogas.
11. Desordens imunológicas	a) Anti-DNA nativo positivo ou c) anticorpo anti-Sm ou d) anticorpos antifosfolípides positivos por 1) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina 2) teste positivo para anticoagulante lúpico usando métodos estandartizados ou 3) teste falso positivo para sífilis por pelo menos seis meses e confirmado por teste de imobilização do *Treponema pallidum* ou teste de fluorescência com absorção de anticorpos treponêmicos

Para identificação de pacientes em estudos clínicos, a presença de qualquer dos 4 ou mais entre os 11 critérios, de forma seriada ou concomitante durante qualquer intervalo permite a classificação como tendo LES. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1997; 40: 1725

ANEXO 2

Data: __/__/____

1. Identificação:

Nome: _____
RH-HSP_____ Data de nascimento: _____ Idade: _____
Cor: ( ) Branca ( ) Não Branca

2. Tempo de doença: _____

3. Critérios de classificação (segundo ACR):
( ) fotossensibilidade ( ) rash malar ( ) úlceras orais ( ) lesão discóide
( ) artrite ( ) nefrite ( ) neuropsiquiátrico (qual?):_____
( ) hematológico
( ) serosite ( ) anti-Sm ( ) anti-DNA ( ) ACL ( ) FAN: título e padrão:_____

4. Comorbidades:
( ) diabetes mellitus ( ) hipertensão arterial sistêmica ( ) dislipidemia
( ) tabagismo ( ) insuficiência coronariana ( ) insuficiência renal crônica em diálise ( ) transplante renal ( ) neoplasia maligna atual ( ) DPOC/asma
( ) doença infecciosa atual ( ) gravidez atual ( ) menopausada
( ) doença reumatológica auto-imune (qual?):_____

5. Medicações - usadas nos últimos três meses (dose e duração):
( ) prednisona: _____ ( ) azatioprina: _____
( ) anti-malárico: _____ ( ) metotrexate: _____
( ) Inibidor da ECA: _____ ( ) estatina: _____
( )ciclofosfamida: _____
outros (quais?): _____

6. Queixas atuais (nos últimos dez dias):
( ) febre (maior que 38°C)
( ) rash cutâneo
( ) úlcera oral ou nasal
( ) alopécia (difusa ou localizada)
( ) lesão discóide
( ) artrite (≥ 2 articulações)
( ) dor ou fraqueza de musculatura proximal
( ) cefaléia (severa, persistente e resistente a analgésicos narcóticos)
( ) dor torácica tipo pleural ou pericárdica
( ) défict neurológico focal (AVC recente)
( ) neuropatia sensorial ou motora envolvendo pares cranianos
( ) quadro sugestivo de vasculite (presença de úlcera, gangrena, nódulos em dedos, infartos periungueais, hemorragias pontuais ou biópsia ou arteriografia comprovando vasculite)
( ) episódio convulsivo recente
( ) presença de alucinações, delírios ou alteração importante comportamental.
( ) alteração de função mental (alteração de memória, orientação ou outra função intelectual de rápida evolução, associado a distúrbio de percepção, incoerência na fala, insônia ou alteração psicomotora)

( ) alteração visual recente

7. Exame Físico:
PA: ___x___ P: ___ FR: ___ T°: ___ peso _____ altura _____ IMC ____
Muco-cutâneo:_____
Cárdio-pulmonar:_____
Abdômen: _____
Articular: _____
Neurológico: _____

8. Exames laboratoriais:
HMG: Hb/Ht: __/__ leucócitos: _____ ( ) linfócitos:____ plaquetas:_____
Creatinina: ____ VHS: ____ Glicemia: ____
Colesterol: HDL: _____ LDL: _____ triglicérides: _____
Urina 1: proteína: _____ Leucocitúria: _____ Hematúria: _____ Cilindros: ____
Proteinúria de 24hs: _____
Anti-DNA: _____C3/C4: _____CH50: _____
Anticardiolipina: IgG: _____ IGM: _____

9. Pontuação SLEDAI:_____
10. Pontuação SLICC:_____
11. Quantificação de EPCs:
11.1 Número de UFCs_____
11.2 EPCs Citometria %_____

ANEXO 3
Escore de SLEDAI (Bombardier et al., 1992)**:**

ESCORE	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
8	Convulsão	Início recente. Excluído causas metabólicas, infecciosas ou por drogas
8	Psicose	Habilidade alterada de realizar atividades normais devido à grave distúrbio na percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, perda significativa de associações, conteúdo inadequado do pensamento, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Exclui uremia e drogas.
8	S. cerebral orgânica	Função mental alterada com prejuízo da orientação, memória ou outra função intelectual, com início e flutuações súbitas. Inclui alteração do nível de consciência com diminuição da capacidade de concentração e incapacidade de sustentar atenção no meio-ambiente mais 2 dos seguintes: distúrbios percecutórios, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, atividade psicomotora aumentada ou diminuída. Excluir causas infecciosas, metabólicas ou drogas.
8	Distúrbio visual	Alterações retinianas do LES. Inclui corpos citóides, hemorragia retiniana, exsudato serosa ou hemorragia na coróide, neurite ótica. Excluir hipertensão, infecção e drogas.
8	Alteração de par craniano	Início de neuropatia sensorial ou motora.
8	Cefaléia lúpica	Cefaléia intensa e persistente, pode ser tipo enxaqueca mas tem que ser resistente ao uso de narcóticos.
8	AVC	AVC novo. Exclui aterosclerose.
8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos em dedos, infartos periungueais, hemorragias pontuais, biópsia ou arteriografia comprovando vasculite.
4	Artrite	Mais de 2 articulações com dor e flogose
4	Miosite	Fraqueza/dor muscular proximal associado a aumento de CK-T/aldolase ou ENMG ou biópsia muscular.
4	Cilindrúria	Granular hemático ou celular de hemácias
4	Hematúria	> 5 hemácias/cp. Excluir infecção, nefrolitíase ou outra causa.
4	Piúria	>5 leucócitos/cp. Excluir infecção.
4	Proteinúria	>0,5 mg/24hs. Início recente ou aumento recente ou persistência de >0,5 mg/24hs.
2	Nova erupção cutânea	Erupção cutânea nova ou recorrente com sinais de inflamação.
2	Alopécia	Início recente ou recorrência de queda de cabelo anormal difusa ou localizada.
2	Úlcera mucosa	Início recente ou recorrência de úlceras orais ou nasais.
2	Pleurite	Dor torácica pleurítica com atrito ou derrame pleural ou espessamento pleural.
2	Pericardite	Dor pericárdica com mais um dos seguintes: derrame, atrito ou ECG, ou ECO.
2	Baixo complemento	Diminuição de CH50, C3, C4 abaixo do limite normal do laboratório.
2	Anti-DNA	Anti-DNA acima do valor normal do exame
1	Febre	>38ºC. Excluir infecção.
1	Trombocitopenia	< 100.000 plaquetas/mm^3
1	Leucopenia	< 3.000 leucócitos/ mm^3. Exclui drogas.

* Coloque o valor do peso na coluna escore se a descrição estiver presente no momento da consulta ou até 10 dias antes.

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. Arthritis Rheum 1992; 35: 630-640.

ANEXO 4

SLICC/ ACR-DI (Gladman et al., 1996, 1997)

DEFINIÇÃO	PONTUAÇÃO
OCULAR	
Catarata em qualquer olho, primária ou secundária à corticoterapia, documentada por oftalmoscopia	1
Alteração retiniana documentada ou Atrofia óptica documentada por exame oftalmoscópio	1
NEUROSPSIQUIÁTRICO	
Alteração cognitiva (por exemplo, prejuízo de memória, dificuldade de calcular, prejuízo da concentração, dificuldade de linguagem falada ou escrita) documentada por exame clínico ou teste neurocognitivo ou psicose maior	1
Convulsões requerendo terapia anticonvulsivante por mais de 6 meses.	1
Acidente vascular cerebral (escore 2 se mais de 1 evento)	1(2)
Neuropatia craniana ou periférica, excluindo neuropatia óptica	1
Mielite transversa	1
RENAL	
Taxa de filtração glomerular < 50%	1
Proteinúria ≥ 3,5 g/24 horas ou	1
Insuficiência renal terminal (independente se diálise ou transplante)	3
PULMONAR	
Hipertensão pulmonar (aumento de ventrículo direito ou hiperfonese em foco pulmonar).	1
Fibrose pulmonar (exame físico e radiografia)	1
Síndrome do pulmão encolhido (radiografia)	1
Fibrose pleural (radiografia)	1
Infarto pulmonar (radiografia)	1
CARDIOVASCULAR	
Angina ou *bypass* de artéria coronária	1
Infarto do miocárdio (escore 2 se mais de 1 evento)	1 (2)
Miocardiopatia (disfunção ventricular)	1
Doença valvular (sopro diastólico ou sistólico > 3/6)	1
Pericardite por 6 meses ou pericardiectomia	1
VASCULAR PERIFÉRICO	
Claudicação persistente por 6 meses	1
Perda tecidual menor (perda de polpa tecidual)	1
Perda tecidual significante (por exemplo, perda digital ou de membro) [escore 2 se mais de 1 sítio]	1 (2)
Trombose venosa com edema, ulceração ou evidência clinica de estase venosa	1
GASTROINTESTINAL	
Infarto ou ressecção intestinal abaixo do duodeno, baço, fígado ou vesícula biliar por qualquer causa (escore 2 se mais de 1 sítio)	1 (2)
Insuficiência mesentérica	1
Peritonite crônica	1
Estenose esofágica ou cirurgia de trato gastrointestinal superior	1
MUSCULO-ESQUELÉTICA	
Atrofia muscular ou fraqueza muscular	1
Artrite deformante ou erosiva (incluindo deformidades redutíveis e excluindo osteonecrose)	1
Osteoporose com fratura ou colapso vertebral (excluindo osteonecrose)	1
Osteonecrose (escore 2 se mais de 1 evento)	1 (2)
Osteomielite	1
DERMATOLÓGICO	
Alopecia cicatricial crônica	1
Cicatriz extensa ou paniculite em localização diferente do couro cabeludo ou polpa digital	1
Ulceração cutânea (excluindo-se trombose) por mais de 6 meses	1
FALÊNCIA GONADAL PREMATURA	
Amenorreia secundária antes dos 40 anos de idade	1
DIABETES	
Requerendo tratamento, independente deste	1
MALIGNIDADE	
Documentada por exame patológico, excluindo displasia (escore 2 se mais de 1 sítio)	1(2)

Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1996; 39: 363-369.

ANEXO 5

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

Efeito do ramipril sobre a função endotelial e células progenitoras endoteliais dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

As doenças cardiovasculares, como infarto e "derrame", são complicações freqüentes em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), pois estes pacientes apresentam desregulação na função endotelial ou seja das células que formam os vasos. Existem umas células chamadas células progenitoras endoteliais (EPCs) que são importantes no reparo dos vasos sanguíneos lesados. Recentemente, estudos mostraram que pessoas que possuem melhor função endotelial e maior quantidade de EPCs terão menor chance de ter doenças cardiovasculares. Em pacientes que tiveram angina ou infarto o uso de um medicamento chamado ramipril diminuiu complicações cardiovascular e aumentou o número de EPCs, mas ainda não há estudo que avalie este medicamento em pacientes com LES. Assim, este estudo tem a finalidade de avaliar o efeito do ramipril sobre a função endotelial e sobre número de EPCs em pacientes com LES.

Se você concordar em participar do estudo, deverá responder a uma entrevista com perguntas sobre medicações, sintomas atuais e antecedentes de outras doenças e ser examinado. Deverá também colher 30 ml de sangue em veia periférica do antebraço e de urina. As amostras de sangue e urina serão usados para realização de exames laboratoriais de rotina (hemograma, velocidade de hemossedimentação, creatinina, glicemia, dosagem de colesterol, triglicérides, glicemia, urina tipo 1, pesquisa de anti-DNA e dosagem de complemento e suas frações. Uma parte do sangue será guardado em freezer para contagem do número de EPCs e para outros exames que possam ser importantes para a pesquisa no futuro. Neste caso um novo projeto será enviado para aprovação do CEP e o paciente será consultado para autorizar utilização destas amostras no novo estudo

A coleta será realizada da mesma forma que se faz a coleta de sangue de rotina e poderá haver desconforto no local da punção. A avaliação da função endotelial será realizada através de exame de ultra-som da artéria do braço e não causa problema. Raramente poderá haver um pouco de dor de cabeça e baixa de pressão após administração do nitrato embaixo da língua para a complementação do exame.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisa conforme o protocolo.

O presente estudo não irá interferir no acompanhamento médico que os participantes fazem no ambulatório de Reumatologia. Neste trabalho não será utilizado nenhum teste terapêutico ou diagnóstico experimental. Somente no final do trabalho é que poderá se chegar a alguma conclusão sobre o estudo. O estudo não trará um benefício direto e imediato ao participante, mas o entendimento do uso do ramipril sobre a função endotelial no LES tem importância, pois no futuro, este medicamento poderá ser usado no auxílio à prevenção de doenças vasculares nestes pacientes.

Aos pacientes fica garantida toda forma de esclarecimento, antes e em qualquer etapa da pesquisa, sobre a metodologia desta. Dúvidas quanto ao desenvolvimento do estudo poderão ser esclarecidas a qualquer momento pela pesquisadora principal Dra. Ana Cecília Diniz Oliveira (Fone: 94915565) pertencente à Disciplina de Reumatologia da UNIFESP (fone: 55764239) situada no 3º andar do prédio Jairo Ramos do Hospital São Paulo. A orientação está sendo realizada pela Professora Titular da Disciplina de Reumatologia da

UNIFESP Prof. Dra. Emília Inoue Sato. Caso haja alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, o participante poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa na rua Botucatu, 572 – 1° Andar – Conjunto 14 – CEP 04023-062, São Paulo-SP, Brasil, fone (0xx11) 55711062, FAX (0xx11) 55397162, e-mail: cepunifesp@epm.br. Os pacientes terão liberdade de se recusarem a participar ou de retirarem o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização ou prejuízo ao seu tratamento.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Os pacientes terão o direito de serem atualizados quanto a resultados que forem do conhecimento dos pesquisadores. Não haverá despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames, consultas e transporte de ida e volta para a realização dos exames. Também não haverá compensação financeira relacionada a sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Efeito do ramipril sobre a função endotelial e células progenitoras endoteliais dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico".

Eu discuti com a Dra. Ana Cecília Diniz Oliveira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal*	Data____/____/____
Assinatura da testemunha	Data____/____/____

*Para casos de voluntários analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo	Data____/____/____

ANEXO 6

UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
1959

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de Julho de 2010.
CEP 0869/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) ANA CECÍLIA DINIZ OLIVEIRA
Co-Investigadores: Neusa Pereira da Silva, Emilia Inoue Sato (orientadora)
Disciplina/Departamento: Reumatologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Efeito do ramipril sobre a função endotelial e células progenitoras endoteliais em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico".**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Intervenção terapêutica.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Risco mínimo, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.
OBJETIVOS: Avaliar o efeito do ramipril sobre a função endotelial de pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico.
RESUMO: Participarão do estudo, pacientes em seguimento regular no ambulatório de Doenças Reumáticas Auto-imunes do Hospital São Paulo/UNIFESP. Serão selecionados pacientes que preencherem pelo menos 4 critérios para classificação de LES do Colégio Americano de Reumatologia, idade acima de 18 anos, medicamentos para tratamento de LES estáveis há pelo menos 3 meses. Sessenta pacientes com LES serão divididos em 2 grupos: grupo Intervenção: os pacientes receberão ramipril 10 mg/dia por 12 semanas (5 mg/dia por 2 semanas e depois 10 mg/dia por mais 10 semanas; grupo controle- controle, sem uso do ramipril. Para assegurar a adesão dos pacientes ao protocolo e averiguar possíveis efeitos colaterais, será feito contato telefônico com os pacientes após 2 e 6 semanas do início do estudo. O tratamento do LES continuará a ser definido pelo médico responsável pelo seguimento do paciente. Todas as avaliações são realizadas nos tempos zero e após 12 semanas. Serão coletados 30 ml de sangue periférico para a realização dos exames para avaliação da atividade da doença, quantificação de EPCs e dosagens de VEGF. Serão realizadas avaliações laboratoriais: hemograma, velocidade de hemossedimentação, creatinina, glicemia, dosagem de coleserol e frações e triglicérides e urina tipo 1. Proteinúria de 24 horas será realizada em pacientes com proteína detectada ao exame de urina 1. Será realizada pesquisa de anticorpo anti-DNA e dosagens de CH50, C3 e C4. A quantificação das PECs será realizada através de citometria de fluxo. Níveis plasmático de VEGF serão mensurados pos ELISA. A função endotelial dependente e independente de endotélio será avaliada no início do estudo e após 12 semanas, através de ultra-sonografia da artéria braquial, utilizando aparelho de ultra-som de alta resolução e transdutor linear multifrequencial, e a avaliação da vasodilatação mediada pelo fluxo. Para avaliação da função independente do endotélio será utilizada nitroglicerina sublingual , exceto nos pacientes que apresentarem alguma contra-indicação à administração da nitroglicerina..
FUNDAMENTOS E RACIONAL: Na literatura há estudos que comprovam o efeito benéfico dos IECA como ramipril, em pacientes com doença coronariana estabelecida ou com alto risco de doença cardiovascular. Esse benefício está

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

além do efeito hipotensor, estando associado à melhora da função endotelial. Apesar de estar estabelecido na literatura que pacientes com LES apresentam disfunção endotelial e menor número de EPCs, não há trabalho avaliando o efeito dos IECAs na função endotelial, no número de EPCs e níveis de VEGFs em pacientes com LES..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados.

TCLE: Apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP - R$ 4138,40.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **25/07/11** e **24/07/12**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0869/10

Abstract

Objectives: Endothelial dysfunction and reduced number of endothelial progenitor cells (EPCs) are some of the factors contributing to cardiovascular diseases in patients with SLE. In patients with coronary heart disease, the use of angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI) showed reduction of cardiovascular morbidity and mortality. No study has assessed the effect of ramipril on endothelial function and EPCs in SLE patients.

Methods: 37 patients with SLE and without cardiovascular risk factors, were randomly divided into 2 groups: 19 patients in intervention group (IG) received 10mg/day of ramipril for 12 weeks and 18 patients in control group (CG) without intervention. Endothelial function was assessed by ultrasound of the brachial artery, with measurements of flow-mediated dilation (FMD) and EPCs were quantified by flow cytometry and cell culture. All evaluations were performed at baseline and after 12 weeks. . **Results:** A significant increase in FMD (6:17 ± 4:18 vs 11:14% ± 5.4%, p <0.001) was observed in IG, with no change in CG (3.91% vs. 5:37 ± 5, 02 ± 3.62%, p = 0.630) after 12 weeks. A significant increase also was observed in the number of colony forming units of EPCs in IG (21.3 ± 10.4 vs 31.6 ± 8.5, p <0.001), with no difference in CG (24.8 ± 13.5 vs 25.8 ± 11.6, p = 0.714). No difference was found in numbers of EPCs evaluated by flow cytometry. **Conclusion**: Ramipril improved endothelial function and increased the number of EPCs evaluated by cell culture of SLE patients without cardiovascular risk factors.

Keywords: systemic lupus erythematosus, endothelium, ramipril

Bibliografia consultada

1.Rother, ET. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2a ed.São Paulo; 2005

2.Ferreira,LM. Elaboração e apresentação de teses: guia prático. São Paulo; 2008