

Filipa Alexandra Mascarenhas Melo

**Disfuncionalidade da lipoproteína de alta
densidade e risco cardiometabólico -
relação com outros biomarcadores**

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde
orientada pelos Prof. Doutor Frederico Teixeira e Doutor Flávio Reis
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Janeiro/2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Filipa Alexandra Mascarenhas Melo

**DISFUNCIONALIDADE DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA
DENSIDADE E RISCO CARDIOMETABÓLICO -
RELAÇÃO COM OUTROS BIOMARCADORES**

Coimbra, 2014

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, no ramo de Ciências Biomédicas

Trabalho experimental realizado no Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental e Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, sob a orientação do Prof. Doutor Frederico Teixeira e do Doutor Flávio Reis

O conteúdo científico da presente tese foi incluído nas seguintes publicações em revistas científicas internacionais com arbitragem:

- **Mascarenhas-Melo F**, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Ribeiro S, Rocha-Pereira P, Cotterill E, Teixeira F, Reis F. Markers of Increased Cardiovascular Risk in Postmenopausal Women: Focus on Oxidized-LDL and HDL Subpopulations. *Dis Markers* 2013;35(2):85-96.
- **Mascarenhas-Melo F**, Marado D, Palavra F, Sereno J, Coelho Á, Pinto R, Teixeira-Lemos E, Teixeira F, Reis F. Diabetes abrogates sex differences and aggravates cardiometabolic risk in postmenopausal women. *Cardiovasc Diabetol* 2013;12:61.
- **Mascarenhas-Melo F**, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Marado D, Palavra F, Pinto R, Rocha-Pereira P, Teixeira F, Reis F. Implication of low HDL-c levels in patients with LDL-c average levels – focus on oxidized LDL, large HDL subpopulation and adiponectin. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:612038.
- **Mascarenhas-Melo F**, Palavra F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Freitas I, Mendonça MI, Pinto R, Teixeira F, Reis F. Emergent biomarkers of residual cardiovascular risk in patients with low HDL-c and/or high triglycerides and average LDL-c concentrations - focus on HDL subpopulations, oxidized LDL, adiponectin and uric acid. *The Sci World J* 2013; 387849.
- Palavra F, Marado D, **Mascarenhas-Melo F**, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Nunes CC, Gonçalves G, Teixeira F, Reis F. New markers of early cardiovascular risk in multiple sclerosis patients: oxidized-LDL correlates with clinical staging. *Dis Markers* 2013; 34(5):341-8.
- Ribeiro S, do Sameiro Faria M, **Mascarenhas-Melo F**, Freitas I, Mendonça MI, Nascimento H, Rocha-Pereira P, Miranda V, Mendonça D, Quintanilha A, Belo L, Costa E, Reis F, Santos-Silva A. Main Determinants of PON1 Activity in Hemodialysis Patients. *Am J Nephrol* 2012; 36(4):317-23.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através de:

- Bolsa de doutoramento individual com a referência SFRH/BD/65483/2009, financiada pelo POPH-QREN;
- Projecto Estratégico (PEst-C/SAU/UI3282/2011) e COMPETE.

Parte do trabalho apresentado nesta tese recebeu as seguintes distinções/prémios:

- 1º Prémio para melhor projecto de investigação na área da Esclerose Múltipla – Bolsa *Esperança, Vida e Solidariedade – Merck Serono*. “Caracterização do risco cardiometabólico precoce de doentes com esclerose múltipla e de doentes com lúpus eritematoso sistémico – correlação com o estadiamento, a terapêutica e hábitos de estilo de vida”. Grupo de Estudos de Esclerose Múltipla – Merck Serono – Janeiro de 2011.
- Menção Honrosa para trabalho de Investigação Clínica: “A actividade da paraoxonase 1 como marcador de risco cardiometabólico na diabetes tipo 2 – Influência da prática moderada de exercício físico e de hábitos tabágicos”, atribuído pelo Júri de Prémios do XII Congresso Português de Endocrinologia e 62ª Reunião Anual da SPEDM, Janeiro 2011, Tróia.
- Melhor comunicação livre: “HDL-c quality and subpopulations as putative better markers of dyslipidaemia and cardiometabolic risk in type 2 diabetes patients than the traditional total HDL-c content”, atribuído pelo Júri de Prémios do XIX Congresso Nacional de Aterosclerose, Outubro de 2011, Évora.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Professor Doutor Frederico Teixeira, por ter confiado em mim e me ter aberto as portas para a realização deste trabalho. Agradeço ainda por me ter sugerido um tema que se revelou extremamente interessante tanto pelas questões em aberto nesta área do conhecimento como pelas ligações que tem com outras áreas. O meu obrigado por todas as críticas sempre construtivas, resultantes de uma importante experiência profissional.

Estou profundamente reconhecida ao Doutor Flávio Reis, que pacientemente guiou este meu percurso científico (ainda muito curto!) desde o início e em todos os momentos me transmitiu a dedicação e o entusiasmo de que precisava. Ensinou-me não apenas os conteúdos científicos profundos e questões entusiasmantes na área cardiovascular, mas também como enfrentar dificuldades com prazer. Por isso, mesmo nos piores momentos, o seu apoio fez-me olhar de forma positiva e otimista para o trabalho que estava a desenvolver e, sem dúvida, isso foi uma enorme vantagem. Obrigado!

Aos meus pais, que estão sempre comigo, em todos os momentos e em todos os dias, e pela forma generosa como acreditam em mim, me motivam, me aconselham, me ajudam e me ouvem. Juntamente com o exemplo de trabalho, educação e perseverança que sempre me transmitiram, foram preciosos para que conseguisse ultrapassar os momentos mais difíceis com tranquilidade e esperança. Bem-hajam!

À minha irmã, Margarida, que sempre foi e será a minha melhor amiga, e um exemplo de sucesso, que motivou em grande parte a minha vontade de ser “igual” a ela. Agradeço pela forma sempre tranquila, compreensiva, mas também subtil, como me apoia, dá força, confiança e optimismo para equilibrar a minha vida.

À minha família, por todo o carinho e amor que sempre me transmitem, e por estarem sempre comigo.

Aos meus colegas e amigos, pelo apoio e pelos bons momentos que me proporcionaram. Em especial, agradeço ao José Sereno, à Patrícia Garrido, ao Filipe Palavra, à Daniela Marado e à Sandra Ribeiro, por me terem ajudado a ultrapassar muitos obstáculos durante esta tese de doutoramento. Ao Ricardo, por me ter ajudado sempre de uma

forma tão disponível, pelo companheirismo, generosidade e paciência. Sem eles, tudo teria sido bem mais difícil.

Um agradecimento especial à Doutora Edite Teixeira de Lemos, que logo acreditou e confiou na minha motivação, trazendo-me sem hesitação para esta equipa e, principalmente, pelo apoio e companhia de sempre.

Agradeço a todos os que colaboraram de forma efectiva para esta tese de doutoramento, nomeadamente ao Doutor Rui Pinto, Dr. Álvaro Coelho, Dr. Grilo Gonçalves, Doutora Petronila Rocha Pereira, Doutora Isabel Freitas e Doutora Maria Isabel Mendonça, por todo o empenho e disponibilidade e o aporte que trouxeram, de uma forma ou de outra, para a valorização deste trabalho.

Agradeço ao Centro Hospitalar de Coimbra E.P.E., *vulgo* Hospital dos Covões, actualmente enquadrado no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, ao Laboratório de Análises Clínicas Soares & Figueiredo, de Viseu, e ao Laboratório de Análises Clínicas da Covilhã, que me receberam nos seus serviços e facultaram os meios necessários à recolha de dados e amostras dos voluntários participantes deste estudo.

Finalmente, quero agradecer às diversas instituições que me deram o suporte logístico e financeiro durante estes anos, nomeadamente à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, ao IBILI (Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida) e à Fundação para a Ciência e Tecnologia.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Índice	iii
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e acrónimos	xv
Resumo	xxi
Abstract	xxiii
PARTE I – INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS	1
Capítulo 1 – Aterosclerose	3
1.1 - Aterosclerose: resenha histórica da evolução do conceito	5
1.2 - Fisiopatologia da aterosclerose: características essenciais e principais mediadores	6
1.3 - Factores de risco de doença cardiovascular aterogénica: um mosaico em evolução	10
1.3.1 – Factores de risco modificáveis	12
1.3.1.1 – Dislipidemia	12
1.3.1.2 – Obesidade, diabetes e inflamação	23
1.3.1.3 – Hipertensão arterial	31
1.3.1.4 – Estilos de vida - influência da dieta, peso corporal, actividade física, consumo de álcool e hábitos tabágicos	33
1.3.2 – Factores de risco não modificáveis	38
1.3.2.1 – Idade e género	38
1.3.2.2 – Factores genéticos	39
1.4 – Outros marcadores importantes na determinação do risco cardiovascular	40
1.4.1 – A disfunção endotelial como etapa chave na aterogénese	40
1.4.2 – Associação entre hiperuricemia e aterogénese	44
1.4.3 – Angiogénese e aterogénese – papel do VEGF	46
1.5 – Referências	49

Capítulo 2 – Lipoproteína de alta densidade (HDL)	65
2.1 – Introdução	67
2.2 – Dados Epidemiológicos	68
2.3 – Composição, síntese, metabolismo e catabolismo das HDL	71
2.3.1 – Principais apolipoproteínas e enzimas das HDL	72
2.3.2 – Subpopulações de HDL	74
2.3.3 – Síntese, metabolismo e catabolismo das HDL	77
2.4 – Funções anti-aterogénicas das HDL	79
2.4.1 – Transporte reverso do colesterol	80
2.4.2 – Funções pleiotrópicas anti-aterogénicas das HDL	81
2.4.2.1 – Efeitos antioxidantes das HDL – protecção da oxidação das LDL	81
2.4.2.2 – Efeitos pró-vasorelaxantes e de estabilização da placa	83
2.4.2.3 – Inibição da expressão de moléculas de adesão, da activação de leucócitos e efeito anti-inflamatório	84
2.4.2.4 – Regulação da coagulação e fibrinólise e inibição da actividade plaquetária	85
2.4.2.5 – Melhoria da resistência à insulina	87
2.5 – (Dis)funcionalidade das HDL	88
2.6 – Elevação das HDL por alterações do estilo de vida	92
2.6.1 – Efeitos ateroprotectores do aumento do c-HDL pelo exercício físico	93
2.7 – Intervenções farmacológicas na modulação das HDL	95
2.7.1 – Principais terapêuticas farmacológicas actualmente disponíveis	95
2.7.1.1 – Estatinas	95
2.7.1.2 – Fibratos	97
2.7.1.3 – Ácido nicotínico (ou niacina)	99
2.7.2 – Novas terapêuticas dirigidas para as HDL	101
2.7.2.1 – Novas terapêuticas direccionadas para o aumento da quantidade das HDL	102
2.7.2.2 – Novas terapêuticas direccionadas para o aumento da funcionalidade das HDL	108
2.8 – “Contextualização do problema e desafios actuais”	111
2.9 – Referências	112
Capítulo 3 – Objectivos	133
Objectivos gerais e específicos	135

PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL	137
Capítulo 4 – Influência do género e menopausa no perfil cardiometabólico de indivíduos sem doença cardiovascular diagnosticada	139
4.1 – Introdução	141
4.2 – População e métodos	143
4.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas	143
4.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue	143
4.2.3 – Determinações analíticas	144
4.2.3.1 – Perfil glicídico e lipídico	144
4.2.3.2 – Subpopulações de HDL	144
4.2.3.3 – Actividade paraoxonase da PON1	146
4.2.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial	146
4.2.4 – Análise estatística	146
4.3 – Resultados	147
4.3.1 – Caracterização geral da população	147
4.3.2 – Perfis glicídico e lipídico clássicos	148
4.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1	149
4.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial	150
4.3.5 – Análises de correlações entre marcadores	151
4.3.5.1 – Correlações entre LDL-ox e subpopulações de HDL	151
4.3.5.2 – Correlações entre TNF- α e parâmetros lipídicos	152
4.4 – Discussão e conclusão	154
4.5 – Referências	161
Capítulo 5 – A diabetes atenua as diferenças entre os géneros e agrava o perfil cardiometabólico nas mulheres em pós-menopausa	167
5.1 – Introdução	169
5.2 – População e métodos	171
5.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas	171
5.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue	172
5.2.3 – Determinações analíticas	173
5.2.4 – Análise estatística	173
5.3 – Resultados	173

5.3.1 – Caracterização geral das populações	173
5.3.2 – Perfil lipídico clássico	176
5.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1	178
5.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial	180
5.3.5 – Análises de correlações entre marcadores nos doentes diabéticos	183
5.4 – Discussão e conclusão	185
5.5 – Referências	194

Capítulo 6 – Biomarcadores do risco cardiovascular precoce em doentes com esclerose múltipla – enfoque nas subpopulações de HDL e nas LDL oxidadas **197**

6.1 – Introdução	199
6.2 – População e métodos	200
6.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas	200
6.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue	201
6.2.3 – Determinações analíticas	201
6.2.4 – Análise estatística	201
6.3 – Resultados	202
6.3.1 – Caracterização geral da população	202
6.3.2 – Perfis glicídico e lipídico clássicos	203
6.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1	204
6.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial	205
6.3.5 – Análise de correlação entre marcadores nos doentes com EM	206
6.4 – Discussão e conclusão	208
6.5 – Referências	212

Capítulo 7 – Marcadores emergentes de risco cardiovascular residual em doentes dislipidémicos com níveis de c-LDL normalizados **215**

7.1 – Perfil cardiometabólico em doentes dislipidémicos com baixos valores de c-HDL – importância das HDL grandes, LDL oxidadas e adiponectina	217
7.1.1 – Introdução	219
7.1.2 – População e métodos	221
7.1.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas	221
7.1.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue	223

7.1.2.3 – Determinações analíticas	223
7.1.2.4 – Análise estatística	223
7.1.3 – Resultados	224
7.1.3.1 – Caracterização geral das populações	224
7.1.3.2 – Perfis glicídico e lipídico clássicos	225
7.1.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1	227
7.1.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial	228
7.1.3.5 – Análises de correlações entre marcadores na população de doentes	229
7.1.4 – Discussão e conclusão	232
7.1.5 – Referências	239
7.2 – Perfil cardiometabólico em doentes dislipidémicos com baixos valores de c-HDL e/ou altos valores de TGs – importância das subpopulações de HDL, LDL oxidadas, adiponectina e ácido úrico	243
7.2.1 – Introdução	245
7.2.2 – População e métodos	247
7.2.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas	247
7.2.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue	249
7.2.2.3 – Determinações analíticas	249
7.2.2.4 – Análise estatística	249
7.2.3 – Resultados	250
7.2.3.1 – Caracterização geral das populações	250
7.2.3.2 – Perfis glicídico e lipídico clássicos	251
7.2.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1	252
7.2.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial	253
7.2.3.5 – Análises de correlações entre marcadores nos subgrupos em estudo	254
7.2.4 – Discussão e conclusão	257
7.2.5 – Referências	264
Capítulo 8 – Comentários finais e conclusões	273
8.1 – Comentários finais	275
8.2 – Conclusões	287
8.3 – Referências	289

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estágios do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas	9
Figura 1.2 – Resumo do metabolismo das lipoproteínas	15
Figura 1.3 – Potenciais mecanismos pelos quais as adipoquinas derivadas do tecido adiposo causam doença cardiovascular	29
Figura 1.4 – Mecanismos de disfunção endotelial que contribuem para o processo de aterosclerose	41
Figura 2.1 – Composição da lipoproteína de alta densidade (HDL)	72
Figura 2.2 – Nomenclatura das subclasses das lipoproteínas de alta densidade (HDL) determinada por diferentes métodos	76
Figura 2.3 – Metabolismo das HDL e transporte reverso do colesterol (TRC)	78
Figura 2.4 – Visão geral do transporte reverso do colesterol pelo HDL. São indicados locais potenciais para novos moduladores do HDL	80
Figura 2.5 – Efeitos anti-ateroscleróticos das HDL	82
Figura 2.6 – Abordagens terapêuticas para a regulação do metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL) incluem intervenções farmacológicas e modificações de estilo de vida	94
Figura 4.1 – Método Lipoprint para separação e quantificação das subpopulações de HDL	145
Figura 4.2 – Concentração sérica de c-LDL (a), LDL-ox (b), c-HDL total (c) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (d) e pequenas (e) nas populações em estudo	148
Figura 4.3 – Correlações entre as LDL-ox com c-HDL total (a), HDL grandes (b) e HDL pequenas (c)	152
Figura 4.4 – Correlações do TNF- α com o c-HDL total (a), HDL grandes (b) e HDL pequenas (c)	153
Figura 4.5 – Correlações do TNF- α com LDL-ox (a) e c-LDL (b)	153
Figura 5.1 – Efeito do género nas populações controlo e diabética. Concentração sérica de c-HDL total (a) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (b) e pequenas (c)	179
Figura 5.2 – Efeito da menopausa nas populações controlo e diabética. Concentração sérica de c-HDL total (a) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (b) e pequenas (c)	179
Figura 5.3 – Efeito do género nas populações controlo e diabética. Perímetro abdominal (a), concentração sérica de VEGF (b), ácido úrico (c), adiponectina (d), TNF- α (e) e PCRhs (f)	181
Figura 5.4 – Efeito da menopausa nas populações controlo e diabética. Perímetro abdominal (a), concentração sérica de VEGF (b), ácido úrico (c), adiponectina (d), TNF- α (e) e PCRhs (f)	182

- Figura 5.5** – Principais correlações nos homens e mulheres diabéticas. Correlação entre o perímetro abdominal e o TNF- α (a), VEGF (b), PCRhs (c) e ácido úrico (d); entre o TNF- α e o VEGF (e); entre a PCRhs e a adiponectina (f) 184
- Figura 5.6** – Principais correlações nas mulheres diabéticas em pós-menopausa. Correlação entre o perímetro abdominal e o TNF- α (a), VEGF (b) e PCRhs (c); entre o TNF- α e o VEGF (d); entre a PCRhs e a adiponectina (e) 184
- Figura 6.1** – Concentração sérica de c-LDL (a) LDL-ox (b) e LDLox/c-LDL (c) na população controlo e nos doentes com EM 204
- Figura 6.2** – Concentração sérica de c-HDL (a) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (b) e HDL pequenas (c) na população controlo e nos doentes com esclerose múltipla 205
- Figura 6.3** – Concentração sérica de PCRhs (a) e adiponectina (b) na população controlo e nos doentes com esclerose múltipla 206
- Figura 6.4** – Correlações entre o EDSS com as LDL-ox e o c-LDL (a) e entre as LDL-ox com o c-LDL (b) nos doentes com esclerose múltipla 207
- Figura 6.5** – Correlações entre o VEGF com as LDL-ox e o c-LDL (a) e entre a razão c-LDL/c-HDL com as LDL-ox e as subpopulações de HDL pequenas (b) nos doentes com esclerose múltipla 207
- Figura 6.6** – Correlações entre a adiponectina e as subpopulações de HDL grandes e pequenas (a) e entre a razão c-LDL/c-HDL com as subpopulações de HDL grandes e pequenas (b) nos doentes com esclerose múltipla 208
- Figura 7.1.1** – Concentração sérica de c-HDL total (a) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (b) e pequenas (c) nas populações em estudo 227
- Figura 7.1.2** – Concentração sérica de adiponectina (a), VEGF (b) e PCRhs (c) nas populações em estudo 229
- Figura 7.1.3** – Principais correlações nas populações de doentes com níveis normais e baixos de c-HDL. Correlações entre as HDL grandes com as LDL-ox (a), c-LDL (b), c-nHDL (c), adiponectina (d), TNF- α (e), e TGs (f) 230
- Figura 7.1.4** – Principais correlações nas populações de doentes com níveis normais e baixos de c-HDL. Correlações entre as LDL-ox e as HDL grandes (a), HDL pequenas (b), actividade da PON1 (c), TNF- α (d), PAD (e) e TGs (f) 231
- Figura 7.1.5** – Principais correlações nas populações de doentes com níveis normais e baixos de c-HDL. Correlações entre a adiponectina e as HDL grandes (a), HDL pequenas (b), TGs (c), perímetro abdominal (d), PCRhs (e) e ácido úrico (f) 232
- Figura 7.2.1** – Percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (a), HDL pequenas (b) e concentração sérica de LDL-ox (c) nas populações em estudo 252
- Figura 7.2.2** – Concentração sérica da adiponectina (a), VEGF (b) e ácido úrico (c) nas populações em estudo 253

Figura 7.2.3 – Correlações entre as LDL-ox e as HDL grandes (painel superior) e as HDL pequenas (painel inferior) nas subpopulações em estudo 254

Figura 7.2.4 – Correlações entre a adiponectina e as HDL grandes (painel superior) e as HDL pequenas (painel inferior) nas subpopulações em estudo 255

Figura 7.2.5 – Correlações entre a adiponectina e o perímetro abdominal (painel superior), entre a adiponectina e o ácido úrico (painel do meio) e entre o ácido úrico e o perímetro abdominal (painel inferior) nas subpopulações em estudo 256

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Apolipoproteínas e outras proteínas/enzimas transportadas pelas HDL	73
Tabela 4.1 – Dados demográficos e antropométricos dos grupos de estudo	147
Tabela 4.2 – Perfil lipídico dos grupos de estudo	150
Tabela 4.3 – Marcadores de inflamação, angiogénese e lesão endotelial dos grupos de estudo	151
Tabela 5.1 – Dados demográficos e antropométricos da população diabética e dos controlos emparelhados para idade e género	174
Tabela 5.2 – Dados demográficos e antropométricos da população diabética feminina e dos controlos emparelhados para a idade: influência da menopausa	175
Tabela 5.3 – Perfil lipídico da população diabética e controlos emparelhados para idade e género	176
Tabela 5.4 – Perfil lipídico da população diabética feminina e dos controlos emparelhados para idade: influência da menopausa	177
Tabela 5.5 – Marcadores de inflamação, angiogénese e lesão endotelial da população diabética e controlos emparelhados para idade e género	180
Tabela 5.6 – Marcadores de inflamação, angiogénese e lesão endotelial da população diabética feminina e controlos emparelhados para idade: influência da menopausa	182
Tabela 6.1 – Dados demográficos, antropométricos e estadio clínico dos doentes com Esclerose Múltipla (EM) e dos seus controlos emparelhados para a idade e género	202
Tabela 6.2 – Perfil lipídico dos doentes com Esclerose Múltipla (EM) e controlos emparelhados para a idade e género	203
Tabela 6.3 – Marcadores inflamatórios, angiogénicos e de lesão endotelial dos doentes com Esclerose Múltipla (EM) e controlos emparelhados para a idade e género	205
Tabela 7.1.1 – Dados demográficos e antropométricos dos grupos de estudo	225
Tabela 7.1.2 – Perfil lipídico dos grupos de estudo	226
Tabela 7.1.3 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial dos grupos em estudo	228
Tabela 7.2.1 – Dados demográficos e antropométricos das populações em estudo	269
Tabela 7.2.2 – Perfil lipídico das populações em estudo	270
Tabela 7.2.3 – Marcadores de inflamação, angiogénese e lesão endotelial nas populações em estudo	271

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ABC – ATP *binding cassette*

ABCA1 – ATP *binding cassette transporter*, da subfamília A

ABCG – ATP *binding cassette*, da subfamília G

AC – adenilciclase

Ác. úrico – ácido úrico

ACAT – acilcoenzima A-colesterol aciltransferase

ACCELERATE – *Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition With Evacetrapib in Patients at a High-Risk for Vascular Outcomes*

Acil-CoA – acil – coenzima A

ADA – Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association*)

ADN – ácido desoxirribonucleico

ADO – antidiabéticos orais

ADP – adenosina fosfato

AEED – Associação Europeia para o estudo da diabetes

AGL – ácidos gordos livres

AGS – ácidos gordos saturados

AIM-HIGH – *Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes*

AleCardio – *A Safety and Efficacy Study to Evaluate the Potential of Aloglitazar to Reduce Cardiovascular Risk in Coronary Heart Disease (CHD) Patients With a Recent Acute Coronary Syndrome (ACS) Event and Type 2 Diabetes Mellitus (T2D)*

ALT – alanina transaminase

AMP – adenosina monofosfato

AMPc – AMP cíclico

AMPK – 5`monofosfato de adenosina proteína quinase activada

ANCOVA – análise de covariância

ANGPTL2 – proteína relacionada com a angiopoietina 2

APC – proteína C activada

apo – apo(lipo)proteína

APOA1 – gene codificador da apolipoproteína A-I

APOA2 – gene codificador da apolipoproteína A-II

ARA – antagonistas dos receptores da angiotensina

ARNm – ácido ribonucleico mensageiro

AST – aspartato transaminase

ATGL – lipase adiposa de triglicerídeos

ATP III – *Adult Treatment Panel III*

AVC – acidente vascular cerebral

BHE – barreira hemato-encefálica

BIP – *Bezafibrate Infarction Prevention*

CAMs – moléculas de adesão celular

CB1 – receptor canabinóide tipo 1

CD36 – membro da família dos receptores *scavenger*, de classe B (*Cluster of Differentiation 36*)

CETP – proteína de transferência dos ésteres de colesterol

c-HDL – colesterol de lipoproteína de alta densidade

c-IDL – colesterol de lipoproteína de densidade intermédia

CL – colesterol livre

c-LDL – colesterol de lipoproteína de baixa densidade

c-nHDL – colesterol não HDL

CNP – peptídeo natriurético C

COX-2 – ciclo-oxigenase 2

c-Total – colesterol total

CV – cardiovascular

c-VLDL – colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade

DAC – doença arterial coronária

dal-ACUTE – *Dalcetrapib in Patients Hospitalized For An Acute Coronary Syndrome*

dal-HEART – *Dalcetrapib HDL Evaluation, Atherosclerosis and Reverse Cholesterol Transport*

dal-OUTCOMES – *Efficacy and safety of dalcetrapib in patients with recent acute coronary syndrome*

dal-PLAQUE – *dalcetrapib's effects on atherosclerotic disease progression*

dal-VESSEL – *dalcetrapib's effects on vascular function*

DCC – doença cardíaca coronária

DCV – doença cardiovascular

DEFINE – *Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib*

DMT2 – diabetes mellitus tipo 2

- DYSIS – *DYS*lipidemia *I*nternational *S*tudy
- EAM – enfarte agudo do miocárdio
- EC – ésteres de colesterol
- EDSS – *Expanded Disability Status Scale*
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGF – factor de crescimento epidérmico
- EGFR – receptor do factor de crescimento epidérmico
- EM – esclerose múltipla
- EPC – células progenitoras endoteliais
- ERASE – Effect of rHDL on Atherosclerosis-Safety and Efficacy
- ERO – espécies reactivas de oxigénio
- ET-1 – endotelina
- FGF – factor de crescimento de fibroblastos
- FHS – *Framingham Heart Study*
- FIELD – *Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes*
- FRCV – factores de risco cardiovascular
- GM-CSF – factor estimulador de colónias de monócitos-granulócitos
- GPR109A – receptor do ácido nicotínico, da família dos receptores G acoplados à proteína
- HbA1c – hemoglobina glicosilada
- HDL – lipoproteína de alta densidade
- HDL-D – HDL disfuncional
- HF – hipercolesterolemia familiar
- HHS – *Helsinki Heart Study*
- HMG-CoA – 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
- HOMA – modelo de avaliação da homeostase
- HPSC – *Heart Protection Study Collaborative*
- HPS-THRIVE – *Heart Protection Study - Treating High-density Lipoprotein (HDL) Cholesterol to Reduce the Incidence of Vascular Events*
- HSL – lipase hormono-sensível
- HTA – hipertensão arterial
- ICAM-1 – molécula de adesão intercelular de tipo 1
- IDEAL – *Incremental Decrease in End Points Through Aggressive Lipid Lowering*
- IDL – lipoproteína de densidade intermédia

IECA – inibidores da enzima de conversão da angiotensina

IFN – interferão

IGF – factor de crescimento semelhante à insulina

IL – interleucina

ILLUMINATE – *Investigation of Lipid Level Management to Understand Its Impact in Atherosclerotic Events*

ILLUSTRATE – *Investigation of Lipid Level Management using Coronary Ultrasound to Assess Reduction of Atherosclerosis by CETP Inhibition and HDL Elevation*

IMC – índice de massa corporal

IMT – espessura da íntima-média (carotídea ou outra localização arterial)

iNOS – sintetase de monóxido de azoto indutível

IRM – imagem de ressonância magnética

IVUS – ultra-som intravascular

LCAT – lecitina-colesterol aciltransferase

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LDL-ox – LDL oxidadas

LE – lipase endotelial

LH – lipase hepática

L-HDL – HDL grande

Lp(a) – lipoproteína (a)

LPL – lipoproteína lipase

LS-001 – *Lipid Sciences Selective Delipidation Trial*

MAPK – proteína quinase activada por mitogénio

MCP-1 – proteína quimioatraente de monócitos

M-HDL – HDL média

MMP – metaloproteinase

MUFAs – ácidos gordos monoinsaturados

NCEP – *National Cholesterol Education Program*

NEFA – ácidos gordos não esterificados

NF-κB – factor nuclear κB

NO – monóxido de azoto

NPC1L1 – gene Niemann-Pick C1-Like 1

P. Abdominal – perímetro abdominal

- PAD – pressão arterial diastólica
- PAF-AH – acilhidrolase do factor activador das plaquetas
- PAI-1 – inibidor do factor activador do plasminogénio de tipo 1
- PAS – pressão arterial sistólica
- PCR – proteína C reactiva
- PCR_{hs} – proteína C reactiva de alta sensibilidade
- PDGF – factor de crescimento derivado das plaquetas
- PET/CT – tomografia por emissão de positrões/tomografia computacional
- PGI₂ – prostaciclina
- PKA – proteína quinase A
- PL – fosfolípidos
- PLTP – proteína de transferência dos fosfolípidos
- PON – paraoxonase
- PPAR – receptor activado por proliferador de peroxissoma
- PRISMS – *Prevention of Relapses and disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis*
- PROCAM – *Prospective Cardiovascular Münster*
- PUFAs – ácidos gordos poliinsaturados
- PVAT – tecido adiposo perivascular
- RADIANCE – *Randomized Assessment of (the effect of) Digoxin on Inhibitors of the Angiotensin-Converting Enzyme*
- Ras – proteína *RAt Sarcoma vírus*, proteína da família da GTPase
- RBP-4 – proteína de ligação ao retinol 4
- RCV – risco cardiovascular
- RCVR – risco cardiovascular residual
- REVEAL – *Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib Through Lipid-modification*
- rHDL – HDL reconstituídas
- Rho – proteína GTPase, da superfamília da Ras
- rLDL – receptor de membrana das LDL (apoB: apoE)
- RMN – ressonância magnética nuclear
- RXR – receptor retinóide X
- SAA – amilóide sérico A
- SCA – síndrome coronário agudo

SCORE – *Systematic Coronary Risk Evaluation*

sICAM-1 – molécula de adesão intercelular de tipo 1 solúvel

SM – síndrome metabólica

SMCs – células do músculo liso

SNC – sistema nervoso central

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

SR-A – receptor *scavenger*, de classe A

SR-BI – receptor *scavenger*, de classe B, tipo 1

SREBP – proteína de ligação do elemento regulador dos esteróis

sVCAM-1 – molécula de adesão à célula vascular de tipo 1 solúvel

SWS – *South West Seul*

SYNCHRONY – *Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor- α / γ agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes*

TF – factor tecidual

TFPI – inibidor da via do factor tecidual de coagulação

TGs – triglicerídeos

THS – terapêutica hormonal de substituição

TLR – receptores “toll-like”

TNF- α – factor de necrose tumoral α

tPA – ativador tecidual do plasminogénio

TRC – transporte reverso do colesterol

VA-HIT – *Veterans Affairs HDL Intervention Trial*

VCAM-1 – molécula de adesão à célula vascular de tipo 1

VEGF – factor de crescimento endotelial vascular

VLA-4 – antigénio muito tardio-4

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

VL-HDL – HDL muito grande

VS-HDL – HDL muito pequena

VSMC – células do músculo liso vascular

vWF – factor de von Willebrand

WHO – *World Health Organization*

WOSCOPS – *West of Scotland Coronary Prevention Study*

RESUMO

A dislipidemia é um dos factores de risco *major* para a DCV, que está entre as principais causas de morbilidade e mortalidade em muitos países do Mundo, incluindo na Europa. O arsenal terapêutico antidislipidémico actualmente disponível e em utilização clínica, nomeadamente as estatinas, tem permitido grandes avanços no controlo dos valores de c-Total e sobretudo de c-LDL, o que se manifestou numa redução significativa do risco e da mortalidade por DCV. Contudo, essas terapêuticas têm um impacto muito reduzido sobre o c-HDL, existindo um risco CV residual (mas ainda assim muito preocupante e não negligenciável) por controlar e que deve merecer mais atenção e investimento. Dados epidemiológicos suportam a ideia de que a redução do c-HDL é um preditor independente de desenvolvimento de DCV, mas os ensaios clínicos recentes envolvendo novos compostos foram incapazes de demonstrar o impacto esperado a nível da redução da mortalidade CV, não obstante o aumento significativo dos teores de c-HDL. Neste contexto, o conhecimento actual aponta para a necessidade de conhecer melhor as HDL e de encontrar formas de não apenas aumentar os seus conteúdos séricos totais mas, sobretudo, entender o conceito de HDL disfuncional, saber se tem um relacionamento com a DCV e com outros mediadores da aterogénese em populações de risco para que, posteriormente, seja possível modular a sua funcionalidade e assim reduzir de forma mais abrangente a morbilidade e mortalidade por DCV.

Este trabalho pretendeu dar um contributo para a melhoria do conhecimento da relevância das HDL e da sua funcionalidade a nível da DCV aterogénica, tendo como principal objectivo avaliar as implicações relativas das subpopulações de HDL na determinação do perfil cardiometabólico e a sua correlação com outros mediadores (marcadores) do fenómeno aterogénico em populações com factores de risco para DCV.

O trabalho envolveu 4 estudos separados, em populações distintas: 1 – grupo de voluntários controlo (sem factores de risco ou DCV diagnosticada) para avaliar o efeito do género e menopausa; 2 – grupo de doentes diabéticos do tipo 2; 3 - grupo de doentes jovens adultos com esclerose múltipla; 4 – grupo de doentes dislipidémicos com concentrações séricas reduzidas de c-HDL e/ou elevadas de TGs, mas valores normalizados de c-LDL. Os grupos de doentes foram comparados com indivíduos controlo de idade e género comparáveis o mais possível. Foram analisados dados antropométricos (idade, IMC e perímetro abdominal), pressão arterial, perfil glicídico e lipídico, marcadores “não-tradicionais” de perfil lipídico (incluindo subpopulações de HDL, LDL oxidadas e actividade paraoxonase 1), bem como outros marcadores séricos de

inflamação, angionéese, oxidação e disfunção endotelial (PCR_{hs}, TNF- α , adiponectina, VEGF, ácido úrico e ICAM-1).

Os principais resultados obtidos são: 1) Numa população sem diagnóstico prévio de DCV, os homens e as mulheres em pós-menopausa apresentam um perfil lipídico indicativo de um maior risco cardiometabólico; estes resultados ficam mais patentes quando se analisam marcadores de risco “não-tradicionais”, incluindo, entre outros, as subpopulações de HDL (maior percentagem de pequenas e menor de grandes) e as LDL-ox; 2) a diabetes parece anular o efeito CV protector conferido pelo género feminino, traduzindo-se numa degradação da qualidade das HDL, um aumento de TNF- α e de VEGF; para além disso, as mulheres diabéticas quando entram na fase de menopausa apresentam um perfil cardiometabólico mais nefasto, como sugerem a pior qualidade das HDL, o agravamento da obesidade, a hipertrigliceridemia e o aumento do TNF- α ; 3) numa população jovem adulta com esclerose múltipla, existem indicações de um risco cardiometabólico precoce, que fica realçado pelo desequilíbrio entre as subpopulações grandes e pequenas de HDL, pelo aumento de VEGF e principalmente de LDL-ox (relacionado de forma significativa e directa com o estadio da doença); 4) em populações consideradas dislipidémicas, com concentrações séricas reduzidas de c-HDL e/ou elevadas de TGs, ainda que sob medicação apropriada e com os níveis de c-LDL normalizados, o risco CV residual parece ser melhor caracterizado com a ajuda de marcadores “não-tradicionais”, incluindo uma vez mais as subpopulações de HDL e as LDL-ox, mas também a adiponectina e o VEGF.

Como conclusões finais, o trabalho sugere que a medição das subpopulações das HDL é uma informação mais relevante a nível da caracterização do perfil cardiometabólico do que o “tradicional” doseamento do conteúdo sérico total em c-HDL. Mais ainda, as HDL grandes relacionam-se com uma maior protecção e funcionalidade, ao contrário das HDL pequenas que se podem considerar disfuncionais em termos de efeitos ateroprotectores, existindo diversas correlações com outros marcadores clássicos e não tradicionais. O trabalho realça ainda a importância de dar maior atenção a outros biomarcadores cardiometabólicos “não-tradicionais”; no entanto, contrariamente às subpopulações de HDL em que os resultados foram transversais a todas as populações em estudo, estes parecem ser muito mais específicos e relacionadas com cada condição fisiopatológica particular. A confirmação dos resultados deste trabalho poderá contribuir no futuro para melhorar as estratégias de diagnóstico e as medidas terapêuticas de doentes com risco cardiovascular aumentado de forma a ter implicações positivas e significativas na morbidade e mortalidade por DCV.

ABSTRACT

Dyslipidemia is one of the major risk factors for CVD, which is among the leading causes of morbidity and mortality in many countries in the World, including in Europe. The antidyslipidemic therapeutic arsenal currently available and in clinical use, particularly statins, have allowed major advances in the control of Total-c values and above in LDL-c, which was manifested in a significant reduction in the risk and of CV mortality. However, these therapies have little impact on HDL-c, and there is a residual CV risk (but still very disturbing and not negligible) for controlling and that deserves more attention and investment. Epidemiological data support the idea that the reduction of HDL-c is an independent predictor of development of CVD, but recent clinical trials involving new compounds were unable to demonstrate the expected impact in the reduction of CV mortality, despite the significant increase the levels of HDL-c. In this context, the present knowledge points the necessity to better understand the HDL and find ways to not only increase their total serum content but, more importantly, understand the concept of dysfunctional HDL, know if it have a relationship with CVD and other mediators of atherogenesis in populations at risk, for, subsequently be possible to modulate its functionality and thus reduce more comprehensively CV morbidity and mortality.

This work aims to contribute to improving the knowledge of the relevance of HDL and its functionality for atherogenic CVD, with the primary aim of assessing the implications for HDL subpopulations in determining cardiometabolic profile and its correlation with other mediators (markers) of atherogenic phenomenon in populations with CV risk factors.

The work involved four separate studies in distinct populations: 1 - control group of volunteers (no risk factors or diagnosed CVD) to evaluate the effect of gender and menopause; 2 - group of type 2 diabetic patients; 3 - group of young adults patients with multiple sclerosis, 4 - group of dyslipidemic patients with low serum HDL-c and/or high TGs but normalized values of LDL-c. Patient groups were compared with control subjects matched for age and gender as much as possible. Anthropometric data (age, BMI and waist circumference), blood pressure, glucose and lipid profile, "non-traditional" markers of lipid profile (including subpopulations of HDL, oxidized LDL and paraoxonase 1 activity) were analyzed, as well as other serum markers of inflammation, angionenesis, oxidation and endothelial dysfunction (*hsCRP*, $\text{TNF-}\alpha$, adiponectin, VEGF, uric acid and ICAM-1).

The main results are: 1) a population without a previous diagnosis of CVD, men and postmenopausal women have a lipid profile indicative of a greater cardiometabolic

risk; these results are more apparent when analyzing "non-traditional" risk markers including, among others, subpopulations of HDL (higher percentage of small and lower of large) and ox-LDL; 2) diabetes seems to abrogate the CV protective effect conferred by female gender, traduced into a degradation of HDL quality, increase of TNF- α and VEGF, and moreover, diabetic women when they enter in menopause phase have a more ominously cardiometabolic profile, as suggested by the poorer HDL quality, the worsening of obesity, hypertriglyceridemia and increased TNF- α ; 3) in a young adult population with multiple sclerosis, there are indications of early cardiometabolic risk, which is highlighted by the imbalance between large and small subpopulations of HDL, increased VEGF and especially ox-LDL (significantly and directly related with the disease stage); 4) dyslipidemic populations with reduced HDL-c and/or high TGs serum concentrations, although under appropriate medications and LDL-c standard levels, the CV residual risk seems to be better characterized with the aid of "non-traditional" markers, including again subpopulations of HDL and oxidized LDL, but also adiponectin and VEGF.

As final conclusions, the study suggests that measurement of HDL subpopulations is more relevant information of cardiometabolic profile characterization than determination of the "traditional" total HDL-c serum level. Furthermore, large HDL are related to better protection and functionality, as opposed to the small HDL that may be considered dysfunctional in terms of atheroprotective effects, both correlated with other classical and non-traditional markers. The work also highlights the importance of giving more attention to other "non-traditional" cardiometabolic biomarkers; however, contrary to HDL subpopulations in which the results were present in all study populations, these biomarkers seem to be much more specific and related for each particular pathophysiological condition. The confirmation of the results of this work can contribute in future to improve diagnostic strategies and therapeutic measures for patients at increased cardiovascular risk in order to have significant positive implications on CV morbidity and mortality.

PARTE I

INTRODUÇÃO GERAL E OBJECTIVOS

Capítulo 1

Aterosclerose

1.1 – Aterosclerose: resenha histórica da evolução do conceito

A aterosclerose deriva das palavras gregas *athero* (ou seja, papa ou pasta) e *sclerosis* (dureza). É um termo genérico para descrever qualquer endurecimento das artérias médias e grandes, com a conseqüente perda de elasticidade. A aterosclerose é considerada como sendo a causa mais comum de morbidade e mortalidade cardiovascular nas sociedades ocidentais (Roger e col., 2011; Scholte e col., 2004) e prevê-se que seja a principal causa de morte a nível Mundial em 2020 (Murray e Lopez, 1997). A doença começa na adolescência e progride silenciosamente ao longo da vida, podendo manifestar-se através de enfarte agudo do miocárdio (EAM) ou de acidente vascular cerebral (AVC), a partir da 4ª década de vida. Inicialmente foi vista sobretudo como uma doença degenerativa, conseqüência inevitável do envelhecimento secundário à acumulação de lípidos na parede arterial, resultando no estreitamento do lúmen, mas o conceito foi evoluindo ao longo do tempo até aos dias de hoje.

Em 1983, Anitschkow e Chalutow mostraram que uma alimentação rica em colesterol em coelhos rapidamente produz uma doença ateromatosa semelhante à encontrada no homem, dando origem à "teoria lipídica" da aterosclerose. Na década de 50, estudos (Gofman e Lindgren, 1950; Gofman, 1956) mostraram que as fracções específicas de colesterol, tais como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), eram as responsáveis pela rápida progressão da aterosclerose em humanos. No início dos anos 80, Brown e Goldstein (1983) mostraram que as LDL circulantes sofrem algumas modificações estruturais antes de se tornarem totalmente pró-aterogénicas, nomeadamente a oxidação, aspecto que tem um papel importante na iniciação/progressão da lesão. Nas últimas três décadas do século 20, Ross e Glomset (1973) propuseram a "hipótese da resposta à lesão" e descreveram a aterosclerose como uma conseqüência de agressões mecânicas, de toxinas e de radicais livres ao revestimento endotelial da parede arterial (Ross, 1993).

O endotélio é um órgão importante que modula o tónus vasomotor, a inflamação e a trombose (Cines e col., 1998; Gross e Aird, 2000; Bombeli e col., 1997; Davignon e Ganz, 2004). Sob condições normais, o revestimento endotelial tem um fenótipo anti-aderente e anti-trombótico (Behrendt e Ganz, 2002), mas altos níveis de LDL nativas ou modificadas, radicais livres, microorganismos, tensão de cisalhamento, hipertensão e

resistência à insulina podem alterar o fenótipo do endotélio para propriedades pró-adesivas e pró-trombóticas.

A susceptibilidade à aterosclerose depende de factores potencialmente controláveis, tais como hipercolesterolemia, dieta, alterações no metabolismo da glicose, hipertensão, tabagismo, falta de exercício, hiperhomocisteinemia, infecções, mas também de factores de risco não-modificáveis, tais como factores genéticos, idade e sexo. O conhecimento da influência destes factores no desenvolvimento da aterosclerose, bem como das suas características fisiopatológicas a nível celular e molecular, evoluiu muito nos últimos anos e permitiu alguns avanços, ainda não totalmente satisfatórios, ao nível da prevenção e tratamento da doença.

1.2 – Fisiopatologia da aterosclerose: características essenciais e principais mediadores

A aterosclerose é uma doença de carácter progressivo, de etiologia complexa, caracterizada pela acumulação de lípidos e elementos fibrosos nas artérias de grande calibre (Lusis, 2000). Tradicionalmente a aterosclerose foi conceptualizada num modelo simplista de doença progressiva crónica cujas manifestações decorriam da oclusão total ou quase total do lúmen arterial (McConnell e Klinger, 2006). Contudo, a evidência de que as complicações cardiovasculares resultantes da aterosclerose geralmente envolvem lesões não estenóticas contribuiu decisivamente para a alteração dos conceitos subjacentes à fisiopatologia aterosclerótica (Libby, 1995). Nas últimas décadas, a aterosclerose deixou de ser vista como uma simples “doença de lípidos” para passar a ser entendida como um processo dinâmico e progressivo procedente de disfunção endotelial e de inflamação da parede vascular que pode levar a um evento agudo por ruptura de placa ou trombose (Ross, 1993).

A placa aterosclerótica caracteriza-se pelo espessamento focal assimétrico da íntima arterial em consequência da acumulação de detritos necróticos ricos em lípidos e da migração e proliferação de células musculares lisas. Células inflamatórias e células imunes provenientes do sangue são também parte importante da placa aterosclerótica (Hansson, 2005; Lusis, 2000). Esta possui tipicamente um “chapéu fibroso”, formado por células musculares lisas e matriz extracelular, que compreende o “núcleo necrótico” rico em

lípidos. As placas ateroscleróticas podem tornar-se mais complexas, com calcificação e ulceração para a superfície luminal. Apesar da placa aterosclerótica poder aumentar de tamanho podendo obstruir o fluxo sanguíneo, as principais complicações clínicas da aterosclerose decorrem da oclusão aguda do vaso sanguíneo devido à formação de um trombo ou coágulo sanguíneo que, dependendo da localização, pode resultar, por exemplo, em enfarte agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral (Hansson, 2005; Lulis, 2000).

A coexistência no mesmo indivíduo de placas estenóticas (constritivas) e não-estenóticas (expansivas) sugere que a evolução da placa é bem mais complexa do que a simples acumulação de lípidos com conseqüente diminuição do lúmen vascular. De facto, a magnitude da reacção inflamatória na parede vascular em resposta à acumulação de lípidos, condicionada por factores locais (*shear stress*) sistémicos (como por exemplo a hiperlipidemia) e genéticos, parece determinar a evolução da placa (Chatzizisis, 2007). A perpetuação da resposta inflamatória com a contínua remodelação vascular tende a fragilizar a parede vascular, originando, desta forma, placas expansivas sem diminuição do lúmen vascular (Chatzizisis, 2007). Sendo muito mais susceptíveis à ruptura, estas placas “vulneráveis” são a principal causa de eventos cardiovasculares agudos. De facto, a vulnerabilidade da placa parece ser dependente do processo inflamatório vascular, sendo determinada pelo conteúdo inflamatório do “núcleo necrótico” e pela espessura do “chapéu fibroso” (Lulis, 2000).

As lesões ateroscleróticas podem evoluir de forma crónica e difundir-se virtualmente a toda a árvore arterial, embora prevalecendo em determinados sectores mais do que noutros, especialmente nas artérias coronárias (Vink e col., 2002). As lesões ateroscleróticas, tal como anteriormente referido, são lesões focais não atingindo toda a artéria. Diferenças na dinâmica do fluxo sanguíneo concorrem para a existência de zonas de tensão hemodinâmica, com fluxo turbulento, sendo estes os locais de eleição para o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. Estes locais são geralmente regiões de bifurcação vascular nas quais se verifica a transição de regime de fluxo laminar para turbulento, como por exemplo os segmentos proximais das artérias coronárias. O padrão hemodinâmico típico de locais susceptíveis de ocorrência de lesão aterosclerótica caracteriza-se por baixo *shear stress* médio, mas elevado *shear stress* oscilatório (McConnell e Klinger, 2006; Leitinger, 2003). Nestes locais, ocorre o aumento da

expressão e da activação de moléculas de adesão e genes inflamatórios nas células endoteliais (Dai, 2004). Efectivamente, estando toda a árvore vascular sujeita à acção deletéria dos factores de risco de um modo sensivelmente igual, não é de estranhar que seja o padrão hemodinâmico a determinar os sítios preferenciais para a formação de lesões. Nesses locais verifica-se um aumento do tempo de exposição do endotélio a vários agentes aterogénicos em circulação, tais como as lipoproteínas (Kadar e Glasz, 2001). Consequentemente, a prolongada e/ou repetitiva exposição de determinada zona do endotélio ao agente agressor pode levar à exaustão das defesas de protecção endotelial e, conseqüentemente, induzir disfunção endotelial nesse local e, concomitantemente, promover a formação de placa aterosclerótica (Ross, 1993).

Na patologia vascular relacionada com a aterosclerose, tal como na manutenção da homeostasia vascular, o papel desempenhado pela célula endotelial é fundamental. A disfunção endotelial está presente em todas as etapas da progressão da aterosclerose sendo considerada um factor chave desta patologia. O termo “disfunção endotelial” refere-se a um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tónus vascular, a agregação plaquetária, a coagulação e a fibrinólise (Mombouli e Vanhoutte, 1999). Pelo facto do tónus vascular ser o aspecto mais estudado, o termo disfunção endotelial é frequentemente referido para designar a diminuição da vasodilatação dependente do endotélio, causada pela diminuição da biodisponibilidade em NO (Mombouli e Vanhoutte, 1999). A disfunção endotelial caracteriza-se por alteração do fenótipo endotelial em condições fisiológicas basais (vasorelaxante, anticoagulante, anti-plaquetário e pró-fibrinolítico) para um fenótipo vasoconstritivo, pró-coagulante, activador das plaquetas e anti-fibrinolítico (Constans e Conri, 2006), podendo induzir oxidação de lipoproteínas, proliferação de células musculares lisas, deposição ou lise da matriz, e inflamação vascular com activação plaquetária e formação de trombos (Corti, 2004). Na presença de factores de risco cardiovascular, funcionando como fonte de agressão endotelial, as células endoteliais libertam em menor quantidade NO, PGI₂, trombomodulina e tPA e em maior quantidade ET-1, angiotensina II, PAI-1 e vWF, promovendo o desequilíbrio funcional responsável pela alteração do seu fenótipo citoprotector.

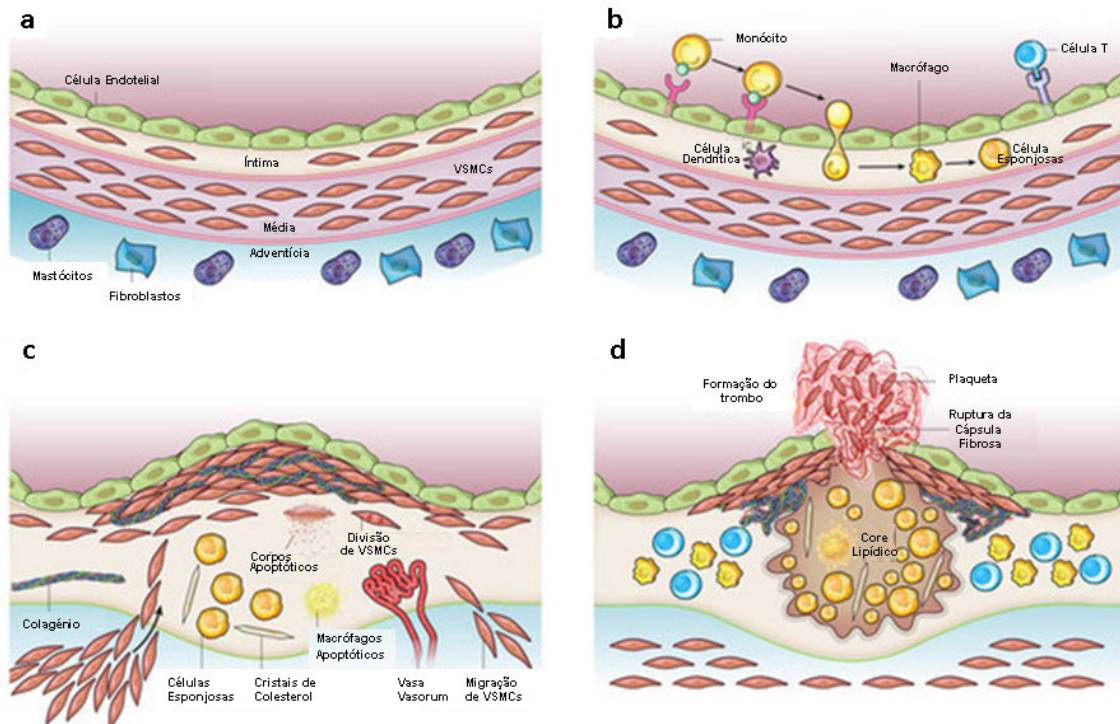


Figura 1.1 – Estágios do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. A artéria muscular normal e as alterações celulares que ocorrem durante a progressão da doença para trombose são ilustradas. a) a artéria normal contém três camadas. A camada interna, a túnica íntima, é revestida por uma monocamada de células endoteliais que está em contacto com o sangue que recobre a membrana basal. Em contraste com muitas espécies de animais utilizados em experiências de aterosclerose, a íntima humana contém células musculares lisas residentes (SMCs). A camada média ou túnica média, contém SMCs embebidas numa matriz extracelular complexa. Artérias afectadas pela aterosclerose obstrutiva geralmente têm a estrutura das artérias musculares. As artérias frequentemente estudadas na aterosclerose experimental são artérias elásticas, que têm claramente demarcadas lâminas na túnica média, onde existem camadas de elastina entre os estratos de SMCs. A adventícia, a camada externa das artérias, contém mastócitos, terminações nervosas e microvasos. b) os passos iniciais da aterosclerose incluem adesão de leucócitos no sangue para a monocamada do endotélio activada, migração dos leucócitos para a íntima, maturação de monócitos (a maior parte dos leucócitos recrutados) em macrófagos, e a sua captação de lípidos, produzindo células espumosas. c) a progressão da lesão envolve a migração de células musculares lisas da túnica média para a íntima, a proliferação de células musculares lisas residentes da íntima e SMCs derivadas da túnica média, e a síntese aumentada de macromoléculas extracelulares da matriz tais como colagénio, elastina e proteoglicanos. As placas de macrófagos e células musculares lisas podem morrer em lesões avançadas, algumas por apoptose. Os lípidos extracelulares derivadas de células já mortas e a morrer podem acumular-se na região central de uma placa, muitas vezes denotado como núcleo lipídico ou necrótico. Placas avançadas também contêm cristais de colesterol e microvasos. d) a trombose, a complicação final da aterosclerose, muitas vezes complica a ruptura física da placa aterosclerótica. É mostrada uma fratura da capa fibrosa da placa, que permitiu que os componentes da coagulação do sangue entrem em contacto com os factores teciduais no interior da placa, provocando o trombo que se estende para o lúmen do vaso, onde pode impedir o fluxo de sangue. Adaptado de Libby et col., 2011.

A disfunção endotelial focal permite a infiltração e retenção de LDL sérica na íntima arterial iniciando-se uma resposta inflamatória. Uma vez na íntima as LDL são

modificadas por oxidação ou ataque enzimático, promovendo a libertação de fosfolípidos, que podem também estimular as células endoteliais a expressar as moléculas de adesão celular (como por exemplo a VCAM-1 e a ICAM-1) e a produzir factores de crescimento, incluindo o factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (McConnell e Klinger, 2006; Leitinger, 2003). As CAMs medeiam a entrada na parede vascular de leucócitos específicos, monócitos e linfócitos, nos locais lesão/disfunção endotelial (Hansson, 2005; Lusis, 2000). Na íntima, o GM-CSF estimula os monócitos a transformarem-se em macrófagos, os quais têm um importante contributo na resposta inflamatória local ao produzirem citocinas inflamatórias, quimioquinas e radicais livres de oxigénio. Adicionalmente, a secreção de metaloproteinase (MMP) pelos macrófagos contribui para a remodelação da parede vascular e eventualmente para a ruptura da placa. As moléculas acima mencionadas iniciam e amplificam a resposta celular promovendo a inflamação vascular de baixa intensidade, a trombose, o progressivo espessamento da íntima e, conseqüentemente, a formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica, a qual, em última instância, pode sofrer ruptura e originar manifestações clínicas (Lusis, 2000; Ross, 1999). Em síntese, a alteração da funcionalidade endotelial com conseqüente perda da sua capacidade protectora é um componente *major* na promoção da aterosclerose, da trombose e conseqüentemente de eventos cardiovasculares.

1.3 – Factores de risco de doença cardiovascular aterogénica: um mosaico em evolução

A pesquisa conduzida ao longo dos últimos 50 anos tem permitido um progresso notável na compreensão dos factores que contribuem para a aterogénese precoce e para o desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV). Estudos epidemiológicos, básicos e pré-clínicos, assim como ensaios clínicos, têm levado à identificação de factores de risco chave não modificáveis e modificáveis para a DCV que incluem idade, sexo, história familiar de doença cardiovascular prematura/factores genéticos, assim como dislipidemia, obesidade, diabetes, hipertensão, infecções, tabagismo, sedentarismo, dieta, hiperhomocisteinemia, entre outros, respectivamente (Cullen e col., 1998; Kannel e

col., 1964; Lamarche e col., 1996; Yusuf e col., 2004; Stamler e col., 1986). A capacidade destes factores de risco para diferenciar entre indivíduos de baixo e alto risco tem sido tal que vários preditores de risco global (como o *Framingham, Prospective Cardiovascular Münster* [PROCAM], *Systematic Cerebrovascular and Coronary Risk Evaluation* [SCORE], etc.) os têm usado para estimar o risco de doença cardiovascular global, apesar de continuar a ser o *Framingham risk score* o mais utilizado (Wilson e col., 1998; Assmann e col., 2007; Conroy e col., 2003). Para além disso, o desenvolvimento de fármacos poderosos para diminuir o colesterol e a pressão arterial juntamente com campanhas e regulamentos agressivos de combate ao tabagismo, têm contribuído para reduzir a mortalidade por doenças cardiovasculares em cerca de 50% ao longo de algumas décadas, o que tem sido um ganho notável (Ford e col., 2007; Manuel e col., 2003). No entanto, apesar de tal progresso na redução da mortalidade por DCV, não há nenhuma evidência de que tenha ocorrido um declínio de magnitude similar para a morbilidade por DCV (Mozaffarian, 2011). Por ser mais fácil agora reconhecer os sintomas da DCV, tem havido mais rapidez e um melhor acesso à assistência médica, desenvolvimento de inúmeros procedimentos em cardiologia intervencionista e cirurgia cardiovascular, melhorando a gestão médica e farmacológica, resultando numa maior proporção de pacientes, com manifestações clínicas avançadas de DCV, a quem se tem, felizmente, mantido/prolongado a vida. Como consequência, este fenómeno trocou, no entanto, a curva de mortalidade por DCV para morbilidade por DCV (Mozaffarian, 2011). Tem sido argumentado que a abordagem médica actual é cara e bastante ineficiente para combater globalmente a DCV (Mozaffarian, 2011) e que, por isso, deve ser dada mais atenção a factores de risco que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Entre esses factores, têm sido feitos esforços significativos na prevenção primária relacionada com a cessação do tabagismo e também tem havido progressos na avaliação e gestão da dislipidemia/hipertensão, em grande parte porque os médicos têm agora acesso a fármacos cada vez mais eficazes para reduzir substancialmente o c-LDL e a pressão arterial (Baigent e col., 2005; Kearney e col., 2008; Onysko e col., 2006).

No entanto, os médicos também se têm deparado com um aumento progressivo na proporção de doentes caracterizados por excesso de peso/obesidade, especialmente na sua forma mais elevada de risco: obesidade abdominal. Esse aumento acentuado na

prevalência de excesso de peso/obesidade deve ser encarado como um marcador de como os nossos hábitos de vida "evoluíram". Por exemplo, o ambiente que temos construído para nós mesmos tem favorecido o consumo excessivo de alta densidade energética, alimentos altamente processados (que se tornaram a escolha mais fácil, também pela oferta comercial avassaladora) (James, 2008; Poston e Foreyt, 1999). Este fenómeno, combinado com a redução da actividade física ocupacional e falta de exercício regular durante o tempo de lazer, levou a um rápido aumento na prevalência de obesidade e da sua estreita consequência metabólica: a diabetes tipo 2. Considerando que o excesso de peso/obesidade é agora a norma e não a excepção, no Canadá, cerca de 2,5 milhões de canadianos têm DMT2 (Ohinmaa e col., 2004), enquanto que cerca de 20% a 25% da população adulta sedentária não sabe que estão em maior risco para desenvolver DMT2 e doenças cardiovasculares, por terem evidências de obesidade abdominal e outras anomalias metabólicas frequentemente referidas como síndrome metabólica (Riediger e Clara, 2011). Assim, o mosaico de factores de risco modificáveis para DCV mudou ao longo de algumas décadas e a nossa capacidade para os modular/controlar também: temos sido relativamente melhor sucedidos em relação ao tabagismo, bastante convincentes na necessidade de controlar os níveis elevados de colesterol e hipertensão, mas actualmente estamos a passar por um *tsunami* de obesidade e DMT2 impulsionado pelos nossos hábitos de vida menos saudáveis, que são os comportamentos padrão de uma sociedade destinada a incentivar maus hábitos alimentares e comportamentos sedentários. Abordaremos ao longo deste capítulo vários factores de risco não modificáveis e modificáveis para a DCV, dando principal realce aos que actualmente sobressaem em termos de importância e de prevalência, no contexto específico deste trabalho.

1.3.1 - Factores de risco modificáveis

1.3.1.1 – Dislipidemia

Para melhor perceber o papel da dislipidemia como factor de risco de DCV aterosclerótica torna-se fundamental, antes de mais, conhecer a estrutura, composição e metabolismo das lipoproteínas envolvidas neste processo.

a) Estrutura e composição das lipoproteínas

Em geral, as lipoproteínas são compostas por um núcleo hidrófobo de lípidos neutros, ou seja, ésteres de colesterol (EC) e TGs, rodeado por uma monocamada superficial anfipática de fosfolípidos com os ácidos gordos voltados para o núcleo da partícula. As apolipoproteínas e o colesterol livre são incorporados dentro da superfície de fosfolípidos da camada exterior.

A componente proteica confere funções únicas para cada classe de lipoproteínas, orientando a estrutura da partícula, a interacção das partículas com os receptores da superfície celular, podendo actuar como cofactor para as enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas (Rader e Brewer, 1994; Mahley e col., 1984). As apolipoproteínas também mantêm a estrutura das lipoproteínas, estabilizando a sua estrutura micelar (Mahley e col., 1984).

As lipoproteínas são altamente heterogéneas em relação ao tamanho, estrutura, densidade e propriedades imunológicas (Krauss e Burke, 1982). Com base na densidade para a qual elas flutuam por ultracentrifugação, as lipoproteínas são divididas em cinco classes principais: as quilomicra são as maiores e menos densas e por ordem crescente de densidade podem ser encontradas as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermédia (IDL), LDL e HDL. Dois tipos básicos de lipoproteínas têm sido considerados: as lipoproteínas micelares e as lipoproteínas pseudomoleculares (Schumaker e Adams, 1969). O tipo micelar contém menos de 30% de proteínas e inclui as quilomicra, VLDL e LDL. Pensa-se que consistem num núcleo hidrofóbico de TGs e EC rodeado por uma camada hidrofílica de proteínas, fosfolípidos e colesterol livre. O tipo pseudomolecular contém mais de 30% de proteína e inclui HDL.

b) Metabolismo das lipoproteínas

O metabolismo das lipoproteínas envolve a produção, o transporte e a remoção do colesterol e de TGs da circulação, embora a separação do metabolismo destes lípidos seja artificial, pois ambos são transportados em lipoproteínas. O transporte lipídico descreve o transporte "directo/principal" e o "reverso" do colesterol. Três vias são as principais responsáveis pela geração e transporte de lípidos no interior do corpo. O transporte "directo/principal" indica a chegada de colesterol ao sangue através da dieta

(via exógena) e do fígado (via endógena) e o transporte de volta para o fígado, enquanto que o transporte "reverso" do colesterol (TRC) é a circulação de colesterol no sentido oposto, o efluxo a partir dos tecidos periféricos de volta para o fígado. São vias interdependentes e distúrbios numa irão afectar a função e os produtos da outra.

As quilomicra são as lipoproteínas maiores e são sintetizadas, estruturadas e secretadas nas células epiteliais do intestino para o transporte de TGs e colesterol da dieta a partir do local de absorção para as várias células do corpo (Figura 1.2) (Gustafson, 1966). Portanto, as quilomicra são as moléculas formadas para mobilizar lípidos da dieta (via exógena). A principal apolipoproteína estrutural das quilomicra é a apoB-48, enquanto outras podem ser encontradas em pequenas quantidades.

O catabolismo das quilomicra ocorre nas superfícies endoteliais dos capilares no tecido adiposo e muscular: os TGs no núcleo das quilomicra são hidrolisados em ácidos gordos livres e glicerol, pela acção da lipoproteína lipase (LPL) (Goldberg e col., 1990). Estes ácidos gordos livres podem ser em seguida absorvidos pelos tecidos, usados como fonte de energia por várias células ou tomados por adipócitos e armazenados como TGs. Após a acção da LPL, as quilomicra diminuem de tamanho tornando-se quilomicra remanescentes com núcleos de lípidos, tendo uma concentração relativamente elevada de EC. As quilomicra remanescentes são absorvidas pelas células do fígado através de endocitose mediada pelo receptor por um processo equivalente ao mecanismo de absorção das LDL e são ainda metabolizados por lipases hepáticas (LH), libertando o colesterol para o retículo endoplasmático, onde se torna parte do conjunto do colesterol celular (Hussain, 2000; Hussain e col., 2005). Este colesterol pode ser utilizado para a síntese de ácidos biliares ou reesterificado pela acilcoenzima A-colesterol aciltransferase (ACAT) e englobado juntamente com TGs dentro das partículas de VLDL.

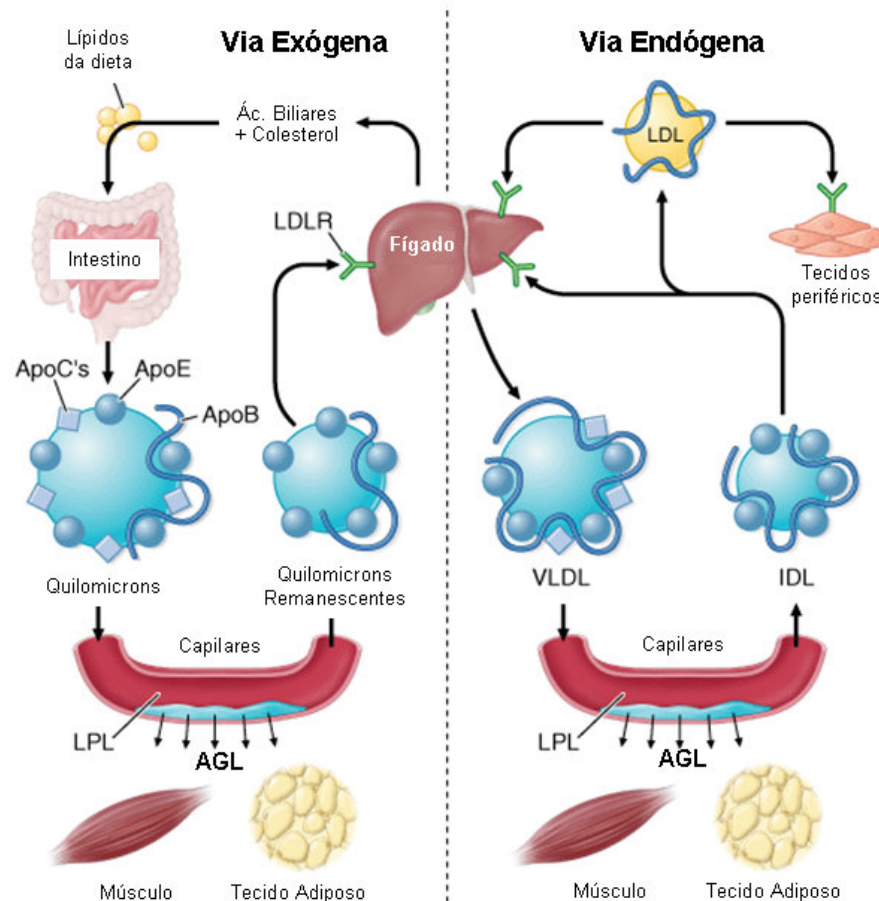


Figura 1.2 – Resumo do metabolismo das lipoproteínas: (1) transporte dos lípidos da dieta (via exógena). Os lípidos da dieta são secretados das células intestinais em quilomícrons, um processo que requer apolipoproteína B (apoB). O triglicérido (TG) dentro dos quilomícrons é hidrolisado pela lipoproteína lipase (LPL) com a apolipoproteína C-II (apoC-II) como cofactor, produzindo um quilomícron remanescente o qual é captado pela proteína relacionada com o receptor LDL (LRP) no fígado; (2) via endógena. As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) são partículas ricas em TGs secretadas pelo fígado. Após sofrerem hidrólise pela LPL, as VLDL são convertidas em lipoproteínas de densidade intermédia (IDL). O fígado, pela via de interacção da apoE com o receptor LDL, traz algumas das partículas de IDL; outras são hidrolisadas pela lipase hepática (LH) para produzir lipoproteína de baixa densidade (LDL) rica em ésteres de colesterol (EC). A LDL pode ser removida pelo fígado pela via do receptor de LDL ou entregar EC em tecidos periféricos como nos macrófagos. Adaptado de Rader e Hobbs, 2008.

A via endógena do metabolismo das lipoproteínas refere-se à secreção hepática e ao metabolismo das VLDL, IDL e LDL (Figura 1.2). As VLDL são partículas ricas em TGs com pequenas quantidades de EC, fosfolípidos, apoB-100 e outras apolipoproteínas sintetizados pelo fígado (Gibbons, 1990). A apoB-100, também sintetizada pelo fígado, é essencial para a constituição das partículas de VLDL e para a sua secreção na circulação (Borchardt e Davis, 1987; Olofsson e Borèn, 2005). Tal como as quilomícras, as VLDL adquirem na corrente sanguínea apoC e apoE das HDL. Dentro do compartimento do plasma, os TGs das VLDL são hidrolisados pela LPL para ácidos gordos livres, gerando uma

série de pequenas lipoproteínas enriquecidas em colesterol. Os ácidos gordos livres podem ser entregues a células do músculo cardíaco ou esquelético para β -oxidação ou ao tecido adiposo para ressíntese e armazenamento de TGs. As partículas de VLDL em circulação tornam-se progressivamente menores à medida que o núcleo é removido por lipólise enquanto que materiais da superfície, incluindo fosfolípidos, colesterol livre, apoC e algumas apoE são transferidos para as HDL. As VLDL remanescentes menores são libertadas da superfície de células endoteliais e tornam-se IDL.

As IDL são essencialmente compostas por EC, e uma pequena percentagem de TGs, tendo apoB-100 e apoE como principais apolipoproteínas. A IDL pode tornar-se ainda mais enriquecida por EC provenientes das HDL por mediação da proteína de transferência dos ésteres de colesterol (CETP). A IDL tem dois destinos metabólicos após interacção com LH: 1) ser captada pelos hepatócitos após ligação ao receptor das LDL num processo mediado tanto por apoB-100 como apoE, ou 2) estar sujeita a uma maior actividade da lipase continuando a perder os TGs e ser libertada na circulação como LDL (Friedman e col., 1990). Nos seres humanos esta é a via predominante e a apoE é perdida para as HDL durante ambos os processos.

As LDL são as lipoproteínas enriquecidas com colesterol, essencialmente EC, fosfolípidos, pequenas quantidades de TGs, e apoB-100 (o único componente proteico das LDL) que constitui a parte restante da partícula. Em comparação com a VLDL inicialmente segregada, que tem um tamanho variável entre 35-80 nm, as partículas de LDL são muito menores, com um diâmetro médio de 22 nm, o que lhes permite atravessar o endotélio vascular e entrarem no tecido fluido entregando o colesterol para os tecidos. As LDL entregam EC para as células periféricas (extra-hepáticas) (cerca de 1/3 de LDL que é produzida por dia) ou para dentro dos hepatócitos do fígado (cerca de 2/3 de LDL que é produzida por dia). Partículas de LDL são transferidas da circulação para o fígado e para os tecidos periféricos através de duas vias: 1) a via do receptor das LDL que é regulada de acordo com a exigência de colesterol de cada célula individual; 2) vias não-mediadas por receptores que dependem quase inteiramente das concentrações extracelulares de LDL.

O receptor das LDL é uma glicoproteína transmembranar de cadeia simples que é expressa principalmente pelos hepatócitos (75%), mas também está presente no tecido adrenal e adiposo. Embora seja capaz de se ligar às lipoproteínas que contêm apoE, o

receptor das LDL normalmente liga-se às lipoproteínas que contêm apoB-100, em particular as LDL. Após a ligação, o complexo ligando-receptor de LDL é internalizado na célula por endocitose, onde é submetido a degradação lisossômica das partículas de LDL. A apoB é hidrolisada nos seus aminoácidos constituintes e os EC são hidrolisados a colesterol livre pela lipase ácida. O colesterol livre é libertado para o citoplasma, onde é reesterificado pela ACAT, e armazenado como EC, reutilizado para síntese de lipoproteínas ou convertido em ácidos biliares e vitamina D (Goldstein e Brown, 2009). Depois disto, o receptor é reciclado de volta para a superfície da célula e é novamente capaz de se ligar a lipoproteínas. Os níveis de expressão dos receptores de LDL são regulados por um controlo de *feedback* sensível através do conteúdo intracelular de colesterol dos hepatócitos e da necessidade de colesterol. Os níveis de transcrição do gene do receptor de LDL são controlados por promotores com elementos reguladores de esteróis, a estimulação deste mecanismo provoca a libertação de proteínas de ligação do elemento regulador dos esteróis (SREBP) que se ligam ao ADN e interceptam a transcrição (Horton e col., 2003).

O excesso de colesterol celular, como aconteceu por exemplo após o consumo elevado na dieta de gordura saturada e colesterol, regula negativamente o receptor de LDL, o que diminui a absorção de LDL e, conseqüentemente, resulta em níveis elevados de c-LDL no plasma e acumulação de colesterol nas células periféricas. O excesso de colesterol também induz a supressão de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase microssomal, a enzima limitante da biossíntese do colesterol (Goldstein e Brown, 1990).

Através da via não-mediada por receptores, o LDL liga-se às membranas celulares em sítios diferentes daqueles em que os receptores de LDL se encontram e uma parte dele passa através da membrana por pinocitose. O HDL é capaz de competir com o LDL para este tipo de associação da membrana celular. Para além disso, o LDL pode também ser removido da circulação através de uma série de outros receptores que não os receptores clássicos de LDL, os receptores *scavenger* (CD36 e SR-A) que são responsáveis pela depuração de apenas relativamente pequenas quantidades de LDL. Uma vez que eles se ligam a LDL modificadas e estão principalmente presentes nos macrófagos ganharam um interesse considerável porque podem ter um papel central na aterogénese.

Além das vias exógenas e endógenas já explicadas, o transporte lipídico também tem uma importante terceira via, o TRC. As partículas de HDL têm a capacidade para mediar o efluxo de colesterol celular, actuando como aceitadores primários, facilitando assim o TRC, um processo em que o colesterol é transferido dos tecidos periféricos, incluindo dos macrófagos na parede arterial, para o fígado para excreção pela biliar (Lewis e Rader, 2005; Krimbou e col., 2006). Como as partículas de HDL são o principal interesse desta dissertação estas serão descritas em maior detalhe no capítulo 2, incluindo a via do TRC, uma vez que é considerado um dos mecanismos mais importantes através do qual as partículas de HDL protegem contra a aterosclerose.

c) Dislipidemia e doença cardiovascular aterosclerótica

O metabolismo lipídico pode ser perturbado de diferentes formas, levando a alterações na função das lipoproteínas do plasma e/ou nos seus níveis. Isto, por si só e/ou através da interacção com outros factores de risco cardiovascular (CV), pode afectar o desenvolvimento da aterosclerose.

A forma mais comum de dislipidemia é caracterizada por três anormalidades lipídicas: elevadas concentrações de TGs e de c-LDL e baixos níveis de c-HDL (Austin e col., 1998; Grunty, 1998; Krauss, 1998). Segundo o NCEP ATP III de 2012 (*National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III*), os valores recomendados para os parâmetros lipídicos num indivíduo “normal” são actualmente: c-Total < 200 mg/dL (5,16 mmol/L), c-LDL < 100 mg/dL (2,58 mmol/L), TGs < 150 mg/dL (1,69 mmol/L), c-HDL ≥ 60 mg/dL (1,55 mmol/L), em ambos os sexos, e c-nHDL < 130 mg/dL (3,35 mmol/L).

A prevalência de hiperlipidemia e doenças cardiovasculares (DCV) aumenta como uma consequência do aumento da ingestão de nutrientes nas sociedades ocidentais, onde a dieta normal contém uma elevada percentagem de gordura e colesterol. A hiperlipidemia é um factor de risco importante para o desenvolvimento da aterosclerose e é caracterizada por um aumento dos valores séricos de colesterol e TGs. Estes lípidos são transportados por lipoproteínas “aterogénicas” (quilomicra, VLDL, as suas lipoproteínas remanescentes e LDL), que podem entrar na parede arterial e acumular-se no seu interior, causando assim a deposição de lípidos e iniciando a aterosclerose prematura (Ross e Harker, 1976). A LDL é propensa a modificações oxidativas, por exemplo, por espécies reactivas de oxigénio (ERO), resultando nas LDL oxidadas (LDL-ox),

que podem induzir a activação das células endoteliais na parede do vaso. As LDL-ox também podem ser captadas pelos receptores *scavenger* dos macrófagos, tais como o receptor *scavenger* A (SR-A) e CD36, transformando os macrófagos em células espumosas, contribuindo para a formação das chamadas “placas ateroscleróticas espumosas”.

O aumento de colesterol total (c-Total) e de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (c-LDL) têm recebido maior atenção, principalmente porque podem ser modificados por alterações do estilo de vida e terapêuticas medicamentosas. A evidência que mostra que a redução de c-Total e c-LDL pode prevenir doenças cardiovasculares é forte e convincente, com base em resultados de vários ensaios clínicos randomizados. Os níveis de c-LDL e de c-Total continuam, portanto, a constituir os principais alvos da terapêutica. Para além de uma elevação dos níveis de c-Total e c-LDL, vários outros tipos de dislipidemias parecem predispor para DCV prematura. Um padrão específico, denominada tríade lipídica aterogénica, é mais comum do que outros, e consiste na coexistência do aumento das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) remanescentes que se manifesta com um ligeiro aumento dos TGs, do c-LDL e redução do c-HDL.

A LDL, devido à sua composição molecular é particularmente susceptível à oxidação sendo a LDL oxidada considerada um dos componentes pró-inflamatórios mais fortes das placas vulneráveis (Nishi e col., 2002). Uma partícula de LDL transporta cerca de 600 moléculas de colesterol livre (CL), 1600 moléculas de ésteres de colesterol (EC), 700 moléculas de fosfolípidos (PL), e 185 moléculas de triglicérides (TGs) (Gotto e col., 1986). As cadeias aciloliinsaturadas de EC, PL e TGs são vulneráveis à oxidação, como é o CL e os EC. A LDL contém uma molécula de apolipoproteína B -100, constituída por 4536 resíduos de aminoácidos, com várias tirosinas e lisinas expostas, as quais podem ser directamente oxidadas ou modificadas por produtos de oxidação lipídica.

A compreensão da importância da oxidação das LDL para a aterogenicidade emergiu quando os investigadores estavam a tentar resolver o denominado "paradoxo do LDL". Os doentes com hipercolesterolemia familiar (HF) têm níveis significativamente elevados de LDL no plasma, devido à ausência completa ou parcial do receptor de LDL funcional (rLDL), que é expresso ubiquitariamente em indivíduos normais e medeia a captação celular de LDL (Goldstein e Brown., 2009). Apesar da ausência do rLDL em

pacientes com HF, a avaliação histológica demonstrou prevalência de macrófagos carregados de lípidos - "células espumosas" - em tecidos subcutâneos, tendões e na parede vascular, que se manifesta clinicamente como xantelasma, xantomas tendíneos e aterosclerose. Na verdade, os pacientes homocigóticos com HF podem sofrer enfarte agudo do miocárdio na primeira infância e, se não tratados, geralmente morrem de DAC por volta dos 20 anos de idade. Por conseguinte, a acumulação de colesterol em macrófagos teciduais pode ocorrer por uma via que não seja através dos rLDL. Este paradoxo aparente foi explicado, demonstrando a presença de LDL oxidado ou modificado, o qual é recolhido pelos macrófagos através de vários mecanismos e receptores que não os rLDL e que se acumula nas paredes das artérias. Também ficou claro destas experiências *in vitro* que a LDL precisava de ser oxidada ou modificada e/ou agregada, de modo a ser internalizada pelos macrófagos. Isso levou a formular a hipótese da oxidação da aterosclerose, resumida por Steinberg, Witztum e colegas, em 1989, no seu artigo clássico "*Beyond cholesterol: Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity*" (Steinberg e col., 1989), sugerindo que modificações oxidativas das LDL promovem a sua aterogenicidade.

Embora a LDL seja reconhecida como a mais importante lipoproteína aterogénica, as elevações nos níveis de TGs podem ser considerados um marcador de lipoproteínas remanescentes aterogénicas. As VLDL e outras lipoproteínas ricas em TGs são capazes de entrar na parede da artéria e iniciar processos ateroscleróticos, ajudando na formação de células espumosas, tal como acontece com o LDL. Uma recente meta-análise de Sarwar e col. Incluiu 29 estudos prospectivos (262 525 participantes; 10 158 casos de DCC) para investigar a associação entre TGs e o risco de DCC (Sarwar e col., 2007). Foi encontrada uma associação forte e estatisticamente significativa entre o nível de TGs e risco de doença coronária, independentemente da duração do *follow-up*, género, estado de jejum, e ajuste para o c-HDL; embora se verificasse que o ajuste para o c-HDL tenha atenuado a magnitude da associação entre nível de TGs e o risco de DCC (Sarwar e col., 2007). A meta-análise mostrou uma associação forte e significativa entre o nível elevado de TGs e o risco cardiovascular.

Numa análise multivariada, também pareceu haver um efeito significativo do nível de TGs na taxa de eventos de DCC. Após o ajuste para o c-LDL e outras variáveis, cada redução de 10 mg/dL nos TGs foi associada a uma redução de 1,6% nos eventos

coronários ($p < 0,001$). Da mesma forma, após o ajuste para o c-nHDL e outras variáveis, cada redução de 10 mg/dL nos TGs foi associada com uma redução de 1,4% nos eventos coronários ($p = 0,01$) (Miller e col., 2008). No grupo em tratamento, os níveis de TGs < 150 mg/dL foram independentemente associados com um menor risco de eventos coronários recorrentes, dando apoio ao conceito de que a obtenção de baixos níveis de TGs em pacientes após síndrome agudo coronário pode ser uma consideração importante, além da redução dos níveis de c-LDL com estatinas (Miller e col., 2008).

Quando os níveis séricos de TGs são elevados, a medida chamada de colesterol não HDL (c-nHDL) representa melhor as concentrações de colesterol em todas as lipoproteínas aterogénicas do que o c-LDL (NCEP ATP III, 2002), incluindo o próprio c-LDL, o c-VLDL, a lipoproteína (a) [Lp(a)] e o colesterol de lipoproteína de densidade intermédia (c-IDL). O c-nHDL, de acordo com as directrizes do NCEP ATP III, é um alvo secundário da terapêutica após as metas do c-LDL serem alcançadas e quando os níveis de TGs são ≥ 200 mg/dL (NCEP ATP III, 2002).

O c-nHDL tem vindo a ganhar reconhecimento. No entanto, tem existido alguma relutância no uso deste indicador, possivelmente porque o c-nHDL é definido por aquilo que não é, e não pelo que ele é. Para resolver esta dificuldade potencial, uma maneira de pensar sobre o c-nHDL é como sendo a carga aterogénica total. Matematicamente, c-nHDL é equivalente a subtrair o c-HDL ao c-Total (isto é, $c\text{-nHDL} = c\text{-Total} - c\text{-HDL}$). Através deste cálculo, todas as lipoproteínas aterogénicas, como o c-LDL, c-VLDL, c-IDL, partículas remanescentes e Lp(a), são englobadas na medida do c-nHDL. Como o c-VLDL é uma medida mais prontamente disponível de lipoproteínas remanescentes aterogénicas, ele pode ser combinado com o c-LDL, para melhorar a previsão do risco cardiovascular através do cálculo de um valor aproximado de c-nHDL (NCEP ATP III, 2002). É considerado um nível normal de c-VLDL quando o nível de TGs é < 150 mg/dL, o que corresponde normalmente a um valor ≤ 30 mg/dL (NCEP ATP III, 2002). Assim, o objectivo de um c-nHDL de 30 mg/dL é maior do que a meta para o c-LDL (NCEP ATP III, 2002). Se para um paciente a meta de c-LDL é < 100 mg/dL, então o objectivo para o c-nHDL é de < 130 mg/dL.

O c-nHDL é um preditor significativo do risco de doença coronária e está altamente correlacionado com vários parâmetros lipídicos que estão associados com o risco de doença coronária. O c-nHDL é correlacionado com a apolipoproteína B, que é a

porção proteica de cada lipoproteína aterogénica, e com o número e tamanho das partículas de LDL (Cui e col., 2001; Jiang e col., 2004; Liu e col., 2005; Ridker e col., 2005). Os dados do *Framingham Heart Study* foram analisados para investigar a utilidade do c-nHDL na predição do risco de DCC. Nesta análise (2 693 homens, 3 101 mulheres) o c-nHDL foi comparado com o c-LDL como preditor de risco de doença coronária, e o c-VLDL foi avaliado como um preditor independente de risco de doença coronária. Após ajuste multivariado, para o c-nHDL, não foi encontrada associação entre o c-LDL e o risco de eventos coronários. Por outro lado, uma forte associação positiva e gradual entre o c-nHDL e o risco de DCC foi observada dentro de cada nível de c-LDL. Estes resultados sugerem que o c-nHDL é um melhor preditor de risco de DCC do que o c-LDL, e que o c-VLDL pode desempenhar um papel crítico no desenvolvimento de DCC (Liu e col., 2006).

Como é sabido, a hiperlipidemia é frequentemente acompanhada de diminuição dos níveis plasmáticos de HDL, e nessa situação é designada de “dislipidemia”. O HDL é considerado ser ateroprotector principalmente por aumentar o transporte reverso do colesterol, um processo pelo qual o HDL actua como aceitador de colesterol e transporta o colesterol de lesões ateroscleróticas de volta para o fígado para excreção na biliar (Chapman, 2006). No entanto, o HDL também está a emergir como um factor chave na modulação das respostas relacionadas com a inflamação, o que pode ter um impacto adicional na aterosclerose (Zhu e Parks, 2012). Em pacientes com doenças cardiovasculares, um HDL disfuncional mostra uma diminuição da capacidade para o transporte reverso do colesterol e perda de correlação com a função anti-inflamatória (Navab e col., 2009).

Efectivamente, além da importância dos níveis de LDL, LDL-ox e TGs, estudos prospectivos epidemiológicos têm mostrado conclusivamente que baixos níveis de HDL estão associados com um risco aumentado de doenças cardiovasculares. No *Quebec Cardiovascular Study*, um estudo longitudinal prospectivo de 2103 homens de idade média, acompanhados por um período de cinco anos, verificou-se que os indivíduos com baixos níveis de HDL tinham um risco aumentado de desenvolver um primeiro evento cardíaco isquémico (Després e col., 2000). É importante salientar que, no mesmo estudo, uma baixa concentração de HDL foi um melhor preditor de doença isquémica do coração do que os níveis de LDL. De um ponto de vista clínico, deve sublinhar-se que uma concentração diminuída de HDL raramente é um “achado” isolado em pacientes. Em vez

disso, baixos níveis de HDL são frequentemente encontrados em associação com altos TGs, alta apoB, e resistência à insulina, que são, aliás, também associados com uma alta proporção de LDL pequenas e densas. Neste aspecto, também deve ser salientado que, na maioria dos estudos, o efeito independente dos TGs como um preditor de DAC é melhor quando uma variação fraca de HDL é tida em conta. Neste sentido, as interações fisiológicas entre os TGs e as HDL não devem ser negligenciadas e podem explicar a confusão no que diz respeito à interpretação adequada da hipertrigliceridemia. De facto, a concentração no plasma de TGs mostra uma forte correlação negativa com a taxa de HDL, e é um marcador de obesidade visceral e resistência à insulina. Em vez disso, a hipertrigliceridemia deve ser considerada como um marcador simples e conveniente de um conjunto de anormalidades metabólicas que conferem um elevado risco para a DCV, particularmente quando acompanhada por obesidade intra-abdominal. Aliás, nos *Prospective Cardiovascular Munster* e *Helsinki Heart studies*, os grupos de pacientes que têm um nível plasmático elevado de TGs e baixo de HDL estavam em maior risco de desenvolver DAC (Assmann e Schulte, 1992; Tenkanen e col., 1994).

As estatinas são muitas vezes a intervenção farmacêutica inicial para reduzir os níveis de c-LDL e o risco de eventos cardiovasculares e o seu uso em populações específicas pode ajudar a reduzir os custos de longo prazo associados com estes eventos. No entanto, o risco cardiovascular residual permanece após a terapêutica com estatinas, o qual pode ser associado a níveis elevados de TGs e c-nHDL, bem como níveis baixos de c-HDL. Tendo em conta que o tema principal deste trabalho se centra nas HDL, os dados relacionados com o seu impacto no desenvolvimento da aterosclerose e a sua associação ao risco CV serão abordados em maior detalhe no capítulo seguinte.

1.3.1.2 – Obesidade, diabetes e inflamação

Já no ano 400 a.C., o médico grego Hipócrates observou que "a morte súbita era mais comum em pessoas que tinham naturalmente mais gordura do que nas magras" (Berg e Scherer, 2005). Grandes estudos recentes de indivíduos saudáveis demonstraram que a adiposidade aumentava o risco de eventos de doença vascular (Romero-Corral e col., 2006; Adams e col., 2006; DeBette e col., 2010; Handel e col., 2010; Wessel e col., 2004; de Koning e col., 2007; Bazzano e col., 2010). Em particular, a adiposidade abdominal está fortemente e positivamente associada com a mortalidade por DCV,

independente do IMC (Zhang e col., 2008; Kurth e Leitzmann, 2010; Shiue, 2010). Embora por muitos anos se tenha dado mais atenção à obesidade e à hipercolesterolemia como os principais factores patogénicos predominantes para a aterosclerose (Qureshi e col. 2009), é agora evidente que a inflamação desempenha um papel importante na progressão da doença (Berg e Scherer, 2005).

A dieta ocidental moderna combinada com um estilo de vida sedentário levou a uma epidemia de obesidade, tendo como consequência um aumento dramático na incidência de diabetes e de doenças cardiovasculares (DCV), em particular acidente vascular cerebral e enfarte agudo do miocárdio. Segundo a *European Association for the Study of Diabetes* e a *European Society of Cardiology*, a diabetes mellitus é uma perturbação metabólica caracterizada por hiperglicemia crónica com perturbação do metabolismo dos hidratos de carbono, gorduras e proteínas, que resulta da deficiente secreção e/ou acção da insulina. A diabetes tipo 1 deve-se essencialmente à ausência de produção endógena de insulina pancreática, enquanto na diabetes tipo 2 o aumento de glicemia resulta de processos mais complexos. Tradicionalmente, a diabetes era diagnosticada com base em sintomas devidos a hiperglicemia, mas nas últimas décadas a tónica tem sido colocada na necessidade de identificar a diabetes e outras formas de alterações da glicose em indivíduos assintomáticos. A diabetes mellitus está associada ao desenvolvimento a longo prazo de lesões nos órgãos, nomeadamente retinopatia, nefropatia, neuropatia e disfunção autónoma. Os doentes com diabetes apresentam um risco acrescido de desenvolver doença cardiovascular, vascular cerebral e arterial periférica. Com efeito, a diabetes é um dos mais fortes factores de risco modificáveis para a doença cardiovascular, sendo o seu efeito nas mulheres relativamente maior do que nos homens para todos os eventos cardiovasculares, excepto na falência cardíaca congestiva (Wilson e col., 1998). A diabetes coexiste muitas vezes com a obesidade, dislipidemia, hipertensão e hiperuricemia ("síndrome metabólica"), sendo, por isso, estes doentes particularmente predispostos à doença aterosclerótica.

O excesso de peso é definido como um IMC ≥ 25 e < 30 kg/m² e a obesidade como um IMC ≥ 30 kg/m². Critérios para a obesidade central, conforme definido pela *International Diabetes Federation* são o de um perímetro abdominal ≥ 94 cm nos homens e ≥ 80 cm nas mulheres, para a população caucasiana (Alberti e col., 2009).

Em indivíduos com obesidade mórbida, com um índice de massa corporal (IMC) de 40-45 kg/m², a taxa média de sobrevivência é reduzida em 8 a 10 anos, em comparação com aqueles com IMC normal, principalmente devido ao aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (Whitlock e col., 2009). Estudos experimentais e dados clínicos sugerem que a inflamação e a disfunção do tecido adiposo (gordura) são mediadores chave que ligam a obesidade à DCV (Mazurek e col., 2003; Xu e col., 2010a).

Tanto o coração como os vasos sanguíneos estão rodeados por tecido adiposo. O tecido adiposo epicárdico está localizado ao longo das grandes artérias coronárias e na superfície dos ventrículos e no vértice do coração, enquanto o tecido adiposo perivascular envolve as artérias. Ambos os depósitos de gordura não são separados por uma fásia (camada de tecido fibroso) do tecido subjacente. Portanto, factores segregados a partir de tecido adiposo epicárdico e perivascular, incluindo lípidos e adipocitoquinas activas (ou adipoquinas), podem directamente modular a função do coração e da vasculatura (Karastergiou e col., 2010). A maioria das adipoquinas libertadas a partir do tecido adiposo, incluindo o factor de necrose tumoral α (TNF- α), a leptina, o inibidor do factor activador do plasminogénio de tipo 1 (PAI-1), a proteína de ligação de ácidos gordos dos adipócitos, a lipocalina-2, a proteína quimiotática de monócitos 1 e a resistina, exercem efeitos prejudiciais sobre o sistema cardiovascular (Xu e col., 2010a). Na obesidade, a expansão do tecido adiposo leva à super-produção destas adipoquinas pró-inflamatórias, contribuindo para a patogénese das doenças cardiovasculares. Por outro lado, a adiponectina, a principal adipocitoquina segregada pelos adipócitos com actividade anti-inflamatória e de sensibilização à insulina, é regulada negativamente na obesidade e patologias relacionadas (Zhu e col., 2008).

A adiponectina possui vários efeitos benéficos sobre as complicações relacionadas com a obesidade metabólica, a dislipidemia, a doença hepática gordurosa não alcoólica e vários tipos de cancros (Wang e col., 2008). Em particular, o seu papel na protecção cardiovascular tem sido extensivamente estudado. Estudos epidemiológicos em diferentes grupos étnicos demonstraram que um baixo nível sérico de adiponectina é um factor de risco independente para doenças cardiovasculares (Koenig e col., 2006; Frystyk e col., 2007). A hipoadiponectinemia foi independentemente associada com a disfunção endotelial em pacientes diabéticos, avaliada pela vasodilatação mediada por fluxo (Tan e col., 2004; Torigoe e col., 2007). O nível plasmático de adiponectina está correlacionado

com a amplitude da resposta vasodilatadora à hiperemia reactiva, mas não desta para a nitroglicerina, o que indica que a adiponectina modula a vasodilatação dependente do endotélio em artérias periféricas (Ouchi e col., 2003b). Numa análise de regressão múltipla envolvendo 36 pacientes não-diabéticos, a concentração de adiponectina (entre os outros factores de risco, incluindo a avaliação do modelo de homeostase para resistência à insulina, índice de massa corporal, insulina imunoreactiva e triglicéridos) foi o único preditor independente da função endotelial coronária avaliada pela resposta vascular coronária à acetilcolina (Okui e col., 2008).

A espessura da íntima-média da carótida (IMT) é um marcador amplamente utilizado de aterosclerose subclínica e é preditivo de enfarte agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral futuros (Nichols e col., 1999). Uma correlação inversa entre IMT e adiponectina sérica tem sido observada em vários grupos clínicos, incluindo indivíduos saudáveis e diabéticos de ambos os sexos (Pilz e col., 2005; Lo e col., 2006; Nilsson e col., 2006). Uma forte correlação entre hipoadiponectinemia e doença arterial coronária tem sido documentada numa série de estudos transversais e prospectivos (Kumada e col., 2003; Hashimoto e col., 2006). Em contraste, os níveis plasmáticos elevados de adiponectina estão associados a uma diminuição do risco de doença cardíaca coronária, independentemente de outros factores de risco (Frystyk e col., 2007). Num estudo caso-controlo de um período de 6 anos, abrangendo 18 225 participantes do sexo masculino, os indivíduos no quintil mais alto dos níveis de adiponectina apresentaram um risco significativamente reduzido de enfarte agudo do miocárdio, mesmo após o ajuste para o IMC, história de diabetes e hipertensão arterial (Pischon e col., 2004). A associação de adiponectina no soro com estas DCV pode ser em parte dependente das lipoproteínas de baixa ou de alta densidade, uma vez que a sua associação se tornou menos significativa após ajuste para estas lipoproteínas (Pischon e col., 2004; Koenig e col., 2006).

Dois estudos longitudinais independentes demonstraram consistentemente que a hipoadiponectinemia é um factor de risco independente para a hipertensão (Chow e col., 2007; Imatoh e col., 2008). Além disso, os indivíduos portadores das variantes genéticas que estão relacionados com menores níveis plasmáticos de adiponectina têm um maior risco de hipertensão (Iwashima e col., 2004; Ong e col., 2010). A hiperadiponectinemia também é um factor de risco independente para a cardiomiopatia diabética (Mitsubishi e

col., 2007; Kozakova e col., 2008). Em indivíduos saudáveis, os níveis circulantes de adiponectina total e de alto peso molecular (um complexo oligomérico da adiponectina) estão relacionados com a hipertrofia ventricular esquerda, independente da idade e factores metabólicos (Mitsunashi e col., 2007; Kozakova e col., 2008). Uma associação similar foi também observada em indivíduos obesos (Ebinc e col., 2008).

Embora a maioria dos estudos epidemiológicos apoiem a associação de hipoadiponectinemia com DCV, dados conflituosos foram reportados numa potencial associação entre a adiponectina e doença microvascular. Em pacientes com insuficiência cardíaca crónica (Kistorp e col., 2005), doença arterial coronária angiográfica (Pilz e col., 2006) ou doença renal crónica (Menon e col., 2006), os níveis plasmáticos elevados de adiponectina parecem ser um preditor independente de mortalidade. A associação de hiperadiponectinemia ao aumento do risco de mortalidade é mais pronunciada em pacientes com doença cardiovascular prevalente do que nos sem doença (Kistorp e col., 2005; Laughlin e col., 2007; Maiolino e col., 2007; 2008). Estas observações paradoxais também podem sugerir a existência de uma "resistência à adiponectina" (Lin e col., 2007; Van Berendoncks e col., 2010) com o envelhecimento e a progressão de doenças CV crónicas. Com efeito, a resistência à adiponectina foi documentada tanto em animais como em humanos (Lin e col., 2007; Matsushita e col., 2007). Na obesidade, vários efeitos benéficos da adiponectina, incluindo a estimulação da oxidação de ácidos gordos no músculo esquelético (Mullen e col., 2007), a promoção da produção de NO endotelial da vasculatura (Li e col., 2010), e a protecção contra a lesão isquémica no coração (Yi e col., 2010), são prejudicados. Em todos os estudos acima referidos, a medição da adiponectina não foi distinguida entre as suas diferentes isoformas oligoméricas. Portanto, é ainda possível que a redução selectiva de adiponectina de alto peso molecular, que é a principal forma bioactiva com relevância estreita com a função endotelial (Kobayashi e col., 2004), ocorra nas condições de hiperadiponectinemia mencionadas.

Para além da adiponectina, outros mediadores estão envolvidos na obesidade/adiposidade, e cada vez mais mostram importância na relação com a evolução das DCV. A proteína C reactiva (PCR) é uma das adipoquinas que tem mostrado uma ligação entre a disfunção metabólica e doenças cardiovasculares. A PCR é produzida tanto pelo fígado como pelo tecido adiposo e a sua expressão no fígado pode ser induzida pela IL-6 derivada do tecido adiposo visceral (Yudkin e col., 2000). Crescentes evidências

indicam que a PCR não é apenas um marcador biológico, mas também um mediador activo na patogénese da doença vascular. A PCR tem efeitos aterogénicos sobre o músculo liso e endotélio vascular: induz tanto a expressão de quimioquinas (MCP-1), como de moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, selectina-E e selectina-P) em células endoteliais (Pasceri e col., 2000) e tem sido implicada na activação de NF- κ B e na facilitação da libertação de citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6, por macrófagos e células espumosas da neo-íntima (Ballou e Lozanski, 1992). Para além disso, a PCR aumenta a migração de células do músculo liso, e promove a proliferação e remodelação vascular através da regulação positiva do receptor AT1 da angiotensina e a formação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) (Wang e col., 2003). Elevados níveis de PCR estão associados com a disfunção do endotélio vascular (Venugopal e col., 2002). Outras adipoquinas demonstraram estar envolvidas na inflamação ligada à DCV. Por exemplo, a resistina, uma adipoquina pró-inflamatória no rato, mas não em humanos, pode promover directamente a activação das células endoteliais ou contrariar os efeitos anti-inflamatórios da adiponectina em células endoteliais vasculares, promovendo a libertação de endotelina-1 (Verma e col., 2003). A sobre-expressão de angiopoietina 2 (ANGPTL2) aumenta a inflamação vascular caracterizada pela ligação abundante de leucócitos às paredes dos vasos e aumenta a permeabilidade vascular (Tabata e col., 2009). A sobre-expressão de IL-18 em ratos resulta na expressão aumentada de moléculas de adesão de células endoteliais, infiltração de macrófagos da parede do vaso sanguíneo e remodelação vascular (Tan e col., 2010). Vários estudos têm sugerido que a inflamação promove a angiogénese no tecido adiposo para melhorar a remodelação do tecido durante a sua expansão na obesidade. Os macrófagos desempenham um papel importante na angiogénese (Sun e col., 2011). Por outro lado, o TNF- α é capaz de aumentar a vasoconstrição e a pressão sanguínea quando a inflamação está fora de controlo (Ye, 2011).

O tecido adiposo perivascular (PVAT), que envolve quase todos os vasos sanguíneos, recebeu uma atenção tardia devido ao seu efeito parácrino na inflamação dos vasos sanguíneos (Figura 1.3). Num estudo recente, demonstrou-se que a visfatina, um factor de crescimento derivado do PVAT para as células do músculo liso vascular (VSMC), é altamente expressa no PVAT em comparação com a gordura subcutânea e visceral (Wang e col., 2009). Também forneceram evidências de que a visfatina está

envolvida na doença cardio e cerebrovascular (Wang e col., 2010; Wang e col., 2010; Wang e col., 2012; Wang e col., 2011). Estudos recentes têm demonstrado que o volume de gordura epicárdica está bem correlacionado com os factores de risco cardiovasculares, indicando claramente que o PVAT está envolvido no desenvolvimento de DCV (Rosito e col., 2008). Recentemente, tem-se avaliado a relação entre adipoquinas do PVAT e a doença vascular relacionada com o crescimento de VSMC, tais como aterosclerose e reestenose (Miao e Li, 2012). Clinicamente, o PVAT em torno da veia safena pode reduzir a estenose do enxerto venoso, melhorando precocemente (1,5 anos) e a longo prazo (8,5 anos) a permeabilidade do enxerto em pacientes com cirurgia de revascularização miocárdica (Souza e col., 2006).

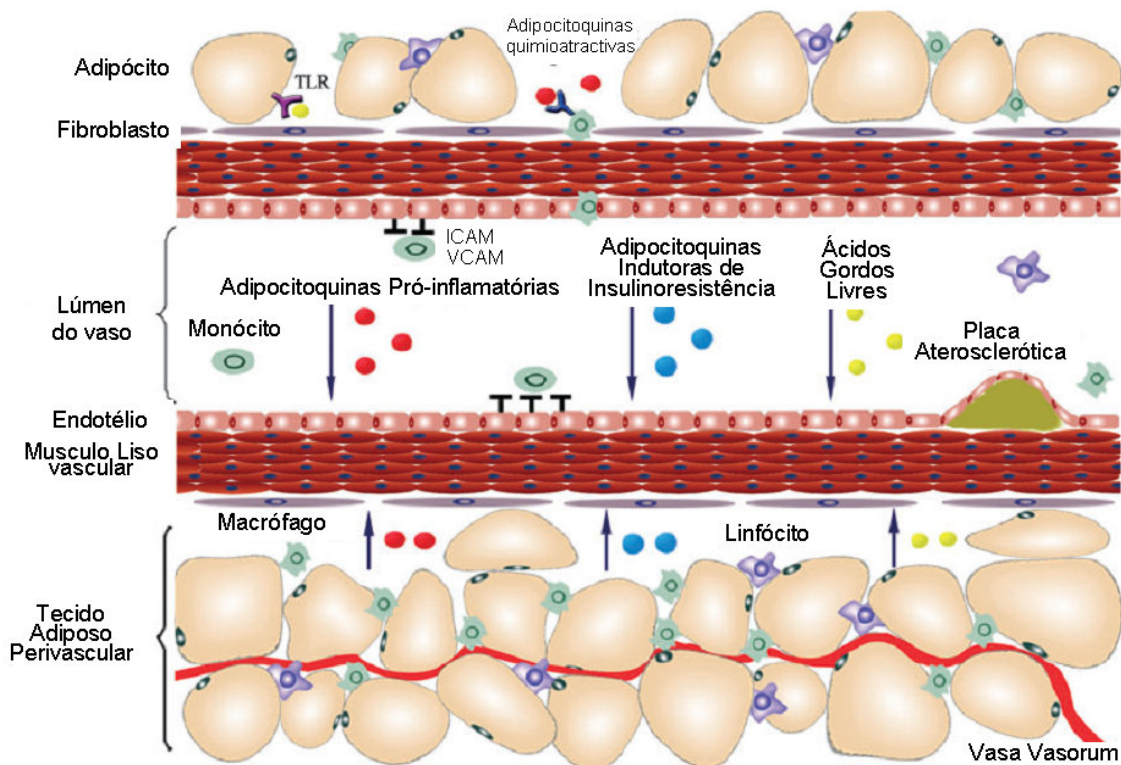


Figura 1.3 – Potenciais mecanismos pelos quais as adipoquinas derivadas do tecido adiposo causam doença cardiovascular. Tanto o tecido perivascular como outros tecidos adiposos regionais pode libertar adipoquinas pró-inflamatórias, adipoquinas indutoras de resistência à insulina (RI), ácidos gordos livres e outras substâncias prejudiciais, especialmente sob condições de infiltração de células inflamatórias (macrófagos e linfócitos) e por disfunção induzida por hipertrofia de adipócitos no tecido adiposo. Os ácidos gordos livres podem ligar-se a receptores toll-like (TLR) para desencadear a produção de adipoquinas inflamatórias. Além disso, adipoquinas quimioatrativas derivadas do tecido adiposo podem aumentar ainda mais a infiltração de células inflamatórias. Estes factores causam disfunção das células endoteliais, aumentam a expressão de moléculas de adesão endoteliais, tais como a molécula de adesão intercelular (ICAM) e a molécula de adesão vascular (VCAM), e melhoram o crescimento e migração de células do músculo liso vascular, o que resulta no desenvolvimento de doença cardiovascular. Adaptado de Li e col., 2011.

O tecido adiposo é um órgão endócrino activo que tem um papel central no metabolismo de lípidos e da glicose e produz um grande número de adipocinas envolvidas no desenvolvimento da síndrome metabólica, diabetes mellitus e doença cardiovascular, principalmente através da regulação da sensibilidade à insulina e da inflamação. Os mecanismos subjacentes à inflamação induzida por obesidade mórbida estão longe de estar esclarecidos e continuam várias questões em aberto. Diferentes mediadores inflamatórios estão implicados na indução da disfunção endotelial, formação da placa e instabilidade da placa os quais constituem os principais mecanismos de lesão vascular na doença aterosclerótica. As funções individuais de algumas citocinas na aterosclerose já foram anteriormente descritas. De salientar, que a camada endotelial das artérias pode exibir um comportamento patológico quando estimulada por diferentes citocinas bem como produzir mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, que têm funções importantes na iniciação e amplificação de processos inflamatórios dentro da placa aterosclerótica (Kofler e col., 2005; Bhagat e Vallance, 1997; Ross, 1999; Mantovani e col., 1998). O efeito combinado da interacção entre estas citocinas e a parede vascular pode ser resumido como um aumento do recrutamento de leucócitos e a activação de monócitos na parede do vaso, perturbação dos mecanismos mediados pelo NO para a regulação local da corrente sanguínea, promoção da migração e diferenciação das células do músculo liso e indução de um estado pró-trombótico (Kofler e col., 2005). Estas funções fisiopatológicas são importantes nas primeiras fases da formação da placa e também na indução da ruptura da placa e trombose durante os eventos vasculares agudos.

A disfunção miocárdica e a insuficiência cardíaca são outras características clínicas importantes da obesidade. As citocinas, bem como outros mediadores inflamatórios (receptor solúvel da IL-6, IL-6 e PCR) podem também estar envolvidos na geração de disfunção ventricular sistólica e diastólica, independente da obstrução coronária, como indicado por ecocardiografia em indivíduos obesos normotensos (Malavazos e col., 2007).

Parece claro que a obesidade, a resistência à insulina, a inflamação crónica de baixo grau e a aterosclerose estão muitas vezes intimamente correlacionadas, tanto em termos dos seus mecanismos fisiopatológicos, mas também em relação às suas manifestações clínicas. A fim de prevenir complicações cardiovasculares e metabólicas, a perda de peso é actualmente a estratégia terapêutica escolhida para indivíduos obesos.

No entanto, excepto para as técnicas bariátricas recentemente aplicadas, a perda significativa de peso é difícil de conseguir na prática clínica de rotina (Foster-Schubert e Cummings, 2006; Hansen e col., 2006) e, além disso, os efeitos da secreção desregulada de adipoquinas no tecido adiposo são estendidos a indivíduos não obesos que apresentam síndrome metabólica (Bergman e col., 2001; Day, 2007; Gustafson e col., 2007). Há uma expectativa actual e generalizada de que novos fármacos com acção selectiva sobre as diferentes adipoquinas e seus locais de acção em diferentes tecidos serão desenvolvidos. Idealmente, estes fármacos devem ser capazes de regular negativamente o meio pró-inflamatório tal como observado em pacientes com síndrome metabólica e obesidade, especialmente quando a redução do peso corporal é necessária, mas não viável a curto prazo, ou mesmo quando não é de todo necessária. Enquanto se espera pelo desenvolvimento desses novos agentes, deve ser encorajada a prática de exercício moderado e regular e indicar estratégias orientadas para alvos específicos para a redução de peso para pacientes com IMC elevado, especialmente naqueles indivíduos com reconhecido aumento do risco cardiovascular ou evidência de resistência à insulina.

1.3.1.3 – Hipertensão arterial

A hipertensão é definida, segundo a *“International Society of Hypertension/World Health Organization”* e o *“Seventh Joint National Committee on Hypertension”*, como uma pressão arterial sistólica superior a 140 mmHg ou uma pressão arterial diastólica superior a 90 mmHg (Pressure JNCoDoHB, 1993).

A maioria dos estudos populacionais mostra consistentemente a existência de relações contínuas, fortes e graduais entre a pressão arterial (particularmente a pressão arterial sistólica) e a ocorrência posterior de vários eventos ateroscleróticos (Kannel, 1996; Klag e col., 1996). A magnitude dos riscos relativos relatados em cada estudo depende da duração do acompanhamento e da definição de hipertensão usada (Marang-van de Mheen e Gunning-Schepers, 1998). Estes riscos relativos são consistentes em todas as definições (Van Den Hoogen e col., 2000) e para todos os grupos de doentes, incluindo aqueles com e sem doença aterosclerótica conhecida (MacMahon e col., 1990).

Vários estudos de coorte de longo prazo e de elevada qualidade e ensaios clínicos randomizados têm demonstrado que os riscos de aumento da pressão arterial podem ser parcialmente revertidos (MacMahon e col., 1990; Gueyffier e col., 1997). Duas questões

importantes, no entanto, ainda não estão claras: a redução exacta da pressão que vai atingir a maior redução no risco cardiovascular, e se os benefícios do tratamento são especificamente relacionados com a extensão da redução da pressão arterial. A hipertensão está implicada em 35% de todos os eventos cardiovasculares ateroscleróticos (Kannel, 1996), incluindo 49% de todos os casos de insuficiência cardíaca (Levy e col., 1996).

As estimativas actuais indicam que os idosos são particularmente mais predispostos à hipertensão, valores que podem ir até 75% de pessoas com mais de 75 anos de idade apontadas com este diagnóstico (Pressure JNCoDoHB, 1993). Parece haver uma relação aproximadamente linear entre a elevação da pressão sanguínea e aumento da incidência de doença vascular aterosclerótica (MacMahon e col., 1990). A hipertensão confere duas vezes maior risco de doença cardíaca coronária e quatro vezes maior risco de desenvolver insuficiência cardíaca ou acidente vascular cerebral (Kannel, 1996). Através de variadas formas, incluindo lesão endotelial e hipertrofia cardíaca, a pressão arterial alta medeia directamente diversos eventos CV (Brunner e col., 2005; Chobanian e Alexander, 1996). A natureza causal desta associação é apoiada por numerosos estudos que demonstram que tanto o enfarte agudo do miocárdio como o acidente vascular cerebral são significativamente reduzidos em pacientes hipertensos após a instituição da terapêutica anti-hipertensiva (He e Whelton, 1999).

A hipertensão arterial (e a síndrome hipertensiva) parece favorecer a aterogénese pelas influências hemodinâmicas (e a tensão de cisalhamento) que determinam estadios de pressão intra-arterial indutores de disfunção endotelial, alteração da permeabilidade vascular (com permeabilização da parede por lipoproteínas potencialmente aterogénicas) e modificação da expressão fenotípica da célula endotelial e da célula muscular lisa (mas também da adventícia e da sua rede microvascular). Em muitos casos, a hipertensão arterial – e naturalmente o stresse hemodinâmico – vê amplificado os seus efeitos pela coexistência de outros factores de risco, tão comuns no doente hipertenso, e pela presença de hiperinsulinemia e resistência à insulina (Marques da Silva, 2006).

1.3.1.4– Estilos de vida – influência da dieta, peso corporal, actividade física, consumo de álcool e hábitos tabágicos

O papel da nutrição na prevenção de doenças cardiovasculares tem sido extensivamente revisto (Hu e Willett, 2002; Grundy, 1996; Mente e col., 2009). Há fortes evidências que mostram que factores dietéticos podem directamente influenciar a aterogénese ou através de efeitos sobre os factores de risco tradicionais, como os níveis de lípidos, a pressão arterial ou a glicemia. Ácidos gordos saturados (AGS) são o factor dietético com maior impacto sobre os níveis de c-LDL (0,02-0,04 mmol/L ou 0,8-1,6 mg/dL de aumento de c-LDL por cada 1% de energia adicional proveniente de gordura saturada) (Mensink e col., 2003). O ácido esteárico, em contraste com outros AGS (láurico, mirístico e palmítico), não aumenta os níveis de c-Total. Os ácidos gordos insaturados trans podem ser encontrados em quantidades limitadas (normalmente < 5% da gordura total) em produtos lácteos e em carnes de ruminantes. Parcialmente hidrogenados de ácidos gordos de origem industrial representam a principal fonte de ácidos gordos trans na dieta; o consumo médio de ácidos gordos trans, nos países ocidentais, é entre 2 e 5% do consumo total de energia. Quantitativamente, os ácidos gordos trans têm um efeito semelhante ao dos AGS no aumento do c-LDL (Mozaffarian e col., 2009).

Se 1 % da energia da dieta proveniente dos AGS for substituída por ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs), o c-LDL diminui em 0,041 mmol/L (1,6 mg/dL); se for substituída por ácidos gordos poliinsaturados n-6 (PUFAs) a redução será de 0,051 mmol/L (2,0 mg/dL); e se for substituída por hidratos de carbono a redução seria de 0,032 mmol/L (1,2 mg/dL) (Mensink e col., 2003). Os PUFAs da série n-3 não têm efeito hipocolesterolémico directo; no entanto, o consumo habitual de peixe está associado com um reduzido risco cardiovascular, que é, em grande parte, independente de qualquer efeito sobre os lípidos plasmáticos. Quando consumido em doses farmacológicas (> 2 g/dia), o efeito dos PUFAs n-3 sobre os níveis de c-LDL é neutro ou provoca um ligeiro aumento, juntamente com uma diminuição de TGs (Mensink e col., 2003). Existe uma relação positiva entre o colesterol da dieta e a mortalidade por DAC, que é, em parte, independente dos níveis de c-Total. Vários estudos em humanos têm avaliado os efeitos do colesterol dietético na absorção de colesterol e no metabolismo lipídico e revelaram uma acentuada variabilidade entre indivíduos (Keys, 1984; Ordovas e col., 2009). O efeito dos hidratos de carbono na dieta é praticamente "neutro" no c-LDL;

portanto, alimentos ricos em hidratos de carbono representam uma das possíveis opções para substituir a gordura saturada na dieta (NCEP ATP III, 2001). A fibra dietética (especialmente do tipo solúvel), que está presente em legumes, frutas, verduras e cereais integrais, tem um efeito hipocolesterolémico directo (Brown e col., 1999). Portanto, os alimentos com hidratos de carbono ricos em fibras constituem um substituto dietético ideal para a gordura saturada de forma a maximizar os efeitos da dieta sobre os níveis de c-LDL e minimizar os possíveis efeitos adversos de uma dieta rica em hidratos de carbono sobre outras lipoproteínas (Brown e col., 1999).

Uma dieta rica em gordura monoinsaturada melhora significativamente a sensibilidade à insulina, em comparação com uma dieta rica em gordura saturada (Mattar e Obeid, 2009), juntamente com uma redução dos níveis de TGs, particularmente no período pós-prandial. Outro efeito da dieta sobre os TGs é observado com uma dose elevada de PUFAs n-3 de cadeia longa; no entanto, uma abordagem de dieta baseada exclusivamente em alimentos naturais raramente irá atingir uma ingestão adequada para conseguir um efeito clinicamente significativo. Para este objectivo, quer suplementos farmacológicos ou alimentos artificialmente enriquecidos com PUFAs n-3 poderão ser utilizados (Mattar e Obeid, 2009). Em pessoas com hipertrigliceridemia grave, com quilomicra presentes mesmo em jejum, é adequado reduzir a quantidade total de gordura na dieta tanto quanto possível (< 30 g/dia).

A glicose e o metabolismo de lípidos estão fortemente relacionados, e qualquer perturbação do metabolismo de hidratos de carbono induzida por uma dieta rica em hidratos de carbono também levará a um aumento das concentrações de TGs. Os maiores e mais rápidos resultados desta perturbação são as consequências metabólicas mais pronunciadas. A maioria dos efeitos prejudiciais de uma dieta rica em hidratos de carbono pode ser minimizada se a sua digestão e absorção for feita de forma mais lenta. O índice glicémico permite a identificação e distinção (nos alimentos ricos em hidratos de carbono) entre os de absorção "rápida" e os de absorção "lenta". Em particular, os efeitos prejudiciais de uma dieta rica em hidratos de carbono nos TGs ocorrem principalmente quando estes alimentos têm elevado índice glicémico e um baixo teor em fibra (Liu e col., 2001).

Os efeitos benéficos no metabolismo lipídico induzido por alimentos com baixo índice glicémico e alto teor em fibras não podem ser automaticamente extrapolados para

os alimentos em que a frutose (um açúcar com um baixo índice glicémico) representa a principal fonte de hidratos de carbono. Aliás, a frutose alimentar pode contribuir para a elevação dos TGs; estes efeitos são dependentes da dose e tornam-se clinicamente relevantes quando a ingestão é > 10% da energia diária, sendo habitual um consumo de frutose entre 15 e 20% do consumo de energia; nestes casos, pode haver um aumento de TGs no plasma entre 30 e 40%. A sacarose, um dissacarídeo contendo glicose e frutose, representa uma importante fonte de frutose na alimentação (Stanhope e col., 2009).

Os AGS aumentam os níveis de c-HDL em paralelo com os de c-LDL; em contraste, os ácidos gordos trans reduzem o c-HDL e aumentam o c-LDL. O consumo de MUFAs como substitutos dos AGS tem um pequeno ou nenhum efeito sobre o c-HDL; os PUFAs n-6 induzem uma ligeira diminuição. Em geral, os ácidos gordos n-3 têm efeito limitado (< 5%) sobre o c-HDL (Mensink e col., 2003; Mooradian e col., 2006).

O aumento do consumo de hidratos de carbono, como uma substituição isocalórica para a gordura, está associado a uma diminuição significativa nos níveis de c-HDL (0,1 mmol/L ou ~ 4mg/dL para qualquer substituição de energia de 10%). No entanto, quando os alimentos ricos em hidratos de carbono têm um baixo índice glicémico e um elevado teor em fibras, a redução dos níveis de c-HDL, ou não é observado, ou é muito pequena (Mensink e col., 2003; Kelly e col., 2004). Normalmente, um consumo elevado de frutose/sacarose está associado com uma diminuição mais acentuada do c-HDL.

A redução do peso corporal também influencia o c-Total e o c-LDL, mas a magnitude do efeito é bastante pequeno; em indivíduos obesos, uma diminuição de 0,2 mmol/L (8 mg/dL) na concentração de c-LDL é observada, por cada 10 Kg de perda de peso. A redução dos níveis de c-LDL é maior quando induzida pela prática de exercício físico regular (Dattilo e Kris-Etherton, 1992; Shaw e col., 2006). A redução de peso melhora a sensibilidade à insulina e diminui os níveis de TGs. Na maioria dos estudos a redução dos níveis de TGs devida à redução do peso situa-se entre 20 e 30%, sendo este efeito geralmente preservado desde que o peso não seja recuperado (Shaw e col., 2006). Mais ainda, a redução do peso tem ainda uma influência benéfica sobre os níveis de c-HDL: um aumento de 0,01 mmol/L (aproximadamente 0,4 mg/dl) foi observado por cada diminuição de 1 Kg no peso corporal, quando a redução de peso tinha estabilizado. A actividade física aeróbia correspondente a um gasto total de energia entre 1500 e 2200

kcal/semana, cerca de 25-30 km de caminhada rápida por semana (ou qualquer outra actividade equivalente) pode aumentar os níveis de c-HDL em 0,08-0,15 mmol/L (3,1-6,0 mg/dL) (Kraus e col., 2002).

A redução do peso corporal, mesmo que modesta (5-10% do peso corporal basal), melhora as anormalidades lipídicas e afecta favoravelmente os outros factores de risco cardiovasculares, muitas vezes presentes em indivíduos dislipidémicos. A redução do peso pode ser conseguida através da redução do consumo de alimentos densos em energia, induzindo um défice calórico de 300-500 kcal/dia. Para ser eficaz a longo prazo, este conselho deve ser incorporado em programas de educação de estilo de vida estruturados e intensivos. A fim de facilitar a manutenção do peso corporal perto do recomendado, é sempre apropriado aconselhar as pessoas com dislipidemia a praticar exercícios físicos regulares de intensidade moderada (Graham e col., 2007). A redução de peso modesta e exercício físico regular de intensidade moderada é muito eficaz na prevenção da diabetes tipo 2 e melhora todas as anormalidades metabólicas e factores de risco CV relacionados com a resistência à insulina, muitas vezes associada com a adiposidade abdominal.

Uma série de estudos têm confirmado uma associação entre a inactividade física e a DAC (Berlin e Colditz, 1990). A actividade física regular melhora o perfil lipídico e reduz a probabilidade de desenvolver diabetes em pacientes com glicemia de jejum alterada ou intolerância à glicose (Crandall e col., 2008). O exercício regular também promove a perda de peso, reduz a pressão arterial, os níveis séricos de TGs e de LDL pequenas e aumenta o c-HDL (Jakicic e col., 2003; Kraus e col., 2002). Larson-Meyer e col. demonstraram que a pressão sanguínea, c-Total, c-LDL, e resistência à insulina melhoraram significativamente apenas no grupo com restrição calórica e exercício físico em comparação com o grupo onde só houve a restrição calórica (Larson-Meyer e col., 2010).

O consumo de álcool tem um impacto negativo sobre os níveis de TGs. Enquanto que em indivíduos com hipertrigliceridemia mesmo uma pequena quantidade de álcool pode induzir uma maior elevação das concentrações de TGs, na população em geral o álcool apenas exerce efeitos prejudiciais sobre os níveis de TGs se a ingestão exceder o que é considerado um consumo moderado (até 1-2 bebidas/dia, correspondendo a 10-30 g/dia) (Rimm e col., 1999). Outro estudo mostra que o consumo de etanol moderado (até

20-30 g/dia para homens e 10-20 g/dia para mulheres) está associado ao aumento dos níveis de c-HDL em comparação com os abstémicos (Mooradian e col., 2006).

O tabagismo é a principal causa de morte evitável, estando associado a um aumento do risco para várias patologias, incluindo doenças cardíacas isquémicas e acidentes vasculares cerebrais. É considerado um factor de risco cardiovascular (FRCV) independente, quer para morte súbita, quer para enfarte agudo do miocárdio (Lobão e col., 2010). Há pouca literatura relacionada com os efeitos sobre cessação do tabagismo na DCV em populações com diabetes. No entanto, vários deles têm mostrado os benefícios de parar de fumar na DAC e na mortalidade, mesmo tendo em conta muitos outros factores presentes na população diabética (Al-Delaimy e col., 2002; Chaturvedi e col., 1997; Turner e col., 1998). Há vários mecanismos potenciais da diminuição do risco de doenças cardiovasculares associadas à cessação do tabagismo. O tabagismo tem efeitos cardiovasculares de curto e de longo prazo, que são reversíveis, logo após a cessação (Johnson e col., 2010; Celermajer e col., 1993). O tabagismo aumenta a frequência cardíaca e contractilidade do miocárdio, induz vasoconstrição arterial, aumenta a agregação plaquetária, reduz a oferta de oxigénio, e, a longo prazo, induz lesão endotelial e formação de ateroma (Benowitz, 2003). O aumento do risco de doenças cardiovasculares associadas ao tabagismo também é mediado através de factores de risco cardiovasculares, tais como um aumento nos níveis de c-LDL e TGs, uma diminuição nos níveis de c-HDL, ou um aumento nos níveis de glicemia em jejum. Alguns destes factores de risco cardiovascular, tais como níveis de c-HDL ou a sensibilidade à insulina, melhoram após a cessação do tabagismo, independentemente de um possível ganho de peso, que acontece em alguns casos (Gepner e col., 2011; Eliasson e col., 1997). As pessoas que conseguem parar de fumar, tornam-se muitas vezes mais conscientes em termos de cuidados de saúde, do que aqueles que continuam a fumar, e muitas vezes acabam por adoptar estilos de vida bastante mais saudáveis (Chiolero e col., 2006). No entanto, ainda não existem muitos estudos que deixem este tema totalmente esclarecido, nomeadamente estudos de longo-prazo, sendo fundamental perceber todas as condições/factores que podem estar envolvidos e que devem ser avaliados de forma concomitante e consistente.

1.3.2 – Factores de risco não modificáveis

1.3.2.1 – Idade e género

Embora não seja objecto de modificação, a idade é um dos factores de risco mais importantes para a previsão de incidência de doença cardiovascular. Este conceito é talvez melhor ilustrado quando se considera o risco de desenvolver doenças cardiovasculares durante um período de 10 anos. Com base na experiência nos Estados Unidos, o risco médio de desenvolver doença cardiovascular entre os 30 e os 34 anos no sexo masculino é de 3%. Este número sobe cerca de sete vezes, para 21%, num indivíduo comparável mas com idade entre 60 e 64 anos. A previsão de doença cardíaca coronária utiliza categorias de factores de risco (Wilson e col., 1998). A magnitude exacta do risco relacionado com a idade em comparação com outros factores de risco de doenças cardiovasculares é ilustrada no *Framingham Heart Study*, tendo tido uma pontuação de 14 pontos para prever o risco a 10 anos de incidência de doença cardiovascular. Neste sistema, o aumento do risco é caracterizado por uma pontuação mais elevada, e mais que 7 pontos podem ser atribuídos à idade de forma isolada. Assim, a idade é um factor de risco predominante para a incidência de doença cardiovascular.

Numerosos estudos observacionais indicam que homens apresentam maior risco para doença cardiovascular em comparação com mulheres da mesma idade (Barrett-Connor e Bush, 1991). Existem especulações de que os estrogénios oferecem um efeito "protector" para as mulheres, uma vez que a doença cardiovascular acelera em mulheres após a menopausa. Contudo, estas especulações têm sido difíceis de sustentar, uma vez que o tratamento com estrogénios não reduz a incidência de doenças cardiovasculares em mulheres pós-menopáusicas (Hulley e col., 1998). Alternativamente, alguma desta aparente protecção poderia ser devida ao facto de as mulheres exibirem concentrações relativamente mais elevadas de HDL do que os homens emparelhados para a idade. No entanto, a incidência de doença cardiovascular continua a ser menos comum em mulheres na menopausa do que nos indivíduos do sexo masculino comparados para a mesma idade.

1.3.2.2 – Factores genéticos

A aterosclerose é uma doença complexa e multifactorial, e é provável que muitos genes possam contribuir tanto para o aparecimento como para a patogénese da doença. Os avanços na genética molecular têm revelado que polimorfismos genéticos podem influenciar significativamente a susceptibilidade à aterosclerose. Um grande número de genes candidatos, polimorfismos genéticos e locais susceptíveis foram identificados nos últimos anos, e o seu número está a aumentar rapidamente. Duas principais abordagens experimentais estão a ser utilizadas para identificar e compreender o papel destes genes: a primeira aplica a tecnologia genómica e proteómica para estudar a expressão, funções e interacções dos genes em modelos de aterosclerose (Tuomisto e col., 2005). A segunda abordagem é a de estudar as populações humanas para as variações genéticas que se correlacionam com (e podem determinar) diferenças nas taxas de aterogénese (Sørensen e col., 1988). Numa dada população, a componente hereditária da aterosclerose (a fracção de doença explicada pela genética) tem sido elevada na maioria dos estudos, frequentemente superior a 50% (Tuomisto e col., 2005; Goldbourt e Neufeld, 1986).

Para além disso, os genes que predispõem para a hipertensão, diabetes tipo 2, disfunção endotelial, proliferação celular, remodelação de tecidos e defeitos homeostáticos podem ser simultaneamente considerados genes relevantes para a aterosclerose. No entanto, há uma falta de resultados consistentes de diferentes estudos e grupos populacionais, o que cria uma certa ambiguidade sobre o papel das variações genéticas na patogénese da aterosclerose. Muitas das variações genéticas individuais têm apenas um efeito modesto sobre o risco de doenças ateroscleróticas, mas os seus efeitos são reforçadas em sinergismo com outros factores genéticos e ambientais. Além disso, as variações dentro dos grupos populacionais, tais como variações na idade, sexo, etnia e tamanho da amostra, bem como as diferenças dos resultados clínicos podem influenciar significativamente os resultados dos estudos de associação genética.

Neste momento ainda não é recomendado, de uma forma geral, o uso da genotipagem para a estimativa do risco. No entanto, sabe-se que para o diagnóstico de hiperlipidemias genéticas específicas, a genotipagem da apolipoproteína E (apoE) e dos genes associados com o HF podem ser consideradas. A apoE está presente em três isoformas (apoE2, apoE3 e apoE4). A genotipagem da apoE é utilizada principalmente para o diagnóstico de disbetalipoproteinemia (homozigotia apoE2) e é indicada nos casos

de hiperlipidemia combinada grave. Ferramentas para a triagem genética em famílias com HF já estão disponíveis e devem ser usadas em clínicas especializadas (Wierzbicki e col., 2008).

Será de esperar que no futuro, à semelhança do que alguns estudos já mostram, um painel de genótipos possa ser utilizado para a identificação de indivíduos com alto risco de desenvolvimento de aterosclerose e de DCV (Drenos e col., 2007).

1.4 – Outros marcadores importantes na determinação do risco cardiovascular

1.4.1 – A disfunção endotelial como etapa chave na aterogénese

O endotélio saudável produz e expõe à superfície numerosas substâncias que ajudam a manter a estrutura da parede vascular e a homeostasia vascular, bem como a regular o tónus vascular e o tráfego leucocitário. Em resposta a vários estímulos agressivos a célula endotelial modula as suas propriedades no sentido de restaurar a homeostasia vascular. Na maioria das situações, estas alterações no fenótipo da célula endotelial são temporárias e não comprometem a posterior restauração da função endotelial. Contudo, em certas condições patológicas, tais como na aterosclerose, a função da célula endotelial está perturbada de forma crónica, sendo esta alteração um passo fundamental para a progressão da patologia. A evolução do conhecimento científico nas últimas décadas permitiu aprofundar os conhecimentos sobre a fisiopatologia da aterosclerose, sendo esta actualmente entendida como um processo dinâmico e progressivo procedente de disfunção endotelial e de inflamação da parede vascular. A evolução e o prognóstico da aterosclerose, e a eficácia das estratégias terapêuticas podem ser determinados com recurso à avaliação da função endotelial. Esta pode ser avaliada através da determinação dos níveis, na circulação sanguínea, de vários biomarcadores expressos ou libertados pelo endotélio.

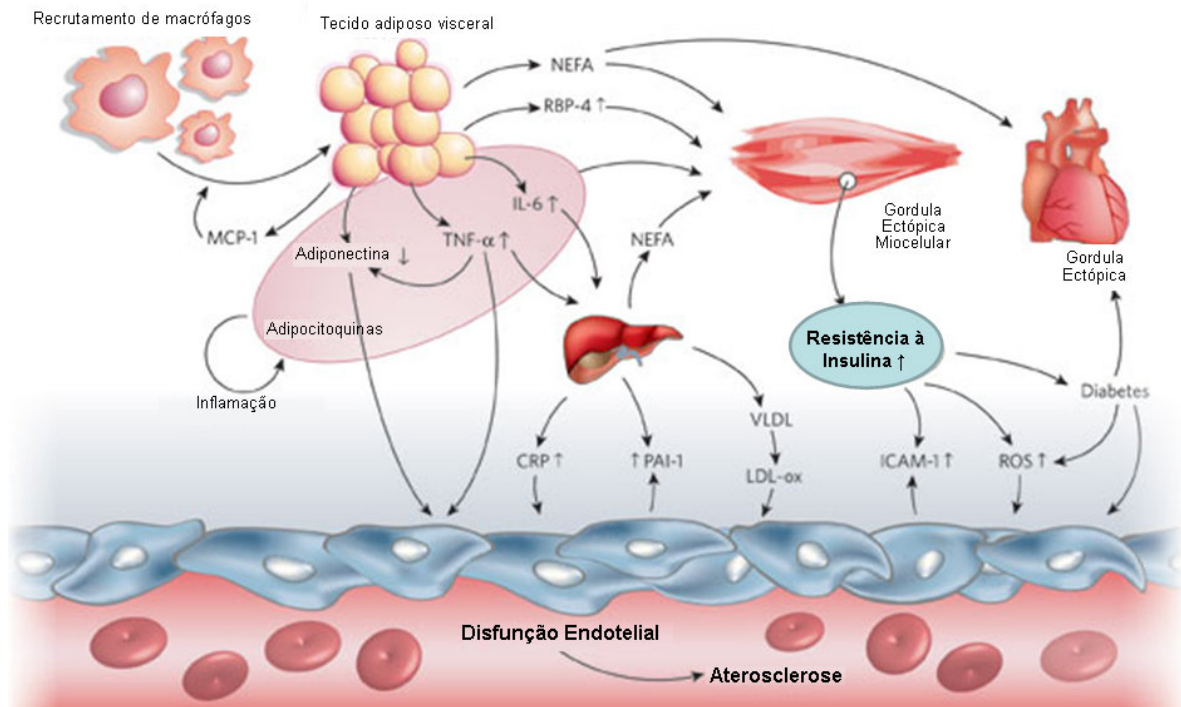


Figura 1.4 – Mecanismos de disfunção endotelial que contribuem para o processo de aterosclerose. A gordura visceral contribui particularmente para a disfunção endotelial através do efeito directo de adipocitoquinas, principalmente adiponectina e TNF- α , que são segregadas pelo tecido adiposo após o recrutamento de macrófagos (através da proteína quimioatraente de monócitos, MCP-1). Os efeitos indirectos do TNF- α e IL-6 podem influenciar a inflamação (PCR) e a disfunção endotelial. A resistência à insulina induzida por citocinas (IL-6, TNF- α e adiponectina), NEFA e proteína de ligação ao retinol 4 (RBP-4) podem induzir o stress oxidativo e a disfunção endotelial subsequente (PAI-1 e ICAM-1). A acumulação de gordura, resistência à insulina, inflamação induzida pelo fígado e características de dislipidemia, todas podem levar ao processo de aterosclerose prematura. Adaptado de Van Gaal e col., 2006.

As células endoteliais em situação fisiológica basal não expressam moléculas que possibilitam a adesão de leucócitos circulantes. No entanto, a activação da célula endotelial pela trombina, endotoxinas ou citocinas inflamatórias (como por exemplo, a IL-1 e o TNF- α), induz a expressão superficial de uma série de moléculas fundamentais para a adesão e migração dos leucócitos da corrente sanguínea para os tecidos lesados (Springer, 1995). Este processo é mediado em grande parte pelas moléculas de adesão celular (CAMs). As CAMs são glicoproteínas expressas na superfície celular após activação, que estão envolvidas na ligação célula-célula e célula-matriz extracelular. Existem quatro grupos principais de CAMs: as imunoglobulinas, as selectinas, as integrinas e as caderinas. Contudo, apenas os três primeiros são importantes na regulação do tráfego leucocitário, sendo a família das caderinas a responsável pela interacção célula-célula ao nível tecidual contribuindo para a manutenção da sua integridade. A superfamília das imunoglobulinas inclui as moléculas de adesão intercelular (ICAMs) e as moléculas de adesão vascular

(VCAMs); a família selectina inclui a molécula de adesão leucócito-endotélio (selectina-E), a molécula de adesão plaqueta-endotélio (selectina-P) e a molécula de adesão linfócito/monócito-endotélio (selectina-L); na família das integrinas, as mais importantes para a adesão endotelial são as integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 7$ (Elangbam e col., 1997; Yong e Khwaja, 1990).

A primeira fase do tráfego leucocitário transendotelial é mediada, em parte, pelas selectinas e caracteriza-se pela redução do fluxo por vasodilatação e pela adesão e subsequente anexação de leucócitos da circulação ao endotélio adjacente (Bevilacqua, 1993). As selectinas são expressas na superfície das células endoteliais, leucócitos e plaquetas; a sua expressão no endotélio é induzida por várias citocinas inflamatórias, tais como a IL-1 e o TNF- α (Saadeddin e col., 2002). Entre as várias selectinas, a selectina-E apresenta características ímpares, uma vez que é a única que deriva somente das células endoteliais, enquanto as restantes provêm de múltiplas fontes (Bevilacqua, 1993). A selectina-E estabiliza as interações celulares leucócito-endotélio através da promoção da adesão célula-célula. Não sendo expressa nas células endoteliais quiescentes, é sobre-expressa em poucas horas em resposta a um estímulo inflamatório. As selectinas ligam-se aos leucócitos de forma reversível, atraindo-os da circulação para o endotélio e induzindo a sua desaceleração e o início do seu “transporte” através da superfície endotelial. A segunda fase do tráfego leucocitário, caracterizada pela firme ligação dos leucócitos ao endotélio, é mediada pela superfamília das imunoglobulinas, envolvendo a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), as quais interagem com as integrinas na superfície dos leucócitos que estão a ser transportados para promover a sua ligação estável ao endotélio (Bevilacqua, 1993; Tedder e col., 1995). Uma vez firmemente ligados, os leucócitos iniciam o processo de transmigração, via parede capilar, da corrente sanguínea para o espaço intersticial tecidual (Zimmerman e col., 1992). A ICAM-1 é expressa em condições basais pelas células endoteliais, sendo sobre-expressa em resposta a vários estímulos inflamatórios, tais como várias citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-1, TNF- α e interferão- γ). A VCAM-1 é expressa por células endoteliais activadas e células musculares lisas da parede vascular, e promove a firme adesão célula-célula e eventual transmigração de células inflamatórias. O seu mecanismo de acção é consequente da sua ligação à integrina $\alpha 4\beta 1$ (ou VLA-4 – antigénio muito tardio-4), uma proteína intrínseca de membrana expressa por monócitos, linfócitos e

eosinófilos (Elices e col., 1990). Após expressão das VCAMs-1, aquelas células com receptores para VCAM-1 aderem preferencialmente a esses locais, sendo subsequentemente estimulada a sua migração através das junções inter-endoteliais até ao espaço subendotelial (Hansson, 2005). Esta fase final da migração leucocitária entre as células endoteliais envolve a molécula de adesão celular endotélio-plaqueta, uma vez que esta se concentra nas junções endoteliais e facilita a diapedese dos leucócitos (Newman, 1997).

Encontram-se na literatura vários estudos mostrando correlações significativas entre os níveis séricos de CAMs e os factores de risco cardiovascular em adultos aparentemente saudáveis (Demerath e col., 2001; Rohde e col., 1999). Em indivíduos sem manifestações clínicas de patologia cardiovascular, a ICAM-1 solúvel (sICAM-1) parece ser, entre as CAMs, o melhor marcador de lesão endotelial e o que melhor se correlaciona com os vários factores de risco cardiovascular (Demerath e col., 2001). Por exemplo, Chae e col. (2001) reportando dados do *Physicians' Health Study*, evidenciaram uma associação entre os níveis de sICAM-1 e a pressão sistólica, a pressão de pulso e a pressão arterial média em indivíduos aparentemente saudáveis. Vários estudos investigaram a associação dos níveis séricos de CAMs com o desenvolvimento e a progressão de DAC, tendo reportado níveis elevados de sICAM-1 e VCAM-1 solúvel (sVCAM-1) em indivíduos com patologia aterosclerótica (Tousoulis e col., 2001). Especialmente em relação à sICAM-1, os seus níveis séricos encontram-se elevados em indivíduos com factores de risco cardiovascular, mas assintomáticos, e indivíduos com evidência clínica de patologia aterosclerótica (Ghaisas e col., 1997), com ou sem evento cardiovascular prévio (Rohde e col., 1999). Adicionalmente, níveis elevados de sVCAM-1 e de sICAM-1 correlacionaram-se significativamente com a gravidade angiográfica da aterosclerose (Rohde e col., 1998). O valor preditivo das CAMs em relação a futuro evento cardíaco tem também sido alvo de estudo, sendo sugerido que níveis elevados de sICAM-1 se constituem como factor de risco independente de futuro enfarte agudo do miocárdio (Haim e col., 2002) e de reestenose precoce pós-angioplastia (Kamijikkoku e col., 1998). Níveis elevados de sVCAM-1 têm também revelado valor preditivo para futura morte por causas cardiovasculares em pacientes com DAC, sendo actualmente percebidos como um importante indicador de instabilidade da placa aterosclerótica (Blankenberg e col., 2001).

1.4.2 - Associação entre hiperuricemia e aterogénese

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas; nos mamíferos a uricase presente no fígado converte o urato em alantoína, reduzindo substancialmente os níveis de ácido úrico no plasma, sendo eliminado pelo rim (Wu e col., 1992). A relação entre o ácido úrico e as doenças cardiovasculares tem sido conhecida desde o século 19 (Mohamed, 1879), depois de vários autores relatarem a associação clássica da gota, hipertensão, obesidade e doenças cardiovasculares (Culleton e col., 1999; Choi e col., 2005). Outros estudos mostraram que a maioria dos indivíduos tinha hiperuricemia, mas não gota (Johnson e col., 2005) e relataram a sua associação com a obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia, doença renal e cardiovascular, e mais recentemente com a síndrome metabólica (Coutinho e col., 2007). Devido à forte associação com factores de risco cardiovascular, é possível que a hiperuricemia além de um marcador de risco seja um factor de risco independente para a aterosclerose (Ioachimescu e col., 2008), o que tem sido avaliado em vários estudos epidemiológicos, mas com resultados até agora controversos (Culleton e col., 1999; Alderman e col., 1999; Liese e col., 1999; Bos e col., 2006; Moriarity e col., 2000; Hozawa e col., 2006; Niskanen e col., 2004; Krishnan e col., 2006).

Devido à sua alta prevalência, a obesidade abdominal e a síndrome metabólica são frequentemente associadas com a prevalência de doenças cardiovasculares (Grundy e col., 2005). O ácido úrico no plasma é frequentemente elevado em indivíduos com síndrome metabólica e grandes estudos epidemiológicos mostram que a prevalência aumenta de acordo com os níveis de ácido úrico (Schmidt e col., 1996; Yoo e col., 2005). Estes resultados, em associação com outros estudos (Tuttle e col., 2001; Chien e col., 2005) mostraram uma independente e clara associação entre os níveis de ácido úrico e a síndrome metabólica, sendo que esta relação ocorre principalmente em mulheres. No sexo masculino, a associação dos níveis de ácido úrico e síndrome metabólica foi mais fraca devido à forte ligação entre a obesidade abdominal e a patologia (Onat e col., 2006). Em relação à obesidade abdominal, estudos feitos em homens japoneses magros e obesos mostraram que a adiposidade visceral medida por tomografia computadorizada foi um forte contribuinte para as concentrações elevadas de ácido úrico, possivelmente devido à redução na libertação desta substância (Takahashi e col., 1997; Ishizaka e col.,

2005). Uma explicação possível seria a de que a hiperinsulinemia, devido à resistência à insulina e adiposidade visceral, leva a um aumento da absorção de ácido úrico nos túbulos renais (Galvan e col., 1995).

Por outro lado, também há evidências de que a hipertensão, que é geralmente associada a outros componentes da síndrome metabólica pode mediar a relação directa entre esta patologia e o aumento dos níveis de ácido úrico (Lin e col., 2004). Os níveis séricos de ácido úrico aumentados em indivíduos assintomáticos e sem complicações mas com hipertensão essencial pode reflectir alterações vasculares renais iniciais, com redução do fluxo sanguíneo cortical e secreção tubular diminuída de urato causada pela sua reduzida chegada aos locais de secreção tubular (Verdecchia e col., 2000). A insuficiência renal está associada com o aumento do risco de eventos cardiovasculares, e é independente dos factores de risco concomitantes como diabetes ou hipertensão (Go e col., 2004). Níveis de ácido úrico são frequentemente elevados em indivíduos com disfunção renal (Johnson e col., 2003).

A correlação da PCR, um marcador de inflamação subclínico relacionado com a aterosclerose, e os níveis séricos de ácido úrico tem sido já descrita (Ruggiero e col., 2006; Fröhlich e col., 2000). Foi encontrada uma associação independente e significativa entre o ácido úrico e marcadores inflamatórios, como a contagem de células brancas do sangue, contagem de neutrófilos do sangue, níveis de PCR, interleucina e factor de necrose tumoral (TNF- α) (Ruggiero e col., 2006; Ruggiero e col., 2007). Além disso, há uma correlação positiva entre o ácido úrico e a inflamação em pacientes com insuficiência cardíaca sistólica (Leyva e col., 1998) independentemente de factores de confusão como diuréticos, insuficiência renal, resistência à insulina ou consumo de álcool. Estes dados sugerem que o ácido úrico não é apenas um marcador da taxa catabólica, mas também pode estar activamente envolvido no processo inflamatório.

O efeito enzimático da xantina oxidase durante a isquémia tecidual é a produção de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e ácido úrico (Zweier e col., 2005). As ERO podem induzir disfunção endotelial através da redução da biodisponibilidade do NO. O ácido úrico apresenta potentes propriedades antioxidantes e poderia neutralizar a formação de ERO (Nieto e col., 2000). No entanto, também há evidências de que a hiperuricemia, por si só prejudica a vasodilatação dependente do endotélio, por redução da NO sintetase em experiências com animais (Khosla e col., 2005). Portanto, a hipótese de que o ácido úrico

sozinho induz a disfunção endotelial, e que ela pode ser revertida pela sua redução, independentemente dos efeitos concomitantes sobre a produção de ERO, continua por esclarecer.

1.4.3 - Angiogénese e aterogénese – papel do VEGF

O papel da formação de vasos sanguíneos dentro dos vasos sanguíneos doentes tornou-se um dos enigmas de destaque na biologia da doença cardiovascular. A geração de vasos sanguíneos é um pré-requisito para o desenvolvimento embrionário e é cada vez mais reconhecida por desempenhar um papel essencial na patogénese de diversas doenças humanas crónicas (Carmeliet, 2003; Kaiser e col., 1999; Folkman, 1995). Na aterosclerose, no entanto, o papel da angiogénese permanece uma questão altamente controversa, e não existe um consenso quanto ao facto da angiogénese poder ser um factor chave da patogénese da formação da placa aterosclerótica, ou ser uma forma de tratar a doença cardíaca coronária. A controvérsia em torno do papel da angiogénese na doença isquémica do coração reflecte, em parte, a complexidade do processo da doença subjacente. Um crescente corpo de evidências suporta uma associação entre a angiogénese intra-lesional com placas ateroscleróticas que causam síndrome coronária aguda (Tenaglia e col., 1998). Estas placas vulneráveis agudas são mais propensas a romper e progredirem para causar oclusão intra-arterial. No caso das artérias coronárias, esta súbita e catastrófica restrição do fornecimento de sangue ao coração provoca uma síndrome coronária aguda, resultando frequentemente numa perda fatal da função cardíaca (Boersma e col., 2003). O problema agudo, no caso da doença arterial coronária, é a insuficiência vascular, mas este é o resultado de um processo fisiopatológico complexo em que a angiogénese pode ter um papel vital, embora ainda incerto.

A discussão em torno do papel patogénico da angiogénese na aterosclerose tem sido particularmente enérgica, porque um objectivo terapêutico fundamental tem sido a utilização de citocinas angiogénicas como o VEGF ou membros da família do factor de crescimento de fibroblastos (FGF) para estimular a formação colateral de vasos sanguíneos na isquémia cardíaca e dos membros, uma abordagem chamada terapêutica angiogénica (Simons e Ware, 2003). Embora esta estratégia seja apoiada por um impressionante conjunto de pesquisas pré-clínicas, sugerindo que o VEGF, o FGF-2 e

outras citocinas angiogénicas podem promover a revascularização em diversos modelos animais de doença cardiovascular isquémica, os dados dos ensaios clínicos até agora têm sido inconclusivos. Mais problemático ainda para os defensores da angiogénese terapêutica, é a existência de vários estudos recentes que sugerem que o VEGF e outros factores angiogénicos podem promover a aterosclerose em certos modelos animais e potencialmente destabilizar as placas coronárias, promovendo a angiogénese intra-lesional (Celletti e col., 2001; Moulton e col., 1999; Heeschen e col., 2001).

A origem dos vasos recém-formados e o papel patogénico da neovascularização são questões não resolvidas e importantes para a compreensão dos mecanismos de formação de placas; além disso, a falta de consenso sobre a contribuição da angiogénese tem implicações práticas graves porque continua a colocar um ponto de interrogação sobre a utilização do VEGF e outros factores angiogénicos para o tratamento de doença cardiovascular isquémica.

Uma associação entre a neovascularização da íntima e a aterosclerose foi observado pela primeira vez por Koester em 1876 (Koester e col., 1876); observações semelhantes foram feitas por Winternitz e col., em 1938. Patterson, em 1938, sugeriu que a ruptura de placas capilares pode provocar hemorragia intraplaca, levando a trombose coronária. Foi visto mais tarde que as íntimas das artérias humanas adultas são avasculares até que ultrapassem um certo espessamento (Geiringer, 1951). O estudo seminal de Barger e col. (1984) sintetizaram muitas destas observações anteriores através da hipótese de que a proliferação da vasculatura adventícia de artérias coronárias permitia que as placas ateroscleróticas desenvolvessem uma maior espessura pelo fornecimento de oxigénio e nutrientes para o núcleo das lesões. Barger e Beeuwkes (1990) posteriormente propuseram que a rede neovascular em placas ateroscleróticas coronárias pode ser mais frágil e propensa à ruptura e, portanto, uma causa potencial de destabilização da placa e espasmo vascular, levando a síndromes coronárias agudas.

Estudos posteriores revelaram um quadro mais complexo do relacionamento entre a neovascularização e a patologia da placa aterosclerótica, sendo a neovascularização mais comum em locais de infiltração de células inflamatórias crónicas, tais como macrófagos e linfócitos, mas menos comuns nas placas altamente calcificadas ou hialinizadas (Kumamoto e col., 1995). Além disso, embora uma menor hemorragia

fosse frequente ao redor dos vasos recém-formados, era menos comum em locais com maior densidade de vasos.

Um papel para a neovascularização na instabilidade da placa tem sido amplamente sugerido, mas uma evidência directa ainda não existe, em parte porque os factores críticos que precipitam a ruptura de placa permanecem desconhecidos e também porque modelos animais de confiança de ruptura de placa análogos à situação dos humanos ainda não foram bem desenvolvidos. No entanto, os estudos em lesões de humanos sugerem que existe uma relação espaço-temporal entre os microvasos e as regiões de placas mais vulneráveis à ruptura. Os microvasos parecem ter uma predilecção para as regiões do ombro das placas ateroscleróticas (Sueishi e col., 1997; Williams e col., 1988; Kumamoto e col., 1995; O'Brien e col., 1994), enquanto que um estudo recente sobre a neovascularização em 269 placas ateroscleróticas avançadas de humanos concluiu que a formação de microvasos está fortemente correlacionada quer com a ruptura da placa como também com as características próprias das placas vulneráveis. Assim, um aumento na densidade de microvasos ocorreu em placas rompidas em comparação com as não rompidas mas também foi encontrada nas regiões do ombro de placas e foi fortemente associada a um elevado grau de infiltração de macrófagos, hemorragia intraplaca, e lesões de fibroateroma de tampão fino (*thin-cap lesions*) (Moreno e col., 2004). Além de uma associação entre microvasos e placas vulneráveis, diversas citocinas pró-angiogénicas são expressas em lesões humanas, dando mais peso ao argumento de que a neovascularização é um processo activo no meio aterosclerótico.

Que conclusões podem ser tiradas a partir de grandes estudos com animais e humanos? A neovascularização é, sem dúvida, uma comum, mas não invariável, característica da patologia das lesões ateroscleróticas humanas e encontra-se frequentemente na maior parte da experimentação animal (primata, porco e cão) de modelos de aterosclerose e espessamento da íntima. A interpretação dos dados suporta um papel da angiogénese na aterosclerose e também promove uma maior necessidade de compreensão dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento da angiogénese.

1.5 – Referências

- Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 2006; 355:763-78.
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120(16):1640-5.
- Al-Delaimy WK, Manson JE, Solomon CG, et al. Smoking and risk of coronary heart disease among women with type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2002; 162(3):273-9.
- Alderman MH, Cohen H, Madhavan S, et al. Serum uric acid and cardiovascular events in successfully treated hypertensive patients. *Hypertension* 1999; 34(1):144-50.
- Assmann G, Schulte H, Cullen P, et al. Assessing risk of myocardial infarction and stroke: new data from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Eur J Clin Invest* 2007; 37:925-32.
- Assmann G, Schulte H. The importance of triglycerides: results from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Study. *Eur J Epidemiol* 1992; 8 Suppl 1:99-103.
- Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 1998; 81(4A):7B-12B.
- Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366:1267-78.
- Ballou SP, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine* 1992; 4(5):361-8.
- Barger AC, Beeuwkes R 3rd, Lainey LL, et al. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries: a possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1984; 310(3):175-7.
- Barger AC, Beeuwkes R 3rd. Rupture of coronary vasa vasorum as a trigger of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990; 66(16):41G-43G.
- Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 1991; 265(14):1861-7.
- Bazzano LA, Gu D, Whelton MR, et al. Body mass index and risk of stroke among Chinese men and women. *Ann Neurol* 2010; 67(1):11-20.
- Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002; 90(10C):40L-48L.
- Benowitz NL. Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment. *Prog Cardiovasc Dis* 2003; 46(1):91-111.
- Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; 96(9):939-49.
- Bergman RN, Van Citters GW, Mittelman SD, et al. Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome. *J Investig Med* 2001; 49(1):119-26.
- Berlin JA, Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol* 1990; 132(4):612-28.
- Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:767-804.
- Bhagat K, Vallance P. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 1997; 96(9):3042-7.

- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 104(12):1336-42.
- Boersma E, Mercado N, Poldermans D, et al. Acute myocardial infarction. *Lancet* 2003; 361(9360):847-58.
- Bombeli T, Mueller M, Haerberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost* 1997; 77(3):408-23.
- Borchardt RA, Davis RA. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. Rate of transport out of the endoplasmic reticulum determines rate of secretion. *J Biol Chem* 1987; 262(34):16394-402.
- Bos MJ, Koudstaal PJ, Hofman A, et al. Uric acid is a risk factor for myocardial infarction and stroke. *Stroke* 2006; 37(6):1503-7.
- Brown L, Rosner B, Willet W, et al. Cholesterol-lowering effects of dietary fiber: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(1):30-42.
- Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:223-61.
- Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005; 23(2):233-46.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9(6):653-60.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose related and potentially reversible impairment of endothelium- dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993; 88(5 Pt 1):2149-55.
- Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, et al. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001; 7(4):425-9.
- Chae CU, Lee RT, Rifai N, et al. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001; 38(3):399-403.
- Chapman MJ. Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. *Pharmacol Ther* 2006; 111(3):893-908.
- Chaturvedi N, Stevens L, Fuller JH. Which features of smoking determine mortality risk in former cigarette smokers with diabetes? The World Health Organization Multinational Study Group. *Diabetes Care* 1997; 20(8):1266-72.
- Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, et al. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(25):2379-93.
- Chien KL, Hsu HC, Sung FC, et al. Hyperuricemia as risk factor on cardiovascular events in Taiwan: the Chin-Shan Community Cardiovascular Cohort study. *Atherosclerosis* 2005; 183(1):147-55.
- Chiolero A, Wietlisbach V, Ruffieux C, et al. Clustering of risk behaviors with cigarette consumption: a population-based survey. *Prev Med* 2006; 42(5):348-53.
- Chobanian AV, Alexander RW. Exacerbation of atherosclerosis by hypertension. Potential mechanisms and clinical implications. *Arch Intern Med* 1996; 156(17):1952-6.
- Choi HK, Atkinson K, Karlson EW, et al. Obesity, weight change, hypertension, diuretic use and risk of gout in men: the Health Professionals Follow-Up Study. *Arch Intern Med* 2005; 165(7):742-8.

- Chow WS, Cheung BM, Tso AW, et al. Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5 year prospective study. *Hypertension* 2007; 49(6):1455-61.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91(10):3527-61.
- Classics in arteriosclerosis research: On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological processes by N. Anitschkow and S. Chalutow, translated by Mary Z. Pelias, 1913. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1983; 3:178-182.
- Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 2003; 24:987-1003.
- Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2006; 368(1-2):33-47.
- Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2004; 17(1):35-44.
- Coutinho TA, Turner ST, Peyser PA, et al. Associations of serum uric acid with markers of inflammation, metabolic syndrome and subclinical coronary atherosclerosis. *Am J Hypertens* 2007; 20(1):83-9.
- Crandall JP, Knowler WC, Kahn SE, et al., Diabetes Prevention Program Research Group. The prevention of type 2 diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4(7):382-93.
- Cui Y, Blumenthal RS, Flaws JA, et al. Non-high-density lipoprotein cholesterol level as a predictor of cardiovascular disease mortality. *Arch Intern Med* 2001; 161(11):1413-19.
- Cullen P, Schulte H, Assmann G. Smoking, lipoproteins and coronary heart disease risk. Data from the Munster Heart Study (PROCAM). *Eur Heart J* 1998; 19:1632-41.
- Culleton BF, Larson MG, Kannel WB, et al. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: the Framingham Heart Study. *Ann Intern Med* 1999; 131(1):7-13.
- Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial wave forms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(41):14871-6.
- Dattilo AM, Kris-Etherton PM. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1992; 56(2):320-8.
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109(23 Suppl 1):III27-32.
- Day C. Metabolic syndrome, or what you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* 2007; 4(1):32-8.
- de Koning L, Merchant AT, Pogue J, et al. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: Metaregression analysis of prospective studies. *Eur Heart J* 2007; 28(7):850-6.
- Debette S, Beiser A, Hoffmann U, et al. Visceral fat is associated with lower brain volume in healthy middle-aged adults. *Ann Neurol* 2010; 68(2):136-44.
- Demerath E, Towne B, Blangero J, et al. The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women. *Ann Hum Biol* 2001; 28(6):664-78.
- Després JP, Lemieux I, Dagenais GR, et al. HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Quebec Cardiovascular Study. *Atherosclerosis* 2000; 153(2):263-72.

- Drenos F, Whittaker JC, Humphries SE. The use of meta-analysis risk estimates for candidate genes in combination to predict coronary heart disease risk. *Ann Hum Genet* 2007; 71(Pt 5):611-9.
- Ebinc H, Ebinc FA, Ozkurt ZN, et al. Impact of adiponectin on left ventricular mass index in non-complicated obese subjects. *Endocr J* 2008; 55(3):523-8.
- Elangbam CS, Qualls CW Jr., Dahlgren RR. Cell adhesion molecules—update. *Vet Pathol* 1997; 34(1):61-73.
- Eliasson B, Attvall S, Taskinen MR, et al. Smoking cessation improves insulin sensitivity in healthy middle-aged men. *Eur J Clin Invest* 1997; 27(5):450-6.
- Elices MJ, Osborn L, Takada Y, et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990; 60(4):577-85.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1(1):27-31.
- Ford ES, Ajani UA, Croft JB, et al. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N Engl J Med* 2007; 356:2388-98.
- Foster-Schubert KE, Cummings DE. Emerging therapeutic strategies for obesity. *Endocr Rev* 2006; 27(7):779-93.
- Friedman G, Gavish D, Vogel T, et al. Cellular metabolism of human plasma intermediate-density lipoprotein (IDL). *Biochim Biophys Acta* 1990; 1044(1):118-26.
- Fröhlich M, Imhof A, Berg G, et al. Association between C-reactive protein and features of the metabolic syndrome: a population-based study. *Diabetes Care* 2000; 23(12):1835-9.
- Frystyk J, Berne C, Berglund L, et al. Serum adiponectin is a predictor of coronary heart disease: a population-based 10-year follow-up study in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(2):571-6.
- Galvan AQ, Natali A, Baldi S, et al. Effect of insulin on uric acid excretion in humans. *Am J Physiol* 1995; 268(1 Pt 1):E1-5.
- Geiringer E. Intimal vascularization and atherosclerosis. *J Pathol Bacteriol* 1951; 63(2):201-11.
- Gepner AD, Piper ME, Johnson HM, et al. Effects of smoking and smoking cessation on lipids and lipoproteins: outcomes from a randomized clinical trial. *Am Heart J* 2011; 161(1):145-51.
- Ghaisas NK, Shahi CN, Foley B, et al. Elevated levels of circulating soluble adhesion molecules in peripheral blood of patients with unstable angina. *Am J Cardiol* 1997; 80(5):617-9.
- Gibbons GF. Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J* 1990; 268(1):1-13.
- Go AS, Chertow GM, Fan D, et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351(13):1296-305.
- Gofman JW, Lindgren F. The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Science* 1950; 111(2877):166-71.
- Gofman JW. Serum lipoproteins and the evaluation of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1956; 64(4):590-5.
- Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, et al. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 1990; 265(8):4266-72.
- Goldbourt U, Neufeld HN. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 1986; 6(4):357-77.
- Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(4):431-8.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343(6257):425-30.
- Gotto AM, Jr., Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986; 128:3-41.

- Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14 Suppl 2:S1-113.
- Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26(5):463-78.
- Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 112(17):2735-52.
- Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 1998; 81(4A):18B-25B.
- Grundy SM. Lipids, nutrition and coronary heart disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.
- Gueyffier F, Boutitie F, Boissel JP, et al. Effect of antihypertensive drug treatment on cardiovascular outcomes in women and men. A meta-analysis of individual patient data from randomized, controlled trials. The INDANA Investigators. *Ann Intern Med* 1997; 126(10):761-7.
- Gustafson A. Studies on human serum very low density lipoproteins. *Acta Med Stand Suppl* 1966; 446:1.
- Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, et al. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(11):2276-83.
- Haim M, Tanne D, Boyko V, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease. Data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(7):1133-8.
- Handel AE, Disanto G, Ramagopalan SV. Visceral obesity and brain volume. *Ann Neurol* 2010; 68(5):770-1; author reply 771-2.
- Hansen EN, Torquati A, Abumrad NN. Results of bariatric surgery. *Annu Rev Nutr* 2006; 26:481-511.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352(16):1685-95.
- Hashimoto N, Kanda J, Nakamura T, et al. Association of hypoadiponectinemia in men with early onset of coronary heart disease and multiple coronary artery stenoses. *Metabolism* 2006; 55(12):1653-7.
- He J, Whelton PK. Elevated systolic blood pressure and risk of cardiovascular and renal disease: overview of evidence from observational epidemiologic studies and randomized controlled trials. *Am Heart J* 1999; 138(3 Pt 2):211-9.
- Heeschen C, Jang JJ, Weis M, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 2001; 7(7):833-9.
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, et al. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(21):12027-32.
- Hozawa A, Folsom AR, Ibrahim H, et al. Serum uric acid and risk of ischemic stroke: the ARIC study. *Atherosclerosis* 2006; 187(2):401-7.
- Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA* 2002; 288(20):2569-78.
- Hulley S, Grady D, Bush T, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998; 280(7):605-13.

- Hussain MM, Fatma S, Pan X, et al. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16(3):281-5.
- Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 2000; 148(1):1-15.
- Imatoh T, Miyazaki M, Momose Y, et al. Adiponectin levels associated with the development of hypertension: a prospective study. *Hypertens Res* 2008; 31(2):229-33.
- Ioachimescu AG, Brennan DM, Hoar BM, et al. Serum uric acid is an independent predictor of all-cause mortality in patients at high risk of cardiovascular disease. A preventive cardiology information system (PreCIS) database cohort study. *Arthritis Rheum* 2008; 58(2):623-30.
- Ishizaka N, Ishizaka Y, Ei-Ichi T, et al. Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(5):1038-44.
- Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, et al. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension* 2004; 43(6):1318-23.
- Jakicic JM, Marcus BH, Gallagher KI, et al. Effect of exercise duration and intensity on weight loss in overweight, sedentary women: a randomized trial. *JAMA* 2003; 290(10):1323-30.
- James WP. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med* 2008; 263:336-52.
- Jiang R, Schulze MB, Li T, et al. Non-HDL cholesterol and apolipoprotein B predict cardiovascular disease events among men with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(8):1991-97.
- Johnson HM, Gossett LK, Piper ME, et al. Effects of smoking and smoking cessation on endothelial function: 1-year outcomes from a randomized clinical trial. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(18):1988-95.
- Johnson RJ, Feig DI, Herrera-Acosta J, et al. Resurrection of uric acid as a causal risk factor in essential hypertension. *Hypertension* 2005; 45(1):18-20.
- Johnson RJ, Kang DH, Feig D, et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 2003; 41(6):1183-90.
- Kadar A, Glasz T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surg* 2001; 9(2):109-21.
- Kaiser M, Younge B, Bjornsson J, et al. Formation of new vasa vasorum in vasculitis: production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells. *Am J Pathol* 1999; 155(3):765-74.
- Kamijikkoku S, Murohara T, Tayama S, et al. Acute myocardial infarction and increased soluble intercellular adhesion molecule-1: A marker of vascular inflammation and a risk of early restenosis? *Am Heart J* 1998; 136(2):231-6.
- Kannel WB, Dawber TR, Friedman GD, et al. Risk factors in coronary heart disease. An evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease; The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1964; 61:888-99.
- Kannel WB. Blood pressure as a cardiovascular risk factor. *JAMA* 1996; 275(29):1571-6.
- Kannel WB. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *JAMA* 1996; 275(20):1571-6.
- Karastergiou K, Evans I, Ogston N, et al. Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce atherogenic changes in monocytes and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(7): 1340-6.
- Kearney PM, Blackwell L, Collins R, et al. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet* 2008; 371:117-25.
- Kelly S, Frost G, Whittaker V, et al. Low glycaemic index diets for coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 4:CD004467.
- Keys A. Serum cholesterol response to dietary cholesterol. *Am J Clin Nutr* 1984; 40(2):351-9.

- Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction and vasoconstriction. *Kidney Int* 2005; 67(5):1739-42.
- Kistorp C, Faber J, Galatius S, et al. Plasma adiponectin, body mass index, and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2005; 112(12):1756-62.
- Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med* 1996; 334(1):13-8.
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, et al. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 2004; 94(4):e27-31.
- Koenig W, Khuseyinova N, Baumert J, et al. Serum concentrations of adiponectin and risk of type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease in apparently healthy middle-aged men: results from the 18 year follow-up of a large cohort from southern Germany. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(7):1369-77.
- Koester W. Endarteritis and arteritis. *Berl Klin Wochenschr* 1876; 13:454-5.
- Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108(3):205-13.
- Kozakova M, Muscelli E, Flyvbjerg A, et al. Adiponectin and left ventricular structure and function in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(7):2811-8.
- Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 2002; 347(19):1483-92.
- Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res* 1982; 23(1):97-104.
- Krauss RM. Atherogenicity of triglyceride-rich lipoproteins. *Am J Cardiol* 1998; 81(4A):13B-7B.
- Krimbou L, Marcil M, Genest J. New insights into the biogenesis of human high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17(3):258-67.
- Krishnan E, Baker JF, Furst DE, et al. Gout and the risk of acute myocardial infarction. *Arthritis Rheum* 2006; 54(8):2688-96.
- Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(1):85-9.
- Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol* 1995; 26(4):450-6.
- Kurth T, Leitzmann MF. Awakening of the sleeping giant: Obesity and stroke in China. *Ann Neurol* 2010; 67(1):1-2.
- Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ, et al. Apolipoprotein A-I and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five-year follow-up of men in the Québec cardiovascular study. *Circulation* 1996; 94:273-8.
- Larson-Meyer DE, Redman L, Heilbronn LK, et al. Caloric restriction with or without exercise: the fitness versus fatness debate. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42(1):152-9.
- Laughlin GA, Barrett-Connor E, May S, et al. Association of adiponectin with coronary heart disease and mortality: the Rancho Bernardo study. *Am J Epidemiol* 2007; 165(2):164-74.
- Leitinger N. Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14(5):421-30.
- Levy D, Larson MG, Vasan RS, et al. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996; 275(20):1557-62.

- Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96(12):1221-32.
- Leyva F, Anker SD, Godslund IF, et al. Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation. *Eur Heart J* 1998; 19(12):1814-22.
- Li P, Shibata R, Unno K, et al. Evidence for the importance of adiponectin in the cardioprotective effects of pioglitazone. *Hypertension* 2010; 55(1):69-75.
- Li ZY, Wang P, Miao CY. Adipokines in inflammation, insulin resistance and cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38(12):888-96.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473(7347):317-25.
- Libby P. Lesion versus lumen. *Nat Med* 1995; 1:17-18.
- Liese AD, Hense HW, Löwel H, et al. Association of serum acid with all-cause and cardiovascular disease and incident myocardial infarction in the MONICA Augsburg cohort. World Health Organization monitoring trends and determinants in cardiovascular diseases. *Epidemiology* 1999; 10(4):391-7.
- Lin HV, Kim JY, Pocai A, et al. Adiponectin resistance exacerbates insulin resistance in insulin receptor transgenic/knockout mice. *Diabetes* 2007; 56(8):1969-76.
- Lin KC, Tsao HM, Chen CH, et al. Hypertension was the major risk factor leading to development of cardiovascular diseases among men with hyperuricemia. *J Rheumatol* 2004; 31(6):1152-8.
- Liu J, Sempos C, Donahue RP, et al. Joint distribution of non-HDL and LDL cholesterol and coronary heart disease risk prediction among individuals with and without diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28(8):1916-21.
- Liu J, Sempos CT, Donahue RP, et al. Non-high-density lipoprotein and very-low-density lipoprotein cholesterol and their risk predictive values in coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2006; 98(10):1363-68.
- Liu S, Manson JE, Stampfer MJ, et al. Dietary glycemic load assessed by food-frequency questionnaire in relation to plasma high density-lipoprotein cholesterol and fasting plasma triacylglycerols in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(3):560-6.
- Lo J, Dolan SE, Kanter JR, et al. Effects of obesity, body composition, and adiponectin on carotid intima-media thickness in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(5):1677-82.
- Lobão A, Marques P, Leite C, et al. Smoking and cardiovascular risk factors in Barão do Corvo Health Center. *Acta Med Port* 2010; 23(2):159-66.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801):233-41.
- MacMahon S, Peto R, Cutler J, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990; 335(8692):765-74.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, et al. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25(12):1277-94.
- Maiolino G, Cesari M, Antezza K, et al. Prognostic effect of plasma adiponectin (ADPN) in non diabetic high-risk patients. *Hypertension* 2007; 50:818-818.
- Maiolino G, Cesari M, Sticchi D, et al. Plasma adiponectin for prediction of cardiovascular events and mortality in high-risk patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(9):3333-40.

- Malavazos AE, Corsi MM, Ermetici F, et al. Proinflammatory cytokines and cardiac abnormalities in uncomplicated obesity: relationship with abdominal fat deposition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17(4):294-302.
- Mantovani A, Garlanda C, Introna M, et al. Regulation of endothelial cell function by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Transplant Proc* 1998; 30(8):4239-43.
- Manuel DG, Leung M, Nguyen K, et al. Burden of cardiovascular disease in Canada. *Can J Cardiol* 2003; 19:997-1004.
- Marang-van de Mheen PJ, Gunning-Schepers LJ. Variation between studies in reported relative risks associated with hypertension: time trends and other explanatory variables. *Am J Public Health* 1998; 88(4):618-22.
- Marques da Silva P. 25 Perguntas em Dislipidemias. Permanyer Portugal 2006.
- Matsushita K, Yatsuya H, Tamakoshi K, et al. Inverse association of adiponectin with insulin resistance is attenuated with the escalation of insulin resistance: a possible finding of adiponectin resistance. *Circulation* 2007; 116:814.
- Mattar M, Obeid O. Fish oil and the management of hypertriglyceridemia. *Nutr Health* 2009; 20(1):41-9.
- Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 2003; 108(20):2460-6.
- McConnell TR, Klinger TA. Atherosclerosis. In: American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation, eds. AACVPR Cardiac Rehabilitation Resource Manual. Champaign, IL: Human Kinetics, 2006; 3-9.
- Menon V, Li L, Wang X, et al. Adiponectin and mortality in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(9):2599-606.
- Mensink RP, Zock PL, Kester ADM, et al. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(5):1146-55.
- Mente A, de Koning L, Shannon HS, et al. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart diseases. *Arch Intern Med* 2009; 169(7):659-69.
- Miao CY, Li ZY. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol* 2012; 165(3):643-58.
- Miller M, Cannon CP, Murphy SA, et al. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(7):724-30.
- Mitsuhashi H, Yatsuya H, Tamakoshi K, et al. Adiponectin level and left ventricular hypertrophy in Japanese men. *Hypertension* 2007; 49(6):1448-54.
- Mohamed F. On chronic Bright's disease, and essential symptoms. *Lancet* 1879; 1:399-401.
- Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(1):61-74.
- Mooradian AD, Haas MJ, Wong NC. The effect of select nutrients on serum high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I levels. *Endocr Rev* 2006; 27(1):2-16.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation* 2004; 110(14):2032-8.

Moriarty JT, Folsom AR, Iribarren C, et al. Serum acid uric and risk of coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Ann Epidemiol* 2000; 10(3):136-43.

Moulton KS, Heller E, Konerding MA, et al. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; 99(13):1726-32.

Mozaffarian D, Aro A, Willett WC. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63 Suppl 2:S5-21.

Mozaffarian D. Achieving cardiovascular health: a bleak outlook or tremendous potential? *J Am Coll Cardiol* 2011; 57:1697-9.

Mullen KL, Smith AC, Junkin KA, et al. Globular adiponectin resistance develops independently of impaired insulin-stimulated glucose transport in soleus muscle from high-fat-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(1):E83-90.

Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349(9064):1498-504.

Navab M, Reddy ST, Van Lenten BJ, et al. The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S145-9.

NCEP Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285(19):2486-97.

Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997; 99(1):3-8.

Nichols WW, Pepine CJ, O'Rourke MF. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke. *N Engl J Med* 1999; 340(22):1762-3.

Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, et al. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2000; 148(1):131-9.

Nilsson PM, Engstrom G, Hedblad B, et al. Plasma adiponectin levels in relation to carotid intima media thickness and markers of insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(12):2758-62.

Nishi K, Itabe H, Uno M, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(10):1649-54.

Niskanen LK, Laaksonen DE, Nyyssönen K, et al. Uric acid level as a risk factor for cardiovascular and all-cause mortality in middle-aged men: a prospective cohort study. *Arch Intern Med* 2004; 164(14):1546-51.

O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, et al. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1994; 145(4):883-94.

Ohinmaa A, Jacobs P, Simpson S, et al. The projection of prevalence and cost of diabetes in Canada: 2000 to 2016. *Can J Diabetes* 2004; 28:116-23.

Okui H, Hamasaki S, Ishida S, et al. Adiponectin is a better predictor of endothelial function of the coronary artery than HOMA-R, body mass index, immunoreactive insulin, or triglycerides. *Int J Cardiol* 2008; 126(1):53-61.

Olofsson SO, Borèn J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* 2005; 258(5):395-410.

Onat A, Uyarel H, Hergenc G, et al. Serum uric acid is a determinant of metabolic syndrome in a population-based study. *Am J Hypertens* 2006; 19(10):1055-62.

- Ong KL, Li M, Tso AW, et al. Association of genetic variants in the adiponectin gene with adiponectin level and hypertension in Hong Kong Chinese. *Eur J Endocrinol* 2010; 163(2):251-7.
- Onysko J, Maxwell C, Eliasziw M, et al. Large increases in hypertension diagnosis and treatment in Canada after a healthcare professional education program. *Hypertension* 2006; 48:853-60.
- Ordovas JM. Genetic influences on blood lipids and cardiovascular disease risk: tools for primary prevention. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(5):1509S-17S.
- Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, et al. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 2003b; 42(3):231-4.
- Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102(18):2165-8.
- Patterson JC. Capillary rupture with intimal hemaorrhage as a causative factor in coronary thrombosis. *Arch Pathol* 1938; 25:474-87.
- Pilz S, Horejsi R, Moller R, et al. Early atherosclerosis in obese juveniles is associated with low serum levels of adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(8):4792-6.
- Pilz S, Mangge H, Wellnitz B, et al. Adiponectin and mortality in patients undergoing coronary angiography. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(11):4277-86.
- Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, et al. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004; 291(14):1730-7.
- Poston WS 2nd, Foreyt JP. Obesity is an environmental issue. *Atherosclerosis* 1999; 146:201-9.
- Pressure JNCDoHB. The fifth report of the Joint National Committee on detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (JNC V). *Arch Intern Med* 1993; 153(2):154-83.
- Qureshi AI, Feldmann E, Gomez CR, et al. Intracranial atherosclerotic disease: An update. *Ann Neurol* 2009; 66(6):730-8.
- Rader DJ & Brewer B. Lipids, apolipoproteins and lipoproteins U. Goldbourt et al. (ed.), Genetic Factors in Coronary Heart Disease © Kluwer Academic Publishers 1994.
- Rader DJ & Hobbs HH. Disorders of Lipoprotein Metabolism. In Harrison's Principles of Internal Medicine. A.S. Fauci, D.L.Kasper, D.L. Longo, E. Braunwald, S.L. Hauser, J.L. Jameson, and J. Loscalzo, editors. McGraw-Hill, New York 2008; 2416-2429.
- Ridker PM, Rifai N, Cook NR, et al. Non-HDL cholesterol, apolipoproteins A-I and B100, standard lipid measures, lipid ratios, and CRP as risk factors for cardiovascular disease in women. *JAMA* 2005; 294(3):326-33.
- Riediger ND, Clara I. Prevalence of metabolic syndrome in the Canadian adult population. *CMAJ* 2011; 183:E1127-34.
- Rimm EB, Williams P, Fosher K, et al. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ* 1999; 319(7224):1523-8.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics - 2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011; 123(4):e18-e209.
- Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(7):1595-9.

- Rohde LE, Lee RT, Rivero J, et al. Circulating cell adhesion molecules are correlated with ultrasound-based assessment of carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(11):1765-70.
- Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK, et al. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: A systematic review of cohort studies. *Lancet* 2006; 368(9536):666-78.
- Rosito GA, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: The Framingham Heart Study. *Circulation* 2008; 117(5):605-13.
- Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 1976; 193(4258):1094-100.
- Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180(4093):1332-9.
- Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2):115-26.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423):801-9.
- Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, et al. Uric acid and inflammatory markers. *Eur Heart J* 2006; 27(10):1174-81.
- Ruggiero C, Cherubini A, Miller E, et al. Usefulness of uric acid to predict changes in C-reactive protein and interleukin-6 in 3-year period in Italians aged 21 to 98 years. *Am J Cardiol* 2007; 100(1):115-21.
- Saadeddin SM, Habbab MA, Ferns GA. Markers of inflammation and coronary artery disease. *Med Sci Monit* 2002; 8(1):RA5-12.
- Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10 158 incident cases among 262 525 participants in 29 western prospective studies. *Circulation* 2007; 115(4):450-58.
- Schmidt MI, Duncan BB, Watson RL, et al. A metabolic syndrome in whites and African-Americans. The atherosclerosis risk in Communities baselines study. *Diabetes Care* 1996; 19(5):414-8.
- Scholte OP, Reimer WJM, Gitt AK, et al. Cardiovascular Diseases in Europe. Euro Heart Survey and National Registries of Cardiovascular Diseases and Patient Management – 2004. Shopia Antipolis; European Society of Cardiology; 2004.
- Schumaker VN, Adams GH. Circulating lipoproteins. *Annu Rev Biochem* 1969; 38:113-36.
- Shaw K, Gennat H, O'Rourke P, et al. Exercise for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 4:CD003817.
- Shiue I. Does body mass index increase risk of hemorrhagic stroke? *Ann Neurol* 2010; 68(1):115-6; author reply 116.
- Simons M, Ware JA. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(11):863-71.
- Sørensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, et al. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988; 318(12):727-32.
- Souza DS, Johansson B, Bojo L, et al. Harvesting the saphenous vein with surrounding tissue for CABG provides long-term graft patency comparable to the left internal thoracic artery: Results of a randomized longitudinal trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132(2):373-8.
- Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:827-72.

- Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is the relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986; 256:2823-8.
- Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009; 119(5):1322-34.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New Engl J Med* 1989; 320:915-24.
- Sueishi K, Yonemitsu Y, Nakagawa K, et al. Atherosclerosis and angiogenesis: its pathophysiological significance in humans as well as in an animal model induced by the gene transfer of vascular endothelial growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 811:311-22; 322-4.
- Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 2011; 121(6):2094-101.
- Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, et al. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab* 2009; 10(3):178-88.
- Takahashi S, Yamamoto T, Tsutsuni Z, et al. Close correlation between visceral fat accumulation and uric acid metabolism in healthy men. *Metabolism* 1997; 46(10):1162-5.
- Tan HW, Liu X, Bi XP, et al. IL-18 overexpression promotes vascular inflammation and remodeling in a rat model of metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2010; 208(2):350-7.
- Tan KC, Xu A, Chow WS, et al. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(2):765-9.
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A, et al. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J* 1995; 9(10):886-73.
- Tenaglia AN, Peters KG, Sketch MH Jr, et al. Neovascularization in atherectomy specimens from patients with unstable angina: implications for pathogenesis of unstable angina. *Am Heart J* 1998; 135(1):10-14.
- Tenkanen L, Pietila K, Manninen V, et al. The triglyceride issue revisited. Findings from the Helsinki Heart Study. *Arch Intern Med* 1994; 154(23):2714-20.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106(25):3143-21.
- Torigoe M, Matsui H, Ogawa Y, et al. Impact of the high-molecular-weight form of adiponectin on endothelial function in healthy young men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007; 67(2):276-81.
- Tousoulis D, Davies GJ, Asimakopoulos G, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 serum level in patients with chest pain and normal coronary arteries (syndrome X). *Clin Cardiol* 2001; 24(4):301-304.
- Tuomisto TT, Binder BR, Ylä-Herttuala S. Genetics, genomics and proteomics in atherosclerosis research. *Ann Med* 2005; 37(5):323-32.
- Turner RC, Millns H, Neil HA, et al. Risk factors for coronary artery disease in non insulin-dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ* 1998; 316(7134):823-8.
- Tuttle KR, Short RA, Johnson RJ. Sex differences in uric acid and risk factors for coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2001; 87(12):1411-4.

- Van Berendoncks AM, Garnier A, Beckers P, et al. Functional adiponectin resistance at the level of the skeletal muscle in mild to moderate chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2010; 3:185-194.
- Van Den Hoogen PCW, Feskens EJM, Nagelkerke NJD, et al., for the Seven Countries Study Research Group. The relation between blood pressure and mortality due to coronary heart disease among men in different parts of the world. *N Engl J Med* 2000; 342(1):1-8.
- Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 2006; 444(7121):875-80.
- Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, et al. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2002; 106(12):1439-41.
- Verdecchia P, Schillaci G, Reboldi G, et al. Relation between serum uric acid and risk of cardiovascular disease in essential hypertension: the PIUMA study. *Hypertension* 2000; 36(6):1072-8.
- Verma S, Li SH, Wang CH, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: Further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003; 108(6):736-40.
- Vink A, Schoneveld AH, Poppen M, et al. Morphometric and immunohistochemical characterization of the intimal layer throughout the arterial system of elderly humans. *J Anat* 2002; 200(Pt 1):97-103.
- Wang CH, Li SH, Weisel RD, et al. C-Reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 2003; 107(13):1783-90.
- Wang P, Bai C, Xu QY, et al. Visfatin is associated with lipid metabolic abnormalities in Lyon hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37(9):894-9.
- Wang P, Du H, Zhang RY, et al. Circulating and local visfatin / Nampt / PBEF levels in spontaneously hypertensive rats, stroke-prone spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. *J Physiol Sci* 2010; 60(5):317-24.
- Wang P, Vanhoutte PM, Miao CY. Visfatin and cardio-cerebro-vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 59(1):1-9.
- Wang P, Xu TY, Guan YF, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against ischemic stroke through SIRT1-dependent adenosine monophosphate activated kinase pathway. *Ann Neurol* 2011; 69(2):360-74.
- Wang P, Xu TY, Guan YF, et al. Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: Role of nicotinamide mononucleotide. *Cardiovasc Res* 2009; 81(2):370-80.
- Wang Y, Lam KS, Yau MH, et al. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J* 2008; 409(3):623-33.
- Wessel TR, Arant CB, Olson MB, et al. Relationship of physical fitness vs body mass index with coronary artery disease and cardiovascular events in women. *JAMA* 2004; 292(10):1179-87.
- Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, et al. Body mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009; 373(9669):1083-96.
- Wierzbicki AS, Humphries SE, Minhas R. Familial hypercholesterolaemia: summary of NICE guidance. *BMJ* 2008; 337:a1095.
- Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ Res* 1988; 62(3):515-23.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97:1837-47.

- Winternitz MC, Thomas RM, LeCompte PM. *The Biology of Arteriosclerosis*, Springfield, Ill. C.C. Thomas, ed. 1938.
- Wu XM, Muzny DM, Lee CC, et al. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* 1992; 34(1):78-84.
- Xu A, Wang Y, Lam KS, et al. Vascular actions of adipokines molecular mechanisms and therapeutic implications. *Adv Pharmacol* (2010a); 60:229-55.
- Ye J. Adipose tissue vascularization: Its role in chronic inflammation. *Curr Diab Rep* 2011; 11(3):203-10.
- Yi W, Sun Y, Gao E, et al. Reduced cardioprotective action of adiponectin in high fat diet induced type II diabetic mice and its underlying mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 2010; 15(7):1779-88.
- Yong K, Khwaja A. Leucocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev* 1990; 4(4):211-25.
- Yoo TW, Sung KC, Shin HS, et al. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. *Circ J* 2005; 69(8):928-33.
- Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, et al. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: Is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000; 148(2):209-14.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364:937-52.
- Zhang C, Rexrode KM, van Dam RM, et al. Abdominal obesity and the risk of all-cause, cardiovascular, and cancer mortality: Sixteen years of follow-up in US women. *Circulation* 2008; 117(13):1658-67.
- Zhu W, Cheng KK, Vanhoutte PM, et al. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114(5):361-74.
- Zhu X, Parks JS. New roles of HDL in inflammation and hematopoiesis. *Annu Rev Nutr* 2012; 32:161-82.
- Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 1992; 13(3):93-100.
- Zweier JL, Kuppusamy P, Lutty GA. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(11):4046-50.

Capítulo 2

Lipoproteína de alta densidade (HDL)

2.1 – Introdução

Há mais de quatro décadas que vem sendo reconhecido que os níveis séricos elevados de colesterol associados às lipoproteínas de alta densidade (c-HDL) estão relacionados com um risco reduzido de doença cardiovascular (DCV). Muitos estudos observacionais prospectivos realizados em todo o Mundo têm confirmado uma relação inversa entre o c-HDL e o risco cardiovascular, independentemente do género e raça.

Consequentemente, tem sido assumido que aumentando o c-HDL, através da modificação de estilo de vida e/ou de intervenção farmacológica, o risco de DCV é reduzido. Os estudos em animais são consistentes com esta hipótese. As orientações para o tratamento dos lípidos promoveram o reconhecimento generalizado do c-HDL como um alvo terapêutico, especialmente em doentes de alto risco. Alguns ensaios clínicos randomizados sugerem, igualmente, que o aumento do c-HDL afecta beneficemente o risco de DCV. No entanto, uma série de estudos randomizados recentes, supostamente destinados a testar a “hipótese do HDL”, falharam por não conseguirem demonstrar o benefício pretendido. Os resultados destes ensaios têm levado muitos investigadores a questionar se o c-HDL é um alvo terapêutico legítimo. Em resposta às muitas perguntas e incertezas levantadas pelos resultados destes ensaios, a *National Lipid Association*, dos EUA, (Cataplano e col., 2011) convocou recentemente um painel de especialistas para avaliar o estado actual do c-HDL como um alvo terapêutico, quer em termos do conhecimento da estrutura da partícula de HDL, sua composição e funções, quer como forma de identificar as questões relevantes que permanecem por responder sobre o papel das HDL na prevenção ou contribuição para a doença aterosclerótica. O painel concluiu que, apesar de um baixo c-HDL poder identificar pacientes com risco elevado, e muita investigação sugerir que o c-HDL pode desempenhar uma variedade de papéis anti-aterogénicos, este ainda não é efectivamente um alvo terapêutico. Estratificado o risco da importância das lipoproteínas aterogénicas (colesterol de lipoproteína de baixa densidade e c-nHDL), devem permanecer estes os alvos primários e secundários da terapêutica em doentes de risco, conforme descrito pelas directrizes estabelecidas. No entanto, a *National Lipid Association* salienta que a investigação rigorosa sobre a biologia e significado clínico dos baixos níveis de c-HDL deve continuar. O desenvolvimento de novos fármacos concebidos para modular os níveis séricos e a funcionalidade das

partículas de HDL também deve prosseguir. Tendo por base a enorme quantidade de investigação científica, clínica e básica, um número considerável de razões apoiam a necessidade de continuar a investigar o potencial terapêutico da estrutura e das funções das HDL.

2.2 – Dados epidemiológicos

As evidências epidemiológicas que suportam o c-HDL como um preditor inverso de DCV têm sido discutidas há mais de 50 anos. Gofman e col. (1966) relataram pela primeira vez uma associação inversa entre os níveis de c-HDL e o risco de doença isquêmica do coração. Posteriormente, uma associação inversa entre o c-HDL e o risco de DCV foi encontrado no *Norwegian Tromsø Heart Study* (Miller e Miller, 1975), logo seguido por dados longitudinais dos EUA disponíveis a partir do *Honolulu Heart Study* e do *Framingham Heart Study* (FHS) (Rhoads e col., 1976; Gordon e col., 1977). Ambos os estudos encontraram níveis baixos de c-HDL altamente prevalentes em doentes com DCV e associados a um aumento de risco de enfarte agudo do miocárdio (EAM), independente de outros factores de risco. Na verdade, baixos níveis de c-HDL têm sido repetidamente associados ao aumento do risco de doenças cardiovasculares em todo o Mundo, tanto em homens como em mulheres. Por exemplo, estudos observacionais na Alemanha e em Israel (Assmann e Funke, 1990; Goldbourt e Medalie, 1979; Goldbourt e col., 1997; Assmann e col., 1996) identificaram o baixo c-HDL como o mais forte preditor de enfarte agudo do miocárdio, especialmente em homens com mais de 50 anos. Os dados epidemiológicos são consistentes com estudos arteriográficos que encontraram níveis baixos de c-HDL prevalentes em pacientes com doença arterial coronária (DAC) (Pearson e col., 1979), bem como uma relação dose-resposta entre o c-HDL e a extensão da arteriografia que define a DAC (Pearson, 1984).

Com base nos referidos estudos, em meados da década de 80, começou a ser aceite de forma generalizada o c-HDL como importante na avaliação do risco de DCV. Neste contexto, foi bastante surpreendente quando o *Adult Treatment Panel (ATP) do National Cholesterol Education Program* publicou as orientações iniciais para a identificação e gestão da hiperlipidemia em 1988 (NCEP, 1988), dando uma importância mínima à triagem do baixo c-HDL.

O *Framingham Heart Study* demonstrou de forma conclusiva que níveis baixos de c-HDL são um factor de risco para DAC, independentemente do c-LDL: em qualquer nível de c-LDL, uma diminuição no c-HDL aumenta o risco de DAC (Gordon e col., 1977). Estudos posteriores de grandes populações proporcionaram ainda mais evidência no apoio do papel do baixo c-HDL como um factor para DCV. Assim, a análise simultânea de quatro estudos prospectivos americanos (*Framingham Heart Study*, *Lipid Research Clinics Prevalence Mortality Follow-Up Study*, *Coronary Primary Prevention Trial Placebo Group and Multiple Risk Factor Intervention Trial*), indicou que um aumento de 1 mg/dL de c-HDL foi associada com uma redução significativa no risco de DAC, de 2% nos homens e de 3% nas mulheres (Gordon e col., 1989). Estes resultados fomentaram o interesse na possibilidade de que aumentar o c-HDL se poderia traduzir numa melhoria clínica do risco de DCV. Esta possibilidade foi ainda apoiada na prevenção primária do *Helsinki Heart Study* (HHS) em que um aumento de 1% nos níveis de c-HDL, com gemfibrozil, estava associado a uma diminuição de 3% nos eventos relacionados com a DCV (Frick e col., 1987). Outro ensaio randomizado controlado que testou o gemfibrozil foi o *Veterans Affairs HDL Intervention Trial* (VA-HIT), um estudo que mostrou os benefícios do uso deste fármaco para prevenção secundária em veteranos masculinos com DCV que tinham um baixo nível basal de c-HDL (< 35 mg/dL) (Rubins e col., 1999); no VA-HIT mesmo que os níveis de c-HDL aumentassem modestamente (6%), uma proporção significativa do benefício clínico no risco de DCV (22%) foi atribuído ao c-HDL (Robins e col., 2001). A sugestão de que o aumento do c-HDL contribuiu para a redução do risco de DCV no HHS e no VA-HIT foi posteriormente avaliada em ensaios clínicos randomizados usando estatinas.

O *Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial* (Gordon e col., 1986) mostrou que o aumento do c-HDL após o tratamento com uma resina, a colestiramina, se correlacionava com a redução do risco de enfarte agudo do miocárdio ou morte por DCV. Um tema comum surgiu relacionado ao risco de doenças cardiovasculares em pacientes tratados com placebo. Especificamente, indivíduos sujeitos a placebo com baixos níveis de c-HDL (definido pela mediana ou menor tercil) no *Scandinavian Simvastatin Survival Study*, no *West of Scotland Coronary Prevention Trial* e no *Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study* exibiram taxas de eventos maiores do que doentes com níveis mais elevados de c-HDL no início do estudo. Para além disso, a progressão

arteriográfica da DAC também foi maior em doentes com baixos vs altos níveis basais de c-HDL (Ballantyne e col., 1999). Estes dados indicam que o baixo c-HDL foi tanto prevalente como preditivo de eventos cardiovasculares, independentemente de outros factores de risco associados à doença arterial coronária (DAC).

Os níveis plasmáticos de c-HDL também foram valorizados como um importante preditor de taxas de eventos em ensaios clínicos com estatinas (WOSCOPS group, 1998; HPSC group, 2002). Outro estudo, de Brown e col. (2007), descobriu que a adição à niacina (um fármaco conhecido pelo aumento que pode produzir no c-HDL) de uma estatina, com ou sem resinas de ácidos biliares, melhorou o risco de DCV numa extensão maior do que o observado com a monoterapia com estatinas, sugerindo que o aumento de c-HDL pode permitir uma maior redução do risco de DCV do que a diminuição isolada de c-LDL. Apesar da evidência da utilidade do c-HDL como um marcador de risco em doentes tratados com terapêutica antidislipidémica os resultados têm sido conflituosos, pois dependem muitas vezes da extensão dos ajustamentos das covariáveis.

Grandes análises multivariadas usando o *Systematic Coronary Risk Evaluation* (SCORE) com um conjunto de dados contendo os níveis de c-HDL de 104 961 indivíduos (45% mulheres), sem doença coronária pré-existente a partir da junção de 7 estudos prospectivos europeus, confirmaram a relação inversa, independente e forte entre o c-HDL e a mortalidade por DCV e por doença coronária (Cooney e col., 2009).

De 58 estudos prospectivos que forneceram avaliações multivariadas das associações entre o baixo c-HDL e o risco cardiovascular, 31 encontraram uma associação inversa e significativa para todos os “outcomes” cardiovasculares e subpopulações estudadas, enquanto 17 encontraram uma associação significativa para alguns “outcomes” cardiovasculares e/ou subpopulações avaliadas (Chirovsky e col., 2009). Outro estudo epidemiológico de larga escala em que o c-HDL foi avaliado como um marcador de risco em 302 430 indivíduos sem doença vascular inicial, a partir de 68 estudos prospectivos de longo prazo, principalmente na Europa e na América do Norte, confirmaram, em modelos multivariados ajustados tanto para factores de risco lipídicos como para não lipídicos, que o c-HDL foi inversamente associado com eventos cardíacos. Para cada aumento de 15 mg/dL na concentração de c-HDL, o risco de eventos cardíacos foi reduzido em 22% (95% IC, 18% - 26%) (Emerging Risk Factors Collaboration e col., 2009).

Estes dados não deixam dúvida sobre o papel do baixo c-HDL como um factor *major* de risco cardiovascular. Assim, o c-HDL tornou-se um componente importante de algoritmos para avaliar o risco cardiovascular global de pacientes, usado como ferramenta de previsão de risco no estudo de *Framingham*, no índice do PROCAM e na abordagem SCORE (Marma e Lloyd-Jones, 2009; Cooney e col., 2009). Deste modo, o c-HDL deve ser usado na prática clínica como um alvo para intervenção terapêutica e para a definição dos objectivos do tratamento.

Perante todos estes estudos e evidências podemos dizer que o tempo das HDL como um alvo terapêutico chegou! No entanto, é necessário aprofundar o conhecimento sobre as HDL para saber quando e como agir para melhorar a protecção oferecida por estas lipoproteínas. Em suma, é essencial conhecer com precisão as respostas para algumas das principais questões neste contexto: O que são as HDL? Onde são formadas? Como são reguladas? Qual a sua função? De que forma elas protegem contra a aterosclerose? Por que é que o nível plasmático de c-HDL é baixo em algumas pessoas e como pode ser aumentado? Estas e muitas outras questões serão abordadas ao longo dos pontos seguintes e estão no cerne deste trabalho de doutoramento.

2.3 – Composição, síntese, metabolismo e catabolismo das HDL

As HDL são as menores (7-12 nm de diâmetro) e mais densas ($1,063 < d < 1,25$ g/ml) das lipoproteínas plasmáticas, produzidas pelo fígado e pelo intestino delgado (Movva e Rader, 2008). São heterogéneas, compreendendo várias subpopulações de partículas que variam em tamanho, forma, densidade, composição e carga superficial (Gao e col., 2009).

Tal como outras partículas de lipoproteínas plasmáticas, as HDL são principalmente esféricas, consistindo num núcleo lipídico (no caso das HDL este núcleo é constituído principalmente por ésteres de colesterol, com uma pequena quantidade de triglicerídeos) rodeado por uma bicamada superficial de fosfolípidos, colesterol não esterificado e apolipoproteínas. No entanto, existe também uma menor população de partículas de HDL discoidais consistindo apenas em componentes de superfície dispostos como uma bicamada molecular de fosfolípidos e colesterol não esterificado rodeado por apolipoproteínas.

As proteínas das HDL têm sido tradicionalmente divididas em quatro grandes subgrupos: apolipoproteínas, enzimas, proteínas de transferência de lípidos e proteínas menores. No entanto, o recente desenvolvimento das tecnologias proteômicas tem melhorado a sensibilidade de detecção de proteínas, revelando que a carga de proteínas das HDL é muito mais diversificada do que anteriormente se pensava (Heinecke, 2009; Hoofnagle e Heinecke, 2009; Davidson e col., 2009; Davidsson e col., 2010; Gordon e col., 2010).

Foram já identificadas mais de 50 proteínas nas HDL humanas. Além das apolipoproteínas e enzimas, várias outras proteínas envolvidas na resposta de fase aguda foram detectadas nas HDL, bem como proteínas envolvidas na regulação do complemento e inibição da protease (Vaiser e col., 2007; Gordon e col., 2010), levantando a possibilidade de que as HDL possam desempenhar um papel, anteriormente insuspeito, nos mecanismos de defesa do hospedeiro e na inflamação. É importante ter em mente, no entanto, que o conteúdo de todas estas proteínas nas HDL é muito mais baixo do que o das apolipoproteínas principais das HDL (apoA-I e apoA-II).

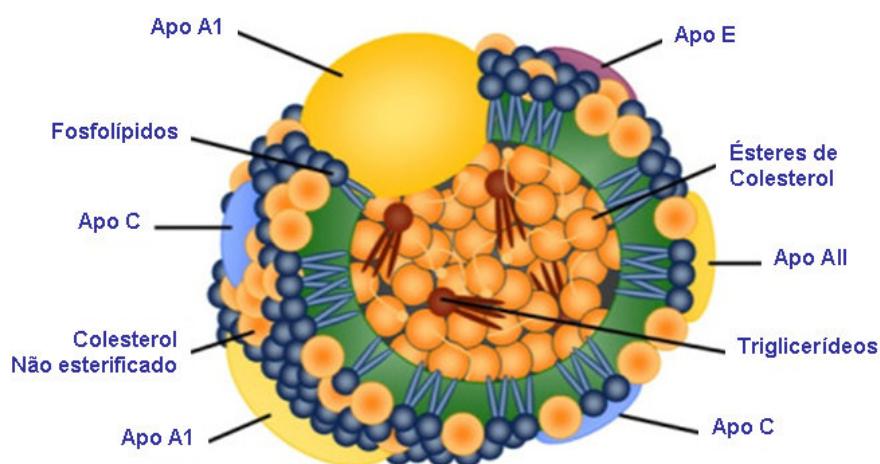


Figura 2.1 – Composição da lipoproteína de alta densidade (HDL). Apo = apolipoproteína; ésteres de colesterol; triglicerídeos; colesterol não-esterificado; fosfolípidos.

2.3.1 - Principais apolipoproteínas e enzimas das HDL

A tabela 2.1 descreve sucintamente as principais características e funções da maioria das apolipoproteínas e proteínas/enzimas que constituem as HDL.

Tabela 2.1 - Apolipoproteínas e outras proteínas/enzimas transportadas pelas HDL

ApoA-I	A principal apolipoproteína das HDL; responsável por cerca de 70% da parte proteica das HDL. Função importante na promoção do efluxo do colesterol das células. Activa a LCAT. Tem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. A maior parte da apoA-I no plasma existe como um componente das partículas de HDL esféricas.
ApoA-II	Segunda proteína mais abundante nas HDL; responsável por cerca de 20% da componente proteica das HDL. Aumenta a estabilidade da partícula de HDL. A principal função não é conhecida. A maior parte da apoA-II no plasma existe como um componente das partículas de HDL esféricas.
ApoA-IV	Uma apolipoproteína menor das HDL. Tem funções muito semelhantes às da apoA-I. Cerca de metade da quantidade de apoA-IV no plasma existe como um componente das HDL e a restante circula sob uma forma de lípidos livres.
ApoA-V	Uma apolipoproteína menor das HDL. Mais envolvida com o metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicéridos do que com as HDL. A maior parte é transportada no sangue como um componente das lipoproteínas ricas em triglicéridos.
ApoE	Uma apolipoproteína menor das HDL. Envolvida no efluxo de colesterol das células. Desempenha um papel no reconhecimento das HDL (e outras lipoproteínas) pelos receptores celulares. Tem um papel no funcionamento do sistema nervoso central. A maior parte é transportada no sangue como um componente das HDL, e a restante nas lipoproteínas ricas em triglicéridos.
ApoC-I, C-II e C-III	Constituintes menores das HDL. Maior função no metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicéridos. Mais transportadas como componentes das lipoproteínas ricas em triglicéridos.
ApoD, apoJ, apoL e apoM	Componentes menores das HDL. As funções não são conhecidas.
Lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT)	Catalisa a esterificação do colesterol nas HDL e é responsável pela maioria dos ésteres de colesterol que circulam no plasma. Desempenha um papel importante no metabolismo e remodelação das HDL.
Proteína de transferência dos ésteres de colesterol (CETP)	Redistribui os ésteres de colesterol das HDL, onde são formados, para outras fracções de lipoproteínas plasmáticas. Desempenha um papel importante no metabolismo e remodelação das HDL.
Proteína de transferência dos fosfolípidos (PLTP)	Transfere fosfolípidos entre as HDL e outras fracções de lipoproteínas plasmáticas. Desempenha um papel importante no metabolismo e remodelação das HDL.
Paraoxonase (PON)	Um importante antioxidante que circula no plasma principalmente ligado às partículas de HDL.

As apolipoproteínas principais das HDL são as apolipoproteínas A-I (cerca de 70% do total de proteínas de HDL) e A-II (cerca de 20% do total), apesar de algumas partículas de HDL conterem também outras menores, tais como as apoA-IV, ApoA-V, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE, APOJ e apoL. Para além disso, as HDL transportam várias proteínas/enzimas adicionais, incluindo a proteína de transferência dos ésteres de colesterol (CETP), a lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), a proteína de transferência dos fosfolípidos (PLTP) e a paraoxonase (PON).

É interessante notar que a concentração de apoA-I em seres humanos normais é mais do que 1,0 g/L, constituindo-se como uma das proteínas mais abundantes no plasma humano.

2.3.2 - Subpopulações de HDL

As HDL em circulação no plasma humano compreendem um número de subpopulações que variam no que diz respeito à forma, tamanho, densidade, composição em apolipoproteínas e mobilidade electroforética.

Forma: a maioria das HDL no plasma são partículas esféricas, embora também exista uma pequena subpopulação de HDL discoidais (≤ 8 nm). As HDL discoidais são pobres em lípidos e apresentam duas ou três moléculas de apoA-I em volta da bicamada fosfolipídica. As partículas discoidais representam uma forma nascente das HDL, relativamente instáveis e com um curto tempo de vida, que existem apenas transitoriamente antes de serem convertidas nas HDL esféricas e maduras. O facto da concentração de HDL discoidais ser normalmente muito baixa reflecte a rapidez da sua conversão em partículas esféricas. As partículas de HDL esféricas são maiores (> 8 nm) e contêm um núcleo hidrofóbico de colesterol esterificado e TGs rodeado por uma parte exterior composta de duas ou mais moléculas de apoA-I, com ou sem apoA-II, fosfolípidos e colesterol livre (Gao e col., 2009).

Tamanho e densidade: as HDL podem ser separadas com base na densidade em três subfracções principais – HDL₁ (densidade (d) média de 1,05g/mL), HDL₂ ($1,063 < d < 1,125$ g/mL) e HDL₃ ($1,125 < d < 1,21$ g/ml). As subfracções HDL₂ e HDL₃ são partículas esféricas e maduras. A composição das HDL₃ é a de uma monocamada de fosfolípidos,

especialmente fosfatidilcolina, e uma pequena quantidade de colesterol livre, apoA-I e apoA-II e um núcleo contendo colesterol esterificado. As HDL₃ recolhem colesterol para formar as partículas HDL₂ maiores sem apoA-II, as quais podem trocar colesterol e TGs, tanto com as partículas de LDL como com as de VLDL. Com base unicamente no tamanho das partículas existem diferentes classificações: a) em cinco subpopulações distintas: HDL_{2b} (diâmetro de 10,6 nm), HDL_{2a} (9,2 nm), HDL_{3a} (8,4 nm), HDL_{3b} (8,0 nm) e HDL_{3c} (7,6 nm); b) em 10 subpopulações: HDL₁, HDL₂ e HDL₃ – agrupadas e designadas como HDL grandes (correspondentes às também designadas HDL₂, com tamanhos entre 10,6 nm – 9,2 nm); HDL₄, HDL₅, HDL₆ e HDL₇ – agrupadas e designadas como HDL intermédias; HDL₈, HDL₉ e HDL₁₀ – agrupadas e designadas como HDL pequenas (as HDL intermédias e pequenas correspondem às designadas HDL₃, tendo tamanhos que podem variar entre 8,4 nm e 7,6 nm). Esta última classificação (HDL grandes, intermédias e pequenas) foi a utilizada nesta tese de doutoramento, estando o processo de fraccionamento descrito mais à frente.

Composição em apolipoproteínas: as HDL também podem ser separadas em duas subpopulações principais com base na sua composição em apolipoproteínas. Uma subpopulação compreende HDL com apoA-I mas não apoA-II (LpA-I), enquanto a outra compreende partículas contendo tanto apoA-I como apoA-II (LpA-I/A-II). A apoA-I é dividida em partes aproximadamente iguais entre as LpA-I e as LpA-I/A-II, na maioria dos indivíduos, enquanto praticamente toda a apoA-II reside nas LpA-I/A-II. Uma pequena proporção da apoA-I existe numa forma livre de lípidos ou numa forma pobre em lípidos. A LpA-I/A-II tende ser menor e mais densa do que o LpA-I prevalecendo na subfracção HDL₃. A LpA-I encontra-se principalmente na subfracção HDL₂ (Cheung e Albers, 1984).

Mobilidade electroforética: as HDL também variam na carga de superfície. Quando separadas por electroforese, as HDL podem ter mobilidade alfa (α), pré-beta (β) ou gama (γ). As partículas alfa (mais rápidas) tendem a ser lipoproteínas esféricas e representam a maior proporção de HDL no plasma humano, e incluem as HDL₂ e as HDL₃, bem como as LpA-I e as LpA-I/A-II. As HDL pré-beta (mais lentas) ou são partículas apoA-I pobres em lípidos, com uma única molécula de apoA-I como uma molécula livre ou em associação com algumas moléculas de fosfatidilcolina e esfingomiélinas, ou partículas

nascentes discoidais consistindo numa ou duas moléculas de apoA-I complexadas com fosfolípidos e, possivelmente, com uma pequena quantidade de colesterol não esterificado. As HDL_y são partículas pobres em lípidos e contêm apoE ou apoA-IV (e não apoA-I) (Huang e col., 1994; von Eckardstein e col., 1995).

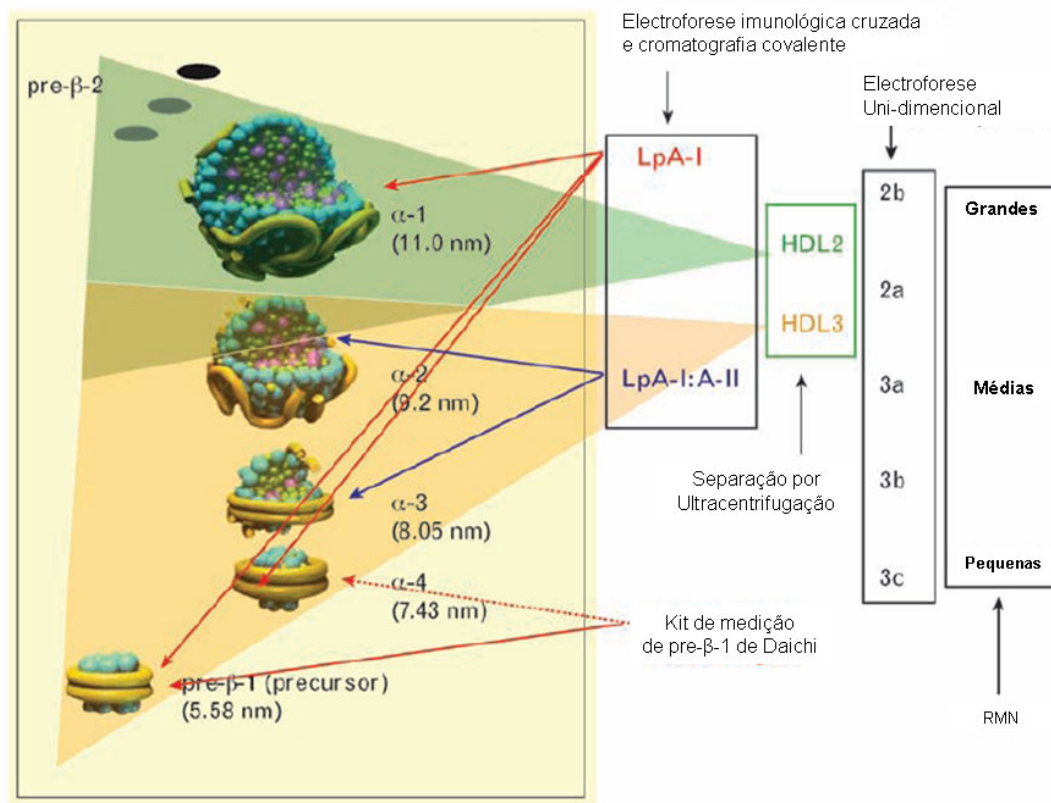


Figura 2.2 – Nomenclatura das subclasses das lipoproteínas de alta densidade (HDL) determinada por diferentes métodos. Adaptado de Asztalos e col., 2011.

É de salientar que a nomenclatura/classificação das diferentes subpopulações de HDL depende da técnica de separação usada, o que também tem gerado alguma confusão quando se fazem comparações entre estudos sobre este assunto.

Devido à crescente necessidade de entender, validar e quantificar os diversos papéis das partículas de HDL no processo aterosclerótico vários investigadores iniciaram um esforço para uniformizar a nomenclatura para as subpopulações de HDL. Recentemente, propôs-se o desenvolvimento de um novo sistema de classificação que define cinco subclasses de HDL, em função das propriedades físicas e químicas, que inclui: partículas muito grandes de HDL (VL-HDL), partículas grandes de HDL (L-HDL), partículas médias de HDL (M-HDL), partículas pequenas de HDL (S-HDL), e partículas muito

pequenas de HDL (VS-HDL). A subclasse de HDL muito pequenas inclui as HDL pré- β -1, discoidais ou HDL nascentes (Rosenson e col., 2011).

2.3.3 – Síntese, metabolismo e catabolismo das HDL

As HDL são sujeitas a um processo de remodelação contínuo no compartimento plasmático. As apoA-I e apoA-II são sintetizadas principalmente no fígado, apesar de uma proporção da apoA-I ser também formada no intestino (Fredenrich e Bayer, 2003; Rye e Barter, 2004; Tailleux e col., 2002; Trigatti e col., 2003). Por um processo dependente de proteína específica conhecida como *ATP binding cassette transporter A1* (ABCA1) (Francone e Aiello, 2002; Oram, 2002; Schmitz e Buechler, 2002; Smith e col., 2004; Srivastava, 2002; Wang e col., 2001; Wang e Tall, 2003), são adicionados às apolipoproteínas, fosfolípidos e uma pequena quantidade de colesterol não esterificado, tornando-as em partículas de HDL discoidais. Estas partículas discoidais adquirem colesterol não esterificado de outras lipoproteínas e das membranas celulares por um processo passivo independente de ABCA1 e também são excelentes substratos para a acção da LCAT, que esterifica o colesterol. Este processo tende a formar partículas esféricas de núcleo lipídico, contendo principalmente ésteres de colesterol. O maior número de partículas de HDL esféricas encontradas no plasma pode ser explicado em função da relação entre a deficiência de esterificação da LCAT e o tempo de permanência das HDL na circulação (Barter e col., 2003).

A remoção das HDL do plasma dá-se por um processo complexo. A maioria dos constituintes é removida separadamente e apenas uma fracção da HDL é metabolizada como partícula intacta (Anderson, 2003). Por exemplo, os ésteres de colesterol são transferidos para as VLDL e LDL, por acção da CETP, ou são selectivamente captados pelo fígado, num processo dependente de receptores ligantes de HDL, sendo o principal deles o SR-BI (Trigatti e col., 2003). Os triacilgliceróis e fosfolípidos são removidos por hidrólises catalisadas por lipases, entre as quais a lipase hepática (LH), lipase endotelial e fosfolipase A2. A apoA-I da HDL é metabolizada independentemente, após a sua dissociação da partícula durante o processo metabólico. A apoA-I dissociada pode ser tanto reutilizada na formação de uma nova partícula de HDL quanto excretada através dos rins. As HDL

contendo somente apoA-I são catabolisadas de forma mais rápida do que aquelas que contêm apoA-I e apoA-II (Fredenrich e Bayer, 2003).

O processo metabólico das HDL tem um papel importante na composição, na forma, no tamanho e na carga de superfície das partículas, sendo o responsável pela heterogeneidade das HDL plasmáticas. O fenómeno de remodelação plasmática ocorre mais rapidamente do que o tempo de permanência das HDL na circulação (3 a 5 dias), sendo o principal responsável pelo metabolismo destas fracções lipoproteicas (Brinton, 2003). Um dos resultados da remodelação das HDL por factores como a CETP, LH e PLTP é a formação de apoA-I pobre em lípidos que pode ser reincorporada na formação de novas partículas de HDL ou excretada na urina. Uma vez formada, a apoA-I pobre em lípidos captará o colesterol celular através da ABCA1, dando início à formação de uma nova partícula de HDL (Fredenrich e Bayer, 2003). Assim, a geração de apoA-I pobre em lípidos é um factor determinante da taxa de efluxo do colesterol celular.

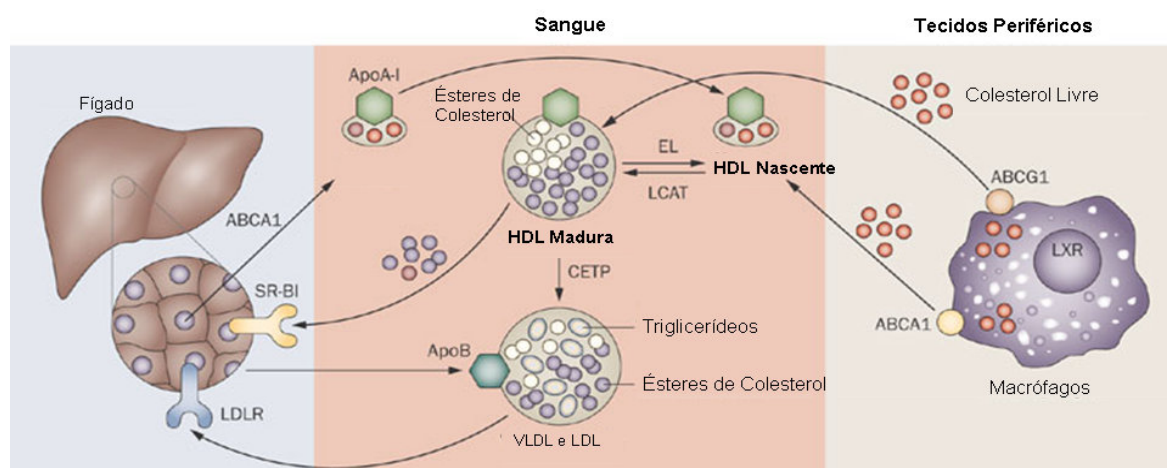


Figura 2.3 – Metabolismo das HDL e transporte reverso do colesterol (TRC). O fígado secreta apolipoproteína A-I (apoA-I) pobre em lípidos, a qual rapidamente adquire colesterol através dos transportadores ABCA1 (ATP binding cassette transporter, da subfamília A 1) nos hepatócitos. A apoA-I pobre em lípidos também promove o efluxo de colesterol livre dos macrófagos via ABCA1. A lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) esterifica o colesterol livre em ésteres de colesterol (EC) para formar HDL maduras, as quais promovem o efluxo de colesterol dos macrófagos pela via do transportador ABCG1, tal como dos tecidos periféricos por processos ainda não totalmente definidos. As HDL maduras podem transferir o seu colesterol para o fígado directamente através dos receptores scavenger classe B, tipo I (SR-BI) ou indirectamente através da proteína de transferência dos ésteres de colesterol (CETP) que medeia a transferência para proteínas constituídas por apoB, com o consequente uptake pelo fígado através dos receptores LDL. O colesterol hepático pode ser excretado directamente para a bÍlis como colesterol ou após a conversão em ácidos biliares e, a não ser que seja reabsorvido pelo intestino, é finalmente excretado pelas fezes. A HDL pode ser remodelada pelas lipases tal como a lipase hepática (LH) e pela lipase endotelial (LE), as quais hidrolisam os triglicerídeos e os fosfolípidos das HDL, respectivamente. Adaptado de Duffy e Rader, 2009.

O mecanismo de remoção da circulação das proteínas presentes nas HDL é bem menos compreendido do que aquele que ocorre com os lípidos associados à partícula. O principal mecanismo de retirada dessas apolipoproteínas é a captação via receptores presentes no fígado e rins, assim como na placenta e no saco amniótico durante a gravidez. Pequenas partículas de HDL de tamanho menor que 8 nm e apoA-I livre de lípidos são filtrados pelos glomérulos renais e posteriormente reabsorvidas no túbulo contornado proximal (Anderson, 2003; Wang e Briggs, 2004).

As HDL que contêm apoE constituem a minoria das partículas de HDL e são internalizadas pelo fígado via receptores de LDL. Também existem evidências da presença de receptores hepáticos de HDL não contendo apoE. Alguns estudos têm identificado locais de ligação para HDL de diferentes tamanhos em células hepáticas, os quais são candidatos a mediadores da captação da partícula de HDL como um todo (Barter e col., 2003). Estudos morfológicos também têm fornecido evidência da ligação e endocitose das HDL no fígado. Alguns autores têm demonstrado ressecção das HDL que tinham sido internalizadas por células hepáticas (Fredenrich e Bayer, 2003).

2.4 – Funções anti-aterogénicas das HDL

O interesse nas HDL disparou recentemente com o reconhecimento das suas múltiplas propriedades anti-aterogénicas. A função melhor conhecida é a capacidade de promover o efluxo de colesterol de células periféricas para o fígado (para excreção), conhecido como transporte reverso do colesterol (TRC). No entanto, as funções anti-aterogénicas das HDL vão para além do TRC e envolvem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-trombóticas, bem como actividades citoprotectoras, vasodilatadoras, anti-infecciosas e anti-diabéticas (Yamashita e col., 2010).

Acredita-se que estas funções fisiológicas variadas reflectem a grande variedade de proteínas transportadas pelas HDL e também a heterogeneidade dos seus complexos; de facto, funções específicas associadas às HDL parecem ser mediadas por uma ou mais proteínas distintas, actuando potencialmente de forma sinérgica (Kontush e Chapman, 2009). Não é apenas o teor das proteínas das HDL que pode influenciar as suas funções, a própria composição lipídica também pode interferir com a associação das diferentes proteínas na superfície das HDL.

2.4.1 - Transporte reverso do colesterol

O transporte reverso do colesterol é a via pela qual o colesterol nos tecidos periféricos é transferido através do plasma para o fígado. Este também pode ser reciclado ou excretado na biliar e/ou utilizado para a produção de hormonas, respectivamente. Para isso são necessários: 1) a transferência de fosfolípidos e colesterol de membranas celulares para partículas lipoproteínas ricas em proteínas e pobres em lípidos, através do espaço extracelular, por um processo dependente de ABCA1 que resulta na formação das HDL discoidais (Huuskonen e col., 2001; Oram, 2002; Von Eckardstein e col., 2001); 2) a esterificação do colesterol mediada pela LCAT da HDL discoidal, transformando-a numa partícula esférica; 3) a interacção das HDL esféricas com as proteínas transportadoras de ésteres de colesterol (CETP), que transferem o conteúdo de ésteres de colesterol (EC), ou parte dele, para as VLDL e seus remanescentes; e 4) a recirculação de EC para o fígado, tanto pela remoção de β -VLDL por meio dos receptores da lipoproteína de baixa densidade quanto pela remoção de partículas de HDL pelos receptores da família SR-B1, que removem selectivamente os EC das partículas de HDL e também de LDL para os hepatócitos e células produtoras de hormonas esteróides, sem internalizar as proteínas das HDL, os fosfolípidos e as apolipoproteínas (Fredenrich e Bayer, 2003).

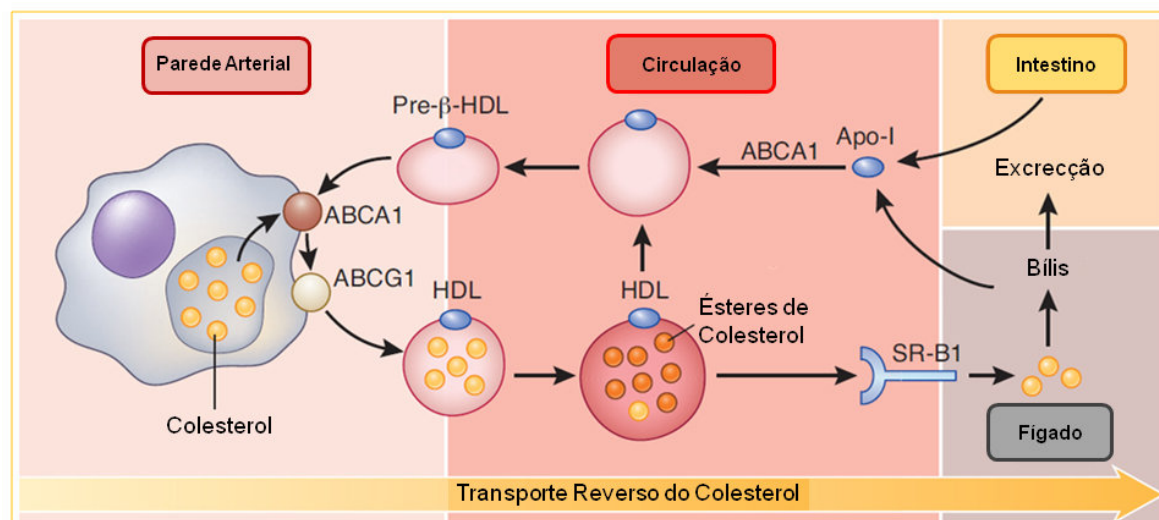


Figura 2.4 – Visão geral do transporte reverso do colesterol pelo HDL. São indicados potenciais locais para novos moduladores do HDL. Adaptado de Heinecke, 2012.

Embora os mecanismos pelos quais ocorre a dissociação de lípidos e lipoproteínas e incorporação dos EC nas membranas plasmáticas não estejam ainda totalmente elucidados, acredita-se que exista a formação de um canal hidrofóbico por onde o

colesterol da HDL se difunde para a membrana plasmática. O processo realizado pelos receptores da família do receptor de LDL (rLDL) ou pelos *scavengers* classe A é diferente, ou seja, acontece a internalização das lipoproteínas via endossomas, seguida da fusão com lisossomas para degradação das partículas lipoproteicas. É importante enfatizar que o TRC é realizado por um conjunto de partículas efectoras, como apoproteínas, lípidos, proteínas de transferência, enzimas, entre outras, associadas ou não às HDL e suas subpopulações, sendo esse um grande desafio para a lipidologia: entender como a relação influxo/efluxo do colesterol pode ser modulada para prevenir a aterosclerose (von Eckardstein e col., 2001).

2.4.2 - Funções pleiotrópicas anti-aterogénicas das HDL

2.4.2.1 - Efeitos antioxidantes das HDL – protecção da oxidação das LDL

A oxidação das LDL é considerado o principal evento de iniciação e/ou desenvolvimento da aterosclerose (Chisolm e Steinberg, 2000; Jialal e Devaraj, 1996; Luliano, 2001; Steinberg, 1993; Westhuyzen, 1997). A LDL oxidada (LDL-ox) actua como factor quimiotático para monócitos que, transformados em macrófagos intumescidos com lípidos (células espumosas), exercem efeitos citotóxicos sobre as células endoteliais, aumentando a activação de plaquetas, estimulando a migração e a proliferação de células musculares lisas (SMCs) e antagonizando os efeitos vasodilatadores do monóxido de azoto (Chisolm e Steinberg, 2000). Diversos autores têm mostrado que as HDL reduzem significativamente as modificações oxidativas das LDL (Fredenrich e Bayer, 2003; Kontush e col., 2003; Mackness e col., 2000; Mackness e col., 1993; Mackness e Durrington, 1995).

A HDL pode inibir a oxidação da LDL quando causada por iões de metais de transição e prevenir a formação de peróxidos lipídicos pela 12-lipoxigenase (Fredenrich e Bayer, 2003; Huang e col., 1998; Kontush e col., 2003; Mackness e col., 2000; Mackness e col., 1993; Mackness e Durrington, 1995; Sakuma e col., 2002; Singh e col., 1997). A HDL também adquire alguns produtos de oxidação da LDL como, por exemplo, lisofosfatidilcolina e peróxidos lipídicos, transportando-os até ao fígado, onde serão metabolizados (Huang e col., 1998). A inibição da oxidação da LDL pela HDL é comumente atribuída ao seu conteúdo antioxidante (α -tocoferol, licopeno, estrogénios) (Behrens e col., 1982; Perugini e col., 2000a; Perugini e col., 2000b), às propriedades

antioxidantes da apoA-I e apoA-II e, principalmente, devido à presença da paraoxonase, uma enzima que catalisa a hidrólise de ácidos carboxílicos aromáticos e compostos organofosforados (Canales e Sanchez-Muniz, 2003; Cao e col., 1999; Mackness e col., 1991; Primo-Parmo e col., 1996; Serrato e Marian, 1995; Watson e col., 1995).

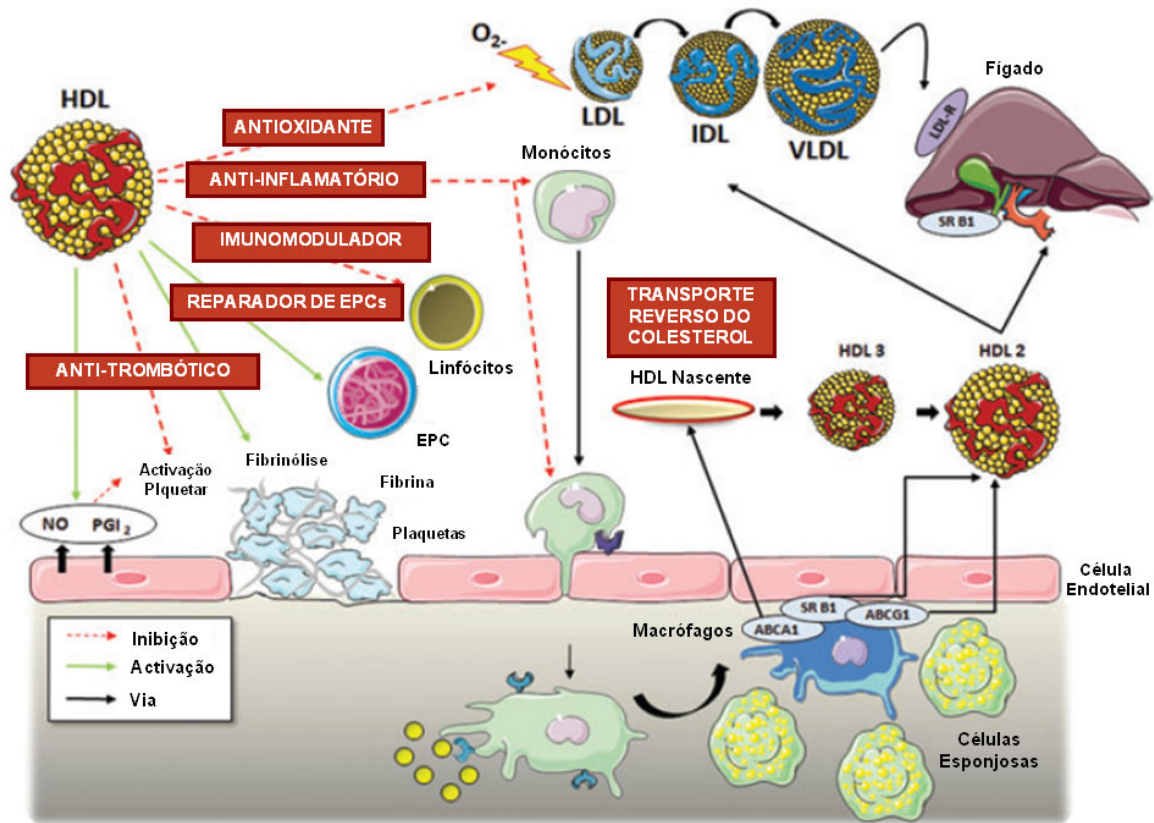


Figura 2.5 – Efeitos anti-ateroscleróticos das HDL. Um dos mecanismos mais ateroprotetores das HDL é a absorção de colesterol dos macrófagos carregados de lípidos (células espumosas) na placa de aterosclerose, após a qual o colesterol ou é transportado directamente para o fígado para excreção na bile ou transportado para as LDL/VLDL. Este processo é denominado "transporte reverso do colesterol" (TRC). Outras propriedades importantes das HDL incluem efeitos favoráveis sobre a reparação celular (estimulação do recrutamento de células progenitoras endoteliais [EPC]), efeitos anti-inflamatórios (prevenção da atracção de monócitos/transmigração para a parede do vaso), bem como efeitos imunomoduladores (modulação da resposta da imunidade inata), anti-trombóticos (prevenção da activação plaquetária, estimulando a libertação de monóxido de azoto [NO] e prostaciclina [PGI₂] e estimulação da fibrinólise) e antioxidantes (prevenção da oxidação do LDL). Adaptado de Badimon e col., 2012.

A paraoxonase também catalisa a quebra de fosfolípidos oxidados nas LDL, os quais estimulam a produção de citocinas e induzem a adesão de monócitos na superfície de células endoteliais (Watson e col., 1995). Para além disso, diminui o conteúdo de peróxidos lipídicos em artérias coronárias humanas e lesões da carótida (Durrington e

col., 2001). Em animais susceptíveis à aterosclerose, como murganhos deficientes em apoE ou em receptores de LDL, altos níveis de marcadores de oxidação estavam acompanhados da diminuição da actividade da paraoxonase (Serrato e Marian, 1995). Tal diminuição também foi observada em animais submetidos a uma dieta aterogénica e em doentes diabéticos com níveis elevados de hemoglobina glicosilada (Ruiz e col., 1995). Por outro lado, a expressão da apoA-I humana em murganhos aumentou a actividade da paraoxonase (Serrato e Marian, 1995). Adicionalmente, diversos estudos genéticos têm confirmado a importância da paraoxonase na inibição do desenvolvimento da aterosclerose. Existem três genes identificados que codificam enzimas com actividade paraoxonase: PON1, PON2 e PON3. O polimorfismo localizado na posição 192 da PON1 parece ser um importante determinante da actividade dessa enzima (Mackness e col., 1999). A isoforma-A, que possui glutamina nessa posição, tem actividade oito vezes mais baixa que a isoforma-B, que possui arginina. Além disso, diversos estudos têm mostrado o aumento do risco de DAC em indivíduos com baixa actividade da paraoxonase (Mackness e col., 1999b).

No entanto, permanece por esclarecer a real importância da paraoxonase nas HDL para as suas propriedades antioxidantes e protectoras da aterosclerose, bem como se é a actividade (fenótipo) ou os polimorfismos (genótipo) que melhor determinam a qualidade das HDL e eventualmente o risco CV (Mackness e Mackness B, 2004).

2.4.2.2 - Efeitos pró-vasorelaxantes e de estabilização da placa

O endotélio vascular disfuncional tem um papel crucial no aparecimento e no desenvolvimento da aterosclerose. Factores importantes da disfunção endotelial são a diminuição da biodisponibilidade de NO e o aumento da afinidade do endotélio a leucócitos que estão associados aos eventos iniciais do processo aterogénico (Anderson, 2003; Cannon, 1998; Harrison, 1994). Diversos estudos *in vivo* têm mostrado efeitos benéficos da HDL na função endotelial (Kuvin e col., 2002; Lupattelli e col., 2003; Mineo e col., 2003; O'Connell e Genest, 2001; Ramet e col., 2003; Yuhanna e col., 2001). Por exemplo, a correlação negativa entre a vasodilatação dependente de NO e os níveis plasmáticos de HDL tem sido descrita, assim como a melhoria da função endotelial na hipercolesterolemia humana após infusão de partículas de HDL (Spieker e col., 2002). Recentemente foi demonstrado que o c-HDL é um factor autónomo de protecção para o

endotélio, induzindo a activação da NO sintetase, a libertação de NO e o efeito de vasorrelaxamento (Ramet e col., 2003).

As partículas de HDL interferem em várias das inúmeras funções secretoras das células endoteliais. A prostaglandina (PGI₂), produzida nas células endoteliais por acção das ciclooxygenases (COX-2), tem alta actividade vasorelaxante, inibe a activação plaquetária e diminui a libertação de factores de crescimento que agem estimulando a proliferação local das células musculares lisas (Cockerill e col., 1999). A HDL, em concentrações fisiológicas, estimula a produção de PGI₂. Este efeito depende de dois factores: a supressão de ácido araquidónico para as células endoteliais, a partir das partículas de HDL, e a indução da síntese de COX-2, que é a principal via de produção de prostanóides pelas células endoteliais (Printseva e col., 1992).

Além de todas as funções anteriormente referidas, as HDL também têm actividade mitogénica (Nofer e col., 2001) e podem potenciar os efeitos benéficos de factores de crescimento (EGFR, PDGF, EGF, IGF). As HDL induzem a proliferação de células do músculo liso podendo fortalecer a cápsula fibrosa da placa aterosclerótica e melhorar a estabilidade da placa.

2.4.2.3 - Inibição da expressão de moléculas de adesão, da activação de leucócitos e efeito anti-inflamatório

A HDL também demonstra ter um papel importante na modulação da síntese do peptídeo natriurético C (CNP), o qual causa vasodilatação, inibe a proliferação das células musculares lisas vasculares (VSMCs) e a secreção de endotelina-1. A placa aterosclerótica sofre forte influência dos tipos celulares nela contidos. Tem sido relatado que a adesão de leucócitos às células endoteliais e a sua interacção com as VSMCs é crucial no desenvolvimento da placa aterosclerótica; este processo é mediado por moléculas de adesão presentes na superfície das células do endotélio vascular, representadas basicamente pelas moléculas de adesão vascular VCAM-1, ICAM-1 e pelas selectinas P, L e E. O processo de adesão dos leucócitos ao endotélio é chamado de marginação, seguido pela fase de activação da ligação ao endotélio e finalmente a fase de migração, em que os leucócitos se tornam aptos a migrar através dos tecidos. Estas moléculas de adesão (necessárias para a adesão dos leucócitos às células endoteliais), principalmente VCAM-1, ICAM-1 e selectina-E, estão abundantemente presentes nas placas ateroscleróticas (Kume

e col., 1992). Cybulsky e col. (2001) observaram pela primeira vez o aumento da expressão de VCAM-1 em animais hipercolesterolémicos, tanto devido à indução por dietas hipercolesterolémicas quanto pela deficiência do rLDL. A expressão de moléculas de adesão é induzida por citocinas (IL-1 e TNF- α), que são libertadas por células activadas, por lisofosfatidilcolina presente em LDL oxidadas e por produtos de lipólise. A acção da HDL sobre as moléculas de adesão, especialmente a VCAM-1, pode ser dependente da sua composição fosfolipídica, aspecto verificado em partículas reconstituídas após depleção de fosfolípidos (Cybulsky e col., 2001). Mesmo após a remoção das partículas de HDL das culturas celulares, o efeito inibitório permanece, excluindo então o efeito *per se* de moléculas antioxidantes presentes nestas partículas. Este fenómeno parece estar relacionado com a indução de factores de transcrição nuclear (como por exemplo o NF- κ B), visto que a HDL não inibe a translocação nuclear, a ligação com sequências específicas do ADN e a degradação ou síntese do NF- κ B.

Outro efeito anti-inflamatório das HDL é a inibição da produção da proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), tal como demonstrado em células endoteliais humanas, assim como células do músculo liso vascular da aorta de murganho (Mackness e col., 2004; Tolle e col., 2008).

Alguns estudos *in vivo* confirmam algumas destas observações *in vitro* (Cockerill e col., 2001). Nicholls e col. inseriram um anel não oclusivo em torno das artérias carótidas de coelhos para imitar a estenose da carótida e injectaram HDL reconstituídas (rHDL). O tratamento com rHDL resultou na inibição da produção de VCAM-1, ICAM-1 e de MCP-1, bem como na inibição da infiltração de leucócitos e a supressão da produção de espécies reactivas de oxigénio na parede da artéria (Nicholls e col., 2005).

Apesar de todas estas evidências, o papel das HDL na indução da supressão de moléculas de adesão para prevenir a aterosclerose e o seu efeito anti-inflamatório é ainda uma questão importante e em debate.

2.4.2.4 - Regulação da coagulação e fibrinólise e inibição da actividade plaquetária

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação entre a coagulação e fibrinólise e a doença arterial coronária (DAC) (Tracy, 2003). Um estudo sobre doença cardíaca no Northwick Park Hospital demonstrou que a acção pró-coagulante do fator VII, factor dependente de vitamina K, é um potente preditor da mortalidade por DAC (Oseroff

e col., 1989). Altos níveis do inibidor do factor activador do plasminogénio de tipo 1 (PAI-1) também estão associados ao aumento do risco de eventos cardiovasculares (Lesnik e col., 1993). Tais achados sugerem que o desequilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise pode conduzir à aterosclerose.

A activação dos factores da coagulação é seguida pela produção do complexo tenase extrínseco (complexo formado pelo factor tecidual, factor VIIa, fosfolípidos e iões cálcio) e pró-trombinase (complexo de factores de coagulação como Va, Xa, II, fosfolípidos e iões cálcio). Estas activações são moduladas pelas partículas de HDL. Ao contrário das lipoproteínas aterogénicas, como LDL e VLDL, as quais estimulam a secreção de TF (factor tecidual) e a activação do complexo tenase extrínseco, a HDL *per se* não estimula a secreção de TF a partir de células endoteliais e monócitos, sendo a síntese de TF estimulada pelas VLDL e inibida pelas HDL (Nofer e col., 1998). Estudos recentes demonstraram que a actividade inibitória das HDL sobre a activação destes factores deve-se à presença do inibidor da via do factor tecidual de coagulação (TFPI) presente nestas lipoproteínas (Nofer e col., 1998). Moyer e col. (1998) demonstraram que embora a trombina seja gerada na superfície das partículas da HDL, este processo é 20 vezes menos expressivo do que quando ela é gerada na superfície das partículas de lipoproteínas ricas em triglicédeos (TGs). Verificou-se também aumento da actividade da pró-trombinase em dislipidemias onde há maior concentração de lipoproteínas ricas em TGs e diminuição das HDL plasmáticas (Moyer e col., 1998).

A partícula de HDL também tem efeito anticoagulante através da estimulação da proteína C activada (APC), que tem um importante papel na inactivação proteolítica dos factores Va e VIIIa da coagulação. O aumento da actividade da APC é ainda maior devido à estimulação da proteína S pela HDL, ou seja, há um efeito anticoagulante sinérgico entre as proteínas C e S. Esta característica anticoagulante das HDL é devida à presença de anticoagulantes naturais, como cardiolipina e fosfatidiletanolamina. A HDL parece participar também do processo de fibrinólise, pois, embora a secreção do PAI-1 esteja aumentada (aumento da secreção pelas células endoteliais) tanto na hipercolesterolemia como na hipertrigliceridemia, a concentração da HDL plasmática é inversamente proporcional às concentrações de PAI-1 e do activador tecidual do plasminogénio (tPA). Esta associação pode reflectir o efeito *in vitro* inibitório da HDL na secreção dos factores PAI-1 e tPA pelo endotélio (Cuchel e Rader, 2002). A modulação do processo de

coagulação e de fibrinólise pela HDL é acompanhada pela inibição da secreção de citocinas (TNF- α e IL-1) que aumentam tanto a coagulação quanto a fibrinólise.

Os níveis baixos de c-HDL são um preditor independente da formação aguda de trombos dependente da activação plaquetária (Cuchel e Rader, 2002). Estudos *in vitro* demonstraram que, na presença ou na ausência de plasma rico em plaquetas ou apenas em plaquetas isoladas, a HDL inibe a ligação do fibrinogénio induzido por trombina na superfície plaquetária. A HDL inibe ainda a trombina e a formação de ADP por estimular a secreção de grânulos alfa e grânulos densos nas plaquetas (Neufeld e col., 2000). Em estudos utilizando inibidores da NO sintetase, obteve-se diminuição da capacidade inibitória da agregação plaquetária pelas HDL. Por outro lado, a presença de precursores de NO aumenta a capacidade inibitória das HDL sobre a activação plaquetária. A inibição da agregação plaquetária é devida, provavelmente, à indução da síntese de NO pela apoE presente nestas lipoproteínas (Riddell e col., 1999). Por outro lado, a maior parte dos estudos que avaliaram o fenómeno inibitório da activação plaquetária utilizaram partículas de HDL derivadas de doentes “deficientes” em apoE (Higashihara e col., 1991; Riddell e col., 1997).

2.4.2.5 – Melhoria da resistência à insulina

A capacidade citoprotectora das HDL não está limitada às células da parede arterial e parece representar um fenómeno fisiológico amplo. A HDL modula a sobrevivência das células β humanas e de murganho em ilhéus isolados, diminuindo a apoptose induzida pela hiperglicemia (Rütti e col., 2009). Este estudo mostrou que a NOS indutível (iNOS), que medeia os efeitos pró-apoptóticos da glicose e de citocinas é regulada pelas HDL.

Dados recentes sugerem que baixos níveis de c-HDL podem desempenhar um papel causal para o desenvolvimento da resistência à insulina (von Eckardstein e Sibling, 2011). Tem sido demonstrado que a HDL pode melhorar o metabolismo da glicose por múltiplos mecanismos, incluindo a secreção de insulina pelas células β como resultado da melhoria da homeostase do colesterol celular (von Eckardstein e Sibling, 2011; Getz e Reardon, 2010; Fryirs e col., 2010). Na verdade, infusões de partículas rHDL reduziram a glicose plasmática, aumentaram a secreção de insulina plasmática e melhoraram o modelo de índice de avaliação da homeostase (HOMA) em comparação com o placebo

(Drew e col., 2009). Com base neste estudo e em experiências de cultura de células (do músculo esquelético), estes autores sugeriram que as infusões de rHDL aumentaram o consumo de glicose do músculo esquelético através da activação da via de AMPK; este efeito envolve a ligação da ABCA1, a manutenção da homeostase do colesterol nas células pancreáticas β e a estimulação da secreção de insulina (Fryirs e col., 2010; Drew e col., 2009).

O efeito benéfico da HDL e da apoA-I no metabolismo da glicose e em estados de resistência à insulina não se limita às suas acções sobre as células β , às células do músculo esquelético e aos monócitos, podendo também implicar os adipócitos. Assim, tanto a sobre-expressão de apoA-I como o tratamento com D-4F, um peptídeo mimético da apoA-I, reduziram a massa de gordura branca, melhoraram a resistência à insulina e a diabetes em ratos que desenvolveram obesidade após uma alimentação com uma dieta rica em gordura (Ruan e col., 2011). A activação da proteína quinase (AMPK) pela adenosina 3',5'-monofosfato (AMP), induzida pela HDL no tecido adiposo, pode conduzir à inibição da lipólise e oxidação de ácidos gordos, como observado em diabéticos do tipo 2 injectados com rHDL (Drew e col., 2011).

2.5 – (Dis)funcionalidade das HDL

As sugestões epidemiológicas de que existe uma relação inversa entre os níveis plasmáticos de c-HDL e taxas de DCC têm sido mantidas como uma quase garantia de que as intervenções que aumentam o c-HDL irão reduzir o risco de doença coronária (Hulley e col., 1979; Keys, 1980). No entanto, os ensaios clínicos até agora realizados não conseguiram definir uma *guideline* para o aumento dos níveis de c-HDL por um dado grau específico ou para além de um limite particular de forma a ser evidente uma protecção contra eventos coronários (Ghali e Rodondi, 2009). Para além disso, tanto os estudos genéticos como os clínicos suportam a ideia de que, em algumas circunstâncias, os níveis de c-HDL podem comportar-se ao contrário do que está previsto pelo modelo de avaliação de *Framingham* (Fazio e Linton, 2009; Fazio e Linton, 2006). Por exemplo, os portadores da mutação apoA-I Milano apresentaram baixos níveis de c-HDL, apesar de serem resistentes à aterosclerose (Fazio e Linton, 2003; Franceschini e col., 1980), enquanto que os indivíduos com deficiência da proteína de transferência dos ésteres de

colesterol (CETP) têm níveis elevados de c-HDL, mas não estão claramente protegidos contra a aterosclerose (Agerholm-Larsen e col., 2000; Borggreve e col., 2007; Saito, 1998; Zhong e col., 1996). Adicionalmente, polimorfismos comuns da CETP e genes da lipase hepática associados a níveis elevados de c-HDL estão relacionados com o aumento de eventos cardiovasculares (Borggreve e col., 2006; Johannsen e col., 2009).

Estes resultados aparentemente contraditórios podem ser explicados pela noção de que um HDL "funcional", em vez de uma elevada concentração de c-HDL, é necessário para obter um efeito terapêutico. A funcionalidade e as concentrações das HDL provavelmente andam de mãos dadas na maioria das pessoas, mas podem divergir na presença de mutações específicas, em alguns estados de doença, ou pela acção de alguns fármacos (deGoma e col., 2008; Rye e col., 2009; Sviridov e col., 2008). Portanto, são necessárias novas terapêuticas direccionadas para a funcionalidade das HDL, em vez de apenas para as concentrações absolutas de c-HDL no sangue.

As mutações que afectam a função de uma enzima raramente estão ligadas a uma melhoria do metabolismo ou da saúde. Polimorfismos simultâneos dos genes da CETP, que levam a níveis elevados de c-HDL devido à diminuída troca de colesterol, e do gene da lipase hepática, levando a níveis elevados de c-HDL, através da lipólise diminuída, têm sido associados ao aumento do risco de DCC (Borggreve e col., 2006; Johannsen e col., 2009). De facto, um HDL disfuncional está mais associado a níveis elevados, em vez de níveis baixos de c-HDL, que pode ser consequência de uma alteração na reciclagem das partículas maduras de HDL no plasma. Devido à sua elevada concentração, possuir um HDL disfuncional pode ser mais perigoso para a saúde vascular do que ter níveis baixos de HDL funcional. Ansell e col. (2003) mostraram que os pacientes com doença coronária e c-HDL superior a 85 mg/dL apresentavam um HDL disfuncional. Análises recentes do *The Incremental Decrease in Endpoints through Aggressive Lipid Lowering trial (IDEAL)* e do *European Prospective Investigation of Cancer-Norfolk observational study* determinaram que a correlação inversa clássica entre o c-HDL e o risco de DCC não é sustentada quando se avaliam indivíduos com valores de c-HDL superiores a 70 mg/dL, que parecem ter risco aumentado de DCC, mesmo já sob terapêutica com estatinas (van der Steeg e col., 2008). Assim, torna-se claro que uma HDL funcional seja um alvo mais desejável do que simplesmente aumentar os níveis de c-HDL.

Uma questão se poderá colocar: porque é que o c-HDL falha na sua missão? O que é o HDL disfuncional? O conceito de disfunção das HDL foi originalmente desenvolvido por cientistas em meados da década de 90 (Smith, 2010), que propuseram que em algumas pessoas o c-HDL era disfuncional, ou mal formado, e incapaz de fazer o seu trabalho correctamente. As partículas de HDL têm várias funções relacionadas com o transporte de colesterol e proteínas. Quando as partículas de HDL executam as tarefas biológicas correctamente, então são denominadas de "funcionais"; contrariamente, se não o fizerem são chamadas de "disfuncionais" (Smith, 2010).

Poucos estudos estão disponíveis em populações humanas que investigam o envolvimento da inflamação vascular e do stresse oxidativo relacionados com a transformação disfuncional das HDL no estabelecimento de DCV. Quase metade das pessoas que sofrem de ataques cardíacos têm níveis de colesterol normais. Aparentemente, nem todo o c-HDL, muitas vezes referido como "bom colesterol", protege contra a acumulação de placas nas paredes das artérias (Kontush e Chapman, 2012).

As propriedades ateroprotectoras potentes das partículas de HDL são consequência da sua composição e estrutura únicas. No entanto, as HDL podem perder a sua função normal e adquirir funções patológicas. O c-HDL disfuncional não é comum, além de que estudos populacionais mostram que pessoas com c-HDL alto geralmente têm menor risco de doença cardíaca; por outro lado, algumas pessoas que têm níveis elevados de c-HDL sofrem ataques cardíacos e sofrem de outras doenças cardiovasculares (Sharma e col., 2009).

Há muitas alterações possíveis entre HDL disfuncional e HDL funcional normal. Uma possibilidade é uma mudança na composição das proteínas das HDL. As HDL dos humanos são bastante heterogéneas, englobando uma variedade de tamanhos e densidades (Kontush e Chapman, 2012). A associação estreita entre a inflamação, o stresse oxidativo, dislipidemia, e aterosclerose sugere que algumas alterações das HDL desempenham um papel importante na progressão da doença. Como resultado, as partículas de HDL perdem progressivamente actividades biológicas normais e adquirem propriedades alteradas (Sharma e col., 2009). No entanto, quando a função antioxidante e anti-inflamatória das HDL estão sobrecarregadas com processos patológicos, tais como a inflamação, a HDL é convertida numa partícula "disfuncional" pró-inflamatória. No que

respeita à aterosclerose, se um nível de HDL não executa funções anti-aterogénicas é chamado de HDL "pró-aterogénico" (G e col., 2011).

O c-HDL é conhecido por sofrer alterações dramáticas na estrutura e composição como um resultado das acções concertadas de resposta de fase aguda e inflamação. Este "disfuncional" (HDL-D) é caracterizado por níveis e actividades diminuídas de factores anti-inflamatórios e antioxidantes, tais como apoA-I e PON1 (Kontush e Chapman, 2006). O HDL disfuncional contém fosfolípidos oxidados e lisofosfolípidos, bem como proteínas pró-inflamatórias, tais como a SAA (amilóide sérico A) e a ceruloplasmina. Eventualmente, funcionalmente, não pode promover o efluxo de colesterol ou prevenir eficazmente a oxidação do c-LDL (Podrez, 2010).

Evidências que ligam a protecção contra doenças cardiovasculares com as subpopulações de HDL continuam controversas. A discordância nestes dados reflecte, em parte, relações complexas que existem entre as subfracções de HDL separadas por diferentes métodos. Assim, os níveis de HDL₂ estão inversamente associados com o risco de doença cardíaca coronária no *Kuopio Study* (Salonen e col., 1991) e no *Quebec City Suburbs Study* (Lamarche e col., 1997). Adicionalmente, os níveis plasmáticos de HDL₃ são um preditor forte e independente de protecção contra a aterosclerose no *Physician's Health Study* (Stampfer e col., 1991), nos cinco anos de acompanhamento dos grupos de estudo *Caerphilly* e *Speedwell* (Sweetnam e col., 1994), e nos 9 anos de acompanhamento do *Caerphilly Study* (Yu e col., 2003). Finalmente, tanto as HDL₂ como as HDL₃ foram relacionadas com o risco cardiovascular num estudo prospectivo, *Gofman's Livermore Cohort*, de 29,1 anos de acompanhamento de 1905 homens onde foram medidas as concentrações em massa das lipoproteínas por análise de ultracentrifugação, entre os anos de 1954 e 1957 (Williamns e Feldman, 2011).

O perfil mais consistente surge quando a heterogeneidade das partículas de HDL é avaliada por electroforese em gel. Assim, os níveis plasmáticos de HDL α -1 grandes são constantemente associados à protecção da aterosclerose (Asztalos e col., 2003a; Asztalos e Schaefer, 2003; Schaefer e Asztalos, 2007). Em paralelo, as concentrações de partículas pequenas de HDL discoidais (a soma da apoA-I pré- β 1 HDL e α 4 HDL > 25mg/dl) são muitas vezes elevadas em doentes com doença cardíaca coronária, enquanto partículas α 2 grandes de HDL estão diminuídas (Asztalos e Schaefer, 2003; Lamon-Fava e col., 2008).

Quando as partículas de HDL são separadas por cromatografia de afinidade, os níveis plasmáticos de LpA-I são muitas vezes (Parra e col., 1992, Asztalos e col., 2005), mas não sempre (Asztalos e col., 2005; Montali e col., 1994), associados à protecção da aterosclerose. A significância clínica da LpA-I/A-II mantém-se mais controversa (Parra e col., 1992, Asztalos e col., 2005; Asztalos e col., 2005). Finalmente, quando as concentrações das subfracções de HDL são avaliadas por RMN, os níveis das HDL grandes geralmente exibem uma correlação negativa com o risco cardiovascular em análises univariadas, enquanto que as concentrações das partículas de HDL pequenas mostram correlações positivas (Mora e col., 2007, Festa e col., 2005; Rosenson e col., 2002). A relevância clínica dos níveis das subpopulações de partículas individuais de HDL em circulação na aterosclerose e na doença cardiovascular, desta forma, permanece por esclarecer. No geral, pode-se concluir que as evidências que ligam a protecção contra a DCC com as subpopulações específicas de HDL em humanos são ainda pouco consistentes, exigindo a realização de mais estudos. Em suma, não está ainda perfeitamente esclarecido se os efeitos cardioprotectores das HDL são influenciados pela sua composição apolipoproteica, tamanho, densidade, mobilidade electroforética, ou por uma combinação de todas estas propriedades.

2.6 – Elevação das HDL por alterações do estilo de vida

O *National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III)* em 2002 reviu a definição de níveis baixos de colesterol HDL de 35 mg/dL para 40 mg/dL (NCEP ATP III, 2002). Um baixo c-HDL é também um componente importante para a definição da síndrome metabólica, com pontos de corte de 40 mg/dL para homens e 50 mg/dL para mulheres. As directrizes do NCEP ATP III afirmam que mudanças no estilo de vida são a intervenção inicial para aumentar o colesterol HDL.

Estas alterações são eficazes para a prevenção primária e secundária da doença cardiovascular e são recomendadas em directrizes para a prática clínica (Perk e col., 2012; Ton e col., 2013). Modificações de estilo de vida, incluindo exercício físico, parar de fumar, perda de peso, consumo moderado de álcool e ingestão de gordura poliinsaturada, podem aumentar o nível de c-HDL em cerca de 5-10% (Kontush e col., 2012; Singh e col., 2007). No entanto, o consumo de álcool aumenta o nível de TGs

(Pownall e col., 1999), e dietas ricas em gorduras saturadas também aumentam o nível de c-LDL (Asztalos e col., 2000; Knopp e col., 1997). A actividade física (exercício físico regular) diminui o nível de TGs e reduz muitos dos factores de risco de DAC, incluindo a obesidade, hipertensão arterial (HTA) e DMT2, bem como o risco para DAC (Shiroma e Lee, 2010). A actividade física regular e exercícios aeróbios estão relacionados com uma redução do risco de eventos coronários fatais e não-fatais em indivíduos saudáveis, indivíduos com factores de risco coronários e pacientes cardíacos numa ampla faixa etária (Perk e col., 2012), e, portanto, este subcapítulo focar-se-à mais sobre os efeitos do exercício na elevação das HDL.

2.6.1 – Efeitos ateroprotectores do aumento do c-HDL pelo exercício físico

O exercício físico tem consistentemente mostrado aumentar os níveis de c-HDL, especialmente os níveis das HDL₂, em indivíduos normais, com excesso de peso, hipercolesterolemia, doentes com DMT2 e doentes com DAC (Durstine e col., 2001; Tseng e col., 2013; Hayashino e col., 2012; Kodama e col., 2007; Kelley e col., 2006; Leon e col., 2001; Thompson e col., 1988; Crouse e col., 1997; Kraus e col., 2002; Durstine e col., 2002; Kelley e Kelley, 2006; Thompson e col., 1997).

O exercício físico aumenta o nível de c-HDL em cerca de 2,53 mg/dl (Kodama e col., 2007), associado a uma diminuição do risco cardiovascular de cerca de 7%, de acordo com dados epidemiológicos sobre a relação entre os níveis de c-HDL e o risco de DAC (Kontush e Chapman, 2012). No entanto, a actividade física está associada com uma ainda maior redução do risco de desenvolvimento de DAC (30-35%) (Shiroma e Lee, 2010). Na verdade, o exercício moderado tem demonstrado um aumento na função das HDL (capacidade antioxidante), mesmo sem alterações significativas nos níveis de c-HDL em doentes com síndrome metabólica (Casella-Filho e col., 2011). Adicionalmente ao seu efeito de aumento do c-HDL, um exercício regular tem também mostrado ter muitos outros efeitos ateroprotectores, incluindo a preservação da função endotelial, e efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Szostak e Laurant, 2011; Joyner e Green, 2009; Gleeson e col., 2011). O mecanismo dos efeitos anti-inflamatórios do exercício envolve a redução da massa de gordura visceral, aumento da produção e libertação de citocinas inflamatórias pela contracção muscular, e redução da expressão de receptores *toll-like*

em monócitos e macrófagos (Gleeson e col., 2011). O músculo esquelético foi recentemente identificado como um órgão endócrino que produz, expressa, e liberta citocinas e outros peptídeos, que são chamadas quimioquinas (Pedersen e Febbraio, 2012; Brandt e Pedersen, 2010; Pedersen e Febbraio, 2008). As quimioquinas parecem estar envolvidas na mediação induzida pelo exercício de efeitos anti-inflamatórios, imunorreguladores e metabólicos (Pedersen e Febbraio, 2012; Brandt e Pedersen, 2010; Pedersen e Febbraio, 2008; Nielsen e Pedersen, 2008).

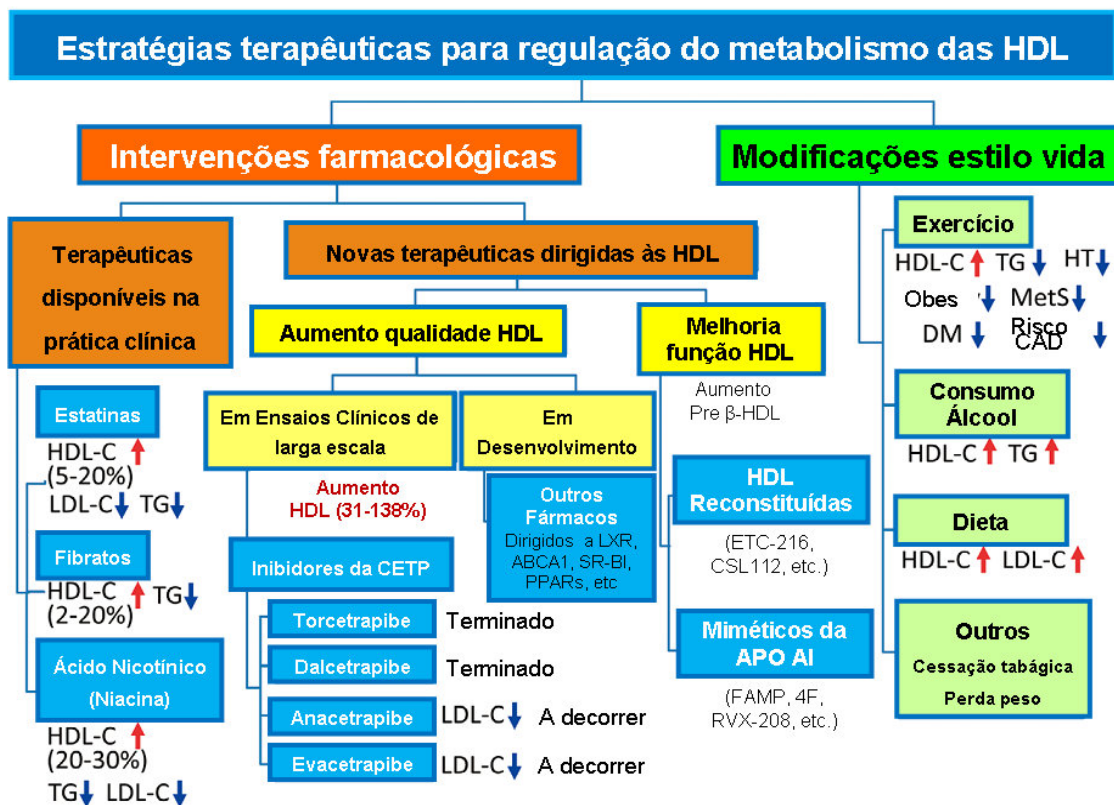


Figura 2.6 – Abordagens terapêuticas para a regulação do metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL) incluem intervenções farmacológicas e modificações de estilo de vida. As estatinas, fibratos e ácido nicotínico (niacina) estão disponíveis na prática clínica diária e aumentam moderadamente o nível de colesterol HDL (c-HDL). As novas terapêuticas dirigidas ao HDL incluem aquelas que aumentam a quantidade de HDL e as que aumentam a sua função. Inibidores da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), torcetapibe, dalcetrapibe, anacetrapibe e evacetrapibe, entraram em ensaios clínicos de grande escala e aumentaram substancialmente o nível de c-HDL (31-138%), mas 2 dos ensaios foram encerrados pelo seu fracasso ou devido a resultados insuficientes. As HDL reconstituídas e os peptídeos miméticos da apoA-I também são novas terapêuticas dirigidas ao c-HDL que melhoram a função do HDL. Entre as modificações de estilo de vida, o exercício físico, o consumo moderado de álcool, ingestão de gordura, e a cessação do tabagismo todas podem aumentar o nível de c-HDL. No entanto, o consumo de álcool também aumenta os triglicerídeos (TGs) e o nível de ingestão de gordura aumenta o nível de colesterol da lipoproteína baixa densidade (c-LDL). O exercício físico regular diminui os níveis de TGs e reduz tanto os factores de risco associados à doença arterial coronária (DAC), incluindo a obesidade, hipertensão arterial (HTA), diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e a síndrome metabólica (SM) como o risco de DAC. Adaptado de Zhang e col., 2013.

2.7 - Intervenções farmacológicas na modulação das HDL

As *guidelines* para o controlo lipídico ainda estão centradas na diminuição dos níveis de c-LDL, utilizando sobretudo as estatinas, que inibem a HMG-CoA redutase (uma enzima chave na biossíntese do colesterol), como o principal alvo para a redução do risco de DCC. No entanto, apesar da utilização generalizada e agressiva de estatinas para a diminuição do c-LDL esta resulta apenas em valores entre 30% a 40% na redução de eventos clínicos e o alto risco cardiovascular residual (aproximadamente 60-70%), continua a persistir (Baigent e col., 2005; Fruchart e col., 2008; Alagona, 2009; Judge e col., 2010). Portanto, para reduzir ainda mais os eventos cardiovasculares ateroscleróticos, maior atenção está actualmente direccionada nas HDL como um alvo potencial para o manuseamento da aterosclerose.

2.7.1 – Principais terapêuticas farmacológicas actualmente disponíveis

2.7.1.1 - Estatinas

As estatinas são antagonistas competitivos da HMG-CoA redutase, a enzima que catalisa a conversão de HMG-CoA em mevalonato, um passo inicial e limitante da biossíntese de colesterol. Ao competirem directamente com o substracto endógeno para o local activo da enzima, as estatinas efectivamente reduzem os níveis de colesterol sérico. Para além disso, reduzem os níveis séricos de colesterol por estimulação hepática mediada pelo receptor de depuração do c-LDL (rLDL).

O principal efeito da estatina é diminuir eficazmente os níveis plasmáticos de lipoproteínas contendo apoB, principalmente LDL (20-60%), mas também as IDL, VLDL e quilomicra. A diminuição dos níveis de colesterol intracelulares conduz à activação de factores de transcrição SREBP, que activam a transcrição de um certo número de genes envolvidos na depuração das partículas de LDL do plasma, tais como o rLDL (Brown e Goldstein, 1997). As estatinas também diminuem os TGs plasmáticos devido a uma diminuição da produção de VLDL, provavelmente como consequência da menor disponibilidade de colesterol para a produção de VLDL e de quilomicra (Vega e Grundy, 1998; Breuer, 2001). Adicionalmente, podem diminuir os TGs devido a uma forte indução da *clearance*, mediada pelo receptor, das partículas remanescentes.

As estatinas aumentam, de forma modesta, os níveis de c-HDL (de 3% a 15%) (Yamashita e col., 2010; Chong e col., 2002; McTaggart e Jones, 2008; Barter e col., 2010). As diferentes estatinas não são idênticas na sua potência para aumentar o c-HDL, sendo a rosuvastatina e a pitavastatina as moléculas mais potentes (Yamashita e col., 2010). Outros estudos mostraram também que a rosuvastatina entre 10 e 40 mg foi mais eficaz em melhorar o perfil lipídico dos pacientes com hipercolesterolemia que as doses equivalentes de atorvastatina e doses equivalentes ou superiores de sinvastatina e pravastatina e que a sinvastatina aumenta o c-HDL e a apoA-I mais do que a atorvastatina, em doses mais elevadas, evidenciando um efeito negativo sobre o c-HDL e a apoA-I na resposta à dose com atorvastatina, mas não com a sinvastatina (Davidson e col., 2003; Jones e col., 2004).

Tem sido difícil dissociar clinicamente os benefícios do aumento do c-HDL e da redução do c-LDL desde que os estudos foram concebidos para atingir o c-LDL, o principal mecanismo de acção das estatinas. No entanto, os efeitos das estatinas sobre os níveis de c-HDL podem ser atribuídos, em parte, à inibição das vias de sinalização da proteína Rho com a activação do PPAR α e consequente estimulação da produção de apoA-I (McTaggart e Jones, 2008; Martin e col., 2001). As estatinas também reduziram os níveis da CETP em circulação e também, de forma importante, a taxa de transferência de EC mediada por CETP das HDL para as VLDL, secundária à redução das últimas (Le Goff e col., 2004; Guerin e col., 2000). As estatinas, no entanto, não são conhecidas por serem inibidores directos da CETP.

É importante perceber que as estatinas exercem vários efeitos pleiotrópicos, como inibirem a prenilação de proteínas, tais como a Ras e a Rho, que activam a cascata da MAPK ou a via do NF- κ B, que incluem efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e anti-trombóticos (Liao e Laufs, 2005). Para além disso, as estatinas parecem melhorar as acções antioxidantes do c-HDL, aumentando a actividade de enzimas associadas às HDL, como demonstrado pela PON1. O aumento da actividade da PON1 foi clinicamente confirmado com a administração de fluvastatina (Christidis e col., 2007), sinvastatina (Tomás e col., 2000; Deakin e col., 2003), atorvastatina (Nagila e col., 2009; Harangi e col., 2009) e rosuvastatina (Bergheanu e col., 2007). O efeito das estatinas sobre a actividade da PON1 parece ser independente da elevação do c-HDL.

As estatinas são geralmente bem toleradas, os efeitos adversos mais comuns envolvem problemas musculares tais como miopatia e/ou miosite com potencial para rabdomiólise, aumento das enzimas hepáticas (alanina transaminase ALT e aspartato transaminase AST), efeitos no sistema nervoso central, bem como o aparecimento de diabetes (Golomb e Evans, 2008).

2.7.1.2 - Fibratos

Os fibratos são agentes eficazes para o tratamento da dislipidemia, em particular quando direccionados para elevadas concentrações de lipoproteínas ricas em TGs e baixos níveis de c-HDL tipicamente associados a diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (Chapman, 2003).

Os fibratos são agonistas de afinidade moderada para os PPAR α que exercem múltiplos efeitos sobre o metabolismo lipídico e metabolismo dos ácidos gordos (Willson e col., 2000). Os fibratos ligam-se aos PPAR α expressos nos hepatócitos, células endoteliais e do músculo liso, monócitos, macrófagos e no coração, e heterodimerizam-se com o RXR (receptor retinóide X). O heterodímero PPAR α /RXR liga-se a elementos de resposta proliferadores do peroxissoma nas regiões promotoras de genes específicos, activam a expressão desses genes, aumentando deste modo a expressão da proteína (Staels e col., 1998). A activação do PPAR α por fibratos medeia diversos efeitos, tais como a modulação do metabolismo de lipoproteínas, a coagulação, a hemostasia e a atenuação da inflamação (Chapman, 2006).

O efeito primário dos fibratos nas lipoproteínas plasmáticas envolve uma redução de 30-50% na concentração sérica de TGs e um aumento do nível de c-HDL em 5-15% (Chapman, 2003; Birjmohun e col., 2005). Os fibratos podem também reduzir o c-LDL potencialmente em cerca de 15-20% (Chapman, 2003; Steiner, 2005); estes efeitos são variáveis dependendo do fibrato em causa e do perfil lipídico de base. Os fibratos diminuem os níveis circulantes de TGs aumentando o catabolismo das VLDL (e quilomicra) através da indução da expressão de LPL e apoA-V. Ao mesmo tempo, a acção da LPL é potenciada devido à atenuação da expressão hepática da apoC-III, um inibidor bem conhecido da LPL. Para além disso, eles estimulam a captação celular de ácidos gordos e a transformação para derivados da acil-CoA, aumentando a β -oxidação peroxissomal e

mitocondrial, conduzindo assim a uma síntese atenuada de ácidos gordos e TGs que resulta numa diminuição na produção de VLDL (Staels e col., 1998).

Os fibratos aumentam as HDL, independentemente da redução directa dos TGs por supra-regulação da transcrição dos genes APOA1 e APOA2, conduzindo a um aumento da síntese de apoA-I e apoA-II, aumentando assim a formação de novas partículas de HDL (Shah e col., 2010). Outro aspecto principal da acção dos fibratos sobre o metabolismo das HDL envolve a expressão aumentada da ABCA1, um regulador importante da biogénese das HDL nos hepatócitos, e conhecido por ser sobre-regulado pelo receptor do factor de transcrição X do fígado (LXR), especialmente o LXR α , cuja expressão está ainda reforçada pela activação dos PPARs (Hossain e col., 2008). Estudos em hepatócitos primários de ratos mostraram uma sub-regulação dos níveis de proteína SR-BI hepática em tratamentos com fibratos (Mardones e col., 2003). A sub-regulação deste receptor no fígado leva a uma diminuição da depuração de HDL e poderia promover outro mecanismo pelo qual os fibratos podem aumentar os níveis de HDL no plasma.

Curiosamente a acção inibitória indirecta de agonistas PPAR α na actividade plasmática da CETP como resultado da redução dos níveis de TGs, pode ser em parte contrabalançada pelo aumento da expressão da CETP, como mostrou pelo efeito do fenofibrato no aumento do ARNm, da proteína e da actividade da CETP num modelo animal transgénico de CETP humano (Beyer e col., 2008). De acordo com este resultado, o fenofibrato aumenta os níveis circulantes de CETP em humanos dislipidémicos (Franceschini e col., 2007). Para além disso, os fibratos aumentam a concentração e a actividade da PON1 (Phuntuwate e col., 2008) e estão envolvidos na redistribuição de PAF-AH, a partir de lipoproteínas contendo apoB, para as HDL em pacientes com dislipidemia, diminuindo assim o potencial pró-inflamatório da enzima (Tsimihodimos e col., 2003; Saougos e col., 2007).

Apesar destas acções anti-aterogénicas significativas, os ensaios clínicos de redução do risco cardiovascular por fibratos têm fornecido resultados mistos, alguns revelando efeitos benéficos (ensaios HHS, VA-HIT e WHO) (Barter e Rye, 2008), enquanto outros, efeitos mais discutíveis (ensaios BIP e FIELD) (Barter e Rye, 2008; Keech e col., 2005).

Os agonistas PPAR α podem também atenuar a produção de estimulantes pró-inflamatórios, tais como o TNF- α , o interferão-gama (IFN- γ), a IL-6 e a IL-1, bem como

proteínas de fase aguda, incluindo o fibrinogénio e a PCR (Zambon e col., 2006). A activação do PPAR α diminui a expressão de moléculas de adesão ao endotélio, devido à redução da expressão de VCAM-1 induzida por citocinas, conduzindo a uma diminuição do recrutamento de leucócitos para a parede arterial (Marx e col., 1999). Para além disso, os activadores do PPAR α inibem a produção da endotelina-1 induzida pela trombina e, conseqüentemente, diminuem a proliferação de células musculares lisas (Delerive e col., 1999).

Em geral, a terapêutica com fibratos é bem tolerada, mas pode induzir hiperhomocisteinemia, com concomitante aumento dos níveis de creatinina, um marcador da disfunção renal (Dierkes e col., 2007; Davidson e col., 2007). A associação de alguns fibratos com estatinas pode produzir um aumento no risco de miopatia e de rabdomiólise, por interferir com a glucoronidação das estatinas, que poderia levar à elevação das concentrações plasmáticas das estatinas (Davidson, 2006; Jacobson, 2009; Kota e col., 2012).

2.7.1.3 - Ácido nicotínico (ou niacina)

O ácido nicotínico (ou niacina), uma vitamina do complexo B3, tem sido utilizado desde 1995, como um agente farmacológico para regular alterações no metabolismo de lípidos e lipoproteínas do plasma (Altschul e Hoffer, 1955). É actualmente o agente comercialmente disponível mais eficaz na regulação de lípidos no que respeita ao aumento dos níveis de c-HDL, podendo chegar a 35% na dose 2g/dia. Tem também um impacto significativo na redução de TGs (20-40%), c-LDL (15-30%) e da lipoproteína(a) [Lp(a)] (cerca de 15-35%) (Carlson e col., 1989; Tavintharan e Kashyap, 2001; Bodor e Offermanns, 2008).

A acção primária da niacina é a de suprimir temporariamente a lipólise dos TGs no tecido adiposo (Ganji e col., 2003; Karpe e Frayn, 2004). O ácido nicotínico inibe a AC mediada por GPR109A, suprimindo os efeitos pró-lipolíticos de elevados níveis intracelulares de AMPc e a estimulação da proteína quinase A (PKA), que fosforila várias proteínas, principalmente a lipase hormono-sensível (HSL), que são necessárias para a hidrólise dos TGs no tecido adiposo (Bodor e Offermanns, 2008).

Uma outra lipase importante neste processo é a lipase adiposa de triglicerídeos (ATGL), que hidrolisa os TGs em AGL e glicerol. Assim, a acção do ácido nicotínico anti-

lipolítica é provavelmente mediada por activação do receptor do ácido nicotínico Gi-acoplado, impedindo a sinalização da cascata AMPc/PKA diminuindo assim a lipólise e a subsequente libertação de ácidos gordos livres (AGL) para a circulação. O fluxo de AGL para o fígado constitui o principal substrato para a síntese hepática de TGs; estes TGs podem ser integrados nas partículas nascentes de VLDL e libertados na circulação, ou, alternativamente, podem ser armazenados sob a forma de gotículas de gordura intracelulares no hepatócito. Além disso, a niacina inibe a diacilglicerol aciltransferase 2, uma enzima chave na síntese dos TGs em hepatócitos humanos (Ganji e col., 2004). A inibição da síntese de TGs pela niacina resulta potencialmente numa acelerada degradação hepática intracelular da apoB e subsequente diminuição da secreção de partículas de VLDL/LDL.

O mecanismo responsável pelo aumento dos níveis de c-HDL mediado pelo ácido nicotínico é pouco claro. Muito provavelmente, a diminuição de TGs nas lipoproteínas que contêm apoB (LDL/VLDL) resulta numa diminuição da troca entre EC transportados por partículas de HDL e TGs das partículas de VLDL e LDL através da via da CETP, resultando num aumento das concentrações plasmáticas de c-HDL. Em paralelo, a niacina pode também promover a produção hepática de apoA-I e a depuração hepática mais lenta da apoA-I (Gille e col., 2008; Lamon-Fava e col., 2008; Haas e col., 2011).

Para além disso, um outro mecanismo potencial para a niacina aumentar o c-HDL envolve a indução do efluxo de colesterol via ABCA1 e ABCG1 a partir de células periféricas para os receptores de HDL. Na verdade, a niacina aumenta a transcrição de transportadores ABC pela via dependente de PPAR γ nuclear (Rubic e col., 2004) e pode promover o efluxo do colesterol a partir dos adipócitos para a apoA-I via ABCA1 mediada por um mecanismo dependente de LXR α (Wu e Zhao, 2009).

Há interesse emergente em vários efeitos não lipídicos potencialmente benéficos mediados pela niacina, por exemplo, efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, anti-trombóticos e citoprotectores. A niacina mostrou inibir: (a) a produção de espécies reactivas de oxigénio induzidas pela angiotensina II; (b) a oxidação das LDL; (c) a resposta inflamatória induzida pelo TNF- α numa cultura de células endoteliais humanas, os níveis de VCAM-1, a secreção de MCP-1, e (d) a adesão de monócitos induzida pelo TNF- α a células aórticas endoteliais humanas (Ganji e col., 2009; Tavintharan e col., 2009; Digby e col., 2012).

Para além disso, a niacina também diminui os níveis de PCR (Kuvin e col., 2006), melhora a disfunção endotelial (Sorrentino e col., 2010; Warnholtz e col., 2009), melhora o endotélio e o estado redox dos leucócitos *in vitro*, que protegem contra a disfunção endotelial induzida por espécies reactivas (Ganji e col., 2009; Wu e col., 2010), aumenta a estabilidade da placa e reduz a trombose (Rosenson, 2003).

A niacina aumenta a adiponectina, uma adipocitoquina com propriedades anti-aterogénicas e anti-inflamatórias (Westphal e col., 2007; Plaisance e col., 2009; Digby e col., 2010). Recentemente, foi relatado que a niacina inibe a inflamação vascular através de mecanismos independentes dos seus efeitos modificadores de lípidos (Wu e col., 2010; Digby e col., 2010). Por conseguinte, juntamente ao seu papel de modulação lipídica estas qualidades ateroprotectoras parecem contribuir para os resultados cardiovasculares melhorados em pacientes tratados com a niacina.

O potencial terapêutico da niacina tem sido limitado pelos seus efeitos adversos, nomeadamente os fenómenos de rubor cutâneo, que ocorrem em cerca de 70-80% dos doentes. A niacina também tem sido criticada pela desregulação do controlo da glicemia (Garg e Grundy, 1990; Poynten e col., 2003), elevação das enzimas hepáticas (Lawrence, 1993) e dos níveis séricos de ácido úrico (Elam e col., 2000).

Apesar de alguns ensaios com niacina de libertação prolongada terem sido decepcionantes (AIM-HIGH e HPS-THRIVE), questionando a sua eficácia sobretudo ao nível do impacto em termos de mortalidade CV, uma recente meta-análise de 11 ensaios clínicos (incluindo o AIM-HIGH), com 9959 indivíduos, mostrou que a terapêutica com niacina foi associada com uma redução significativa nos maiores eventos relacionados com a DCV e com a doença cardíaca coronária (Lavigne e col., 2013), o que pode, em parte, “resgatar” a reputação da niacina como uma terapêutica preventiva eficaz.

2.7.2 - Novas terapêuticas dirigidas para as HDL

A magnitude das elevações do c-HDL obtidas por alterações do estilo de vida ou qualquer uma das opções farmacológicas actualmente disponíveis é pequena relativamente às reduções de c-LDL alcançadas pelas estatinas, razão pela qual persiste um risco cardiovascular residual (60-70%). Portanto, o desenvolvimento e teste de novas terapêuticas que exploram os efeitos protectores vasculares das HDL constitui uma

abordagem racional e complementar. Nos últimos anos, uma série de terapêuticas promissoras baseadas na modulação das HDL têm sido desenvolvidas e testadas, encontrando-se algumas delas em fases avançadas de ensaios clínicos. Dentro dessas novas estratégias terapêuticas em estudo, algumas visam aumentar as concentrações de HDL enquanto outras pretendem melhorar a sua funcionalidade (qualidade).

2.7.2.1 - Novas terapêuticas direccionadas para o aumento da quantidade das HDL

a) Agonistas do receptor X do fígado (LXR)

Existem duas isoformas dos LXR: LXR β , expressa ubiquitadamente, e LXR α distribuídas de uma forma específica no organismo, mas principalmente no fígado e nos tecidos envolvidos no metabolismo dos lípidos. Os LXRs são activados por formas específicas oxidadas do colesterol (oxisteróis), tais como 24(S)-hidroxicolesterol e por certos intermediários da biossíntese do colesterol. Considerados como sensores intracelulares, podem activar a transcrição de muitos genes envolvidos no TRC, como ABCA1, ABCG1 e CETP, e, ao mesmo tempo, diminuir a expressão dos genes envolvidos na absorção intestinal de colesterol, tais como Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). A análise de ratinhos deficientes em LXR revelou um amplo papel deste receptor na regulação de genes envolvidos na homeostase de lípidos (Ricote e col., 2004). Por exemplo, em ratinhos os agonistas LXR reduziram a absorção de colesterol no intestino, devido a uma sobre-regulação de ABCG5 e ABCG8, que aumentam o efluxo de colesterol, limitando assim a sua absorção pelas células intestinais (Yu e col., 2003). O mais interessante, a ABCA1, um transportador chave no efluxo de colesterol e fosfolípidos de macrófagos, é um alvo directo dos LXR (Venkateswaran e col., 2000). De facto, o tratamento com agonistas de LXR endógenos é capaz de aumentar o TRC de macrófagos e células espumosas e, assim, aumentar a excreção biliar do colesterol (Naik e col., 2006). Ao mesmo tempo, os agonistas LXR sintéticos são capazes de impedir a formação de placas de ateroma em ratos (Peng e col., 2011). No entanto, os LXR α promovem a expressão de genes lipogénicos no fígado, o que aumenta os níveis de triglicéridos e a esteatose hepática (Cha e Repa, 2007). Isto enfatiza a necessidade de sintetizar agonistas específicos LXR, o que actualmente é difícil de alcançar devido a uma alta homologia entre as duas isoformas (sequência com 80% de homologia). Além disso, um efeito

positivo sobre a transcrição de CETP também foi observado, o que pode conferir menos efeitos benéficos em humanos do que os observados em espécies desprovidas de CETP, tais como ratos. Por esta razão, a investigação sobre os ligandos LXR selectivos é um campo activo na farmacologia experimental.

b) Inibidores dos receptores scavenger B-I (SR-BI)

Com o objectivo de aumentar a concentração de c-HDL, a comunidade científica continua a tentar descobrir novos fármacos que tenham como objectivo o *uptake* das HDL e o seu catabolismo pelo fígado. O SR-BI é um receptor que modula a captação hepática dos ésteres de colesterol, HDL, VLDL e LDL nativas. A este respeito, Masson et al testaram um novo inibidor SR-BI - ITX5061 - em ratos e seres humanos (Masson e col., 2009). O uso do ITX5061 em doentes com hipertrigliceridemia conduziu a um aumento na concentração de c-HDL de aproximadamente 20%, sem modificar as concentrações de triglicérides ou de c-LDL. Além disso, o ITX5061 foi responsável por uma redução nas lesões ateroscleróticas precoces no arco aórtico em ratos alimentados com uma dieta aterogénica.

Murganhos sem SR-BI têm níveis aumentados de LDL e são propensos à aterosclerose (Braun e col., 2002). Contudo, em seres humanos o bloqueio do SR-BI por ITX5061, uma molécula caracterizada inicialmente como uma inibidora da p38 proteína quinase activada por mitogénio (MAPK), aumenta o c-HDL, embora este efeito pareça ser muito transiente (Masson e col., 2009). No entanto, o efeito benéfico da inibição do SR-BI, que participa na absorção hepática de c-HDL e no efluxo de colesterol celular, é questionável, pois isso iria prejudicar bastante o TRC.

c) Agonistas dos receptores activados pelo proliferador de peroxissoma (agonistas PPAR- α , - γ e - δ)

Os receptores activados pelo proliferador de peroxissoma (PPARs) são receptores nucleares de transcrição envolvidos na homeostase de lipídios e hidratos de carbono; são compostos por três isoformas (- α , - γ e - δ). Após a ativação, os PPARs heterodimerizam-se com o receptor do retinóide X e posteriormente ainda se ligam a uma região específica do ADN, chamado elemento de resposta do proliferador de peroxissoma, localizado em genes alvo.

Os primeiros agonistas sintetizados, vulgarmente conhecidos como fibratos, têm como alvo a isoforma- α , que é expressa principalmente no fígado, coração e músculo. Após a ligação, a expressão de vários genes é regulada positivamente, incluindo genes que codificam a apoA-I, apoA-II, ABCA1 e acil-CoA sintetase, a última das quais promove a oxidação de ácidos gordos. Outros como o fibrinogénio, ciclo-oxigenase 2, molécula de adesão celular vascular e proteína C reactiva, são reprimidos, permitindo, assim, um efeito protector em geral. Na verdade, os fibratos melhoraram o perfil de lipoproteínas do plasma e a sensibilidade à insulina, diminuíram a inflamação e coagulação e aumentaram a reactividade vasomotora (Han e col., 2005). Como foi resumido por Chapman, os triglicéridos são reduzidos em 30-50%, as LDL em 15-20% e o c-HDL aumenta de 5% para 15% (Chapman, 2006). Muitos estudos clínicos têm avaliado o impacto dos fibratos na evolução clínica da prevenção primária e secundária (HHS, VA-HIT, BIP, FIELD, etc.). No entanto, os fibratos têm falhado na redução da mortalidade da população em geral.

A isoforma- γ , altamente expressa no tecido adiposo e muscular, regula a homeostase da glicose e da sensibilidade à insulina, para além do seu papel no metabolismo dos lípidos e da inflamação. Assim, agonistas chamados glitazonas foram concebidos para serem utilizados em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Infelizmente, devido a efeitos colaterais (para cancro da bexiga com a pioglitazona, aumento do risco cardiovascular com a rosiglitazona e edema periférico para ambas), esta família de moléculas deixou de ser uma opção terapêutica.

Assim, a ideia geral era criar agonistas duplos que fossem capazes de afectar o metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, visando as duas isoformas- α e - γ . Novos medicamentos foram, portanto, projectados, chamados glitazares, que tiveram efeitos positivos sobre o metabolismo lipídico, devido à activação do PPAR α no fígado e efeitos de sensibilização à insulina, como consequência da activação do PPAR γ , tornando possível a sua utilização na síndrome metabólica (Natarajan e col., 2010), uma condição associada com níveis baixos de c-HDL. Devido aos efeitos colaterais (distúrbios hematológicos, aumento da creatinina sérica, etc.) (Friedland e col., 2012), a maioria das moléculas foram “caindo por terra”, com excepção do aleglitazar (Hoffmann-La Roche Inc., Basileia, Suíça). Durante um período de administração de 16 semanas, a sua segurança e os efeitos positivos sobre o perfil de lipoproteínas foi mostrado em diabéticos do tipo II na fase II do

estudo SYNCHRONY (Henry e col., 2009). O efeito máximo sobre a concentração de c-HDL foi visto com uma dose de 150 µg (com placebo ajustado, o aumento foi de 20,7%, [13,2% a 28,2%] e foi responsável por um efeito maior do que 45 mg de pioglitazona. A mesma dose conduziu a uma diminuição nos triglicéridos (-43,4%, [-27,4% a -59,4%]) e no c-LDL (-15,5%, [-5,4% a -25,6%]). A hemoglobina glicosilada diminuiu de uma forma de dose-dependente. Além disso, de acordo com uma actualização de um investigador da Roche, *AleNephro* (a fase IIb do estudo) também demonstrou a segurança renal desta molécula em pacientes com diabetes tipo II com estágio 3 de doença renal crónica. Um estudo de fase III (*AleCardio*), incluindo pacientes com diabetes tipo 2 hospitalizados por síndrome coronária aguda, teve início em 2009 e os resultados são esperados em 2015.

Recentes agonistas dos receptores activados pelo proliferador de peroxissoma (PPARs) estão em desenvolvimento e são discutidos por promoverem maiores aumentos na concentração de c-HDL, embora as especificações destes compostos não sejam ainda totalmente conhecidas.

d) Bloqueadores dos receptores selectivos canabinóides tipo 1

Os bloqueadores dos receptores selectivos canabinóides tipo 1 (CB1), são agentes que têm a capacidade de corrigir vários factores de risco cardiometabólico que estão presentes em muitas pessoas com excesso de peso ou obesos. Eles também podem ajudar a promover a cessação do tabagismo. Os receptores CB1 são componentes do sistema endocanabinóide recentemente descoberto. Desempenham um papel importante na ingestão de alimentos, no equilíbrio energético e estão directamente implicados no metabolismo lipídico e da glicose. A hiperactividade do sistema endocanabinóide pode levar ao desenvolvimento de obesidade abdominal e dos seus factores de risco cardiovascular associados, incluindo dislipidemia aterogénica, resistência à insulina e diabetes tipo 2, pressão arterial alta e um estado pró-inflamatório.

A primeira experiência em ensaios clínicos com o primeiro bloqueador do receptor selectivo CB1 (rimonabanto) foi mais animadora. O bloqueio do receptor CB1 central (no cérebro) e periféricamente (em adipócitos, fígado, músculo e tracto gastrointestinal) leva a uma redução no peso corporal e no perímetro abdominal, uma elevação do c-HDL, uma redução dos triglicéridos no plasma e um aumento na sensibilidade à insulina. Estes efeitos têm sido demonstrados em ensaios clínicos de grande dimensão sustentados

durante 2 anos. Na realidade, o aumento de c-HDL até 25% foi observado em pessoas tratadas com rimonabanto, um efeito significativamente maior do que o previsto a partir da perda de peso associada (Hennes e col., 2006; Després e col., 2005).

O rimonabanto é um novo agente promissor que tem potencial para melhorar múltiplos factores de risco cardiometabólico, incluindo o baixo c-HDL, em pessoas com obesidade abdominal. No entanto, a sua retirada do mercado por efeitos secundários muito graves foi um revés grande para este tipo de alternativa que parecia poder ser promissora.

e) Inibidores da CETP

Uma deficiência da CETP, que resulta em taxas significativamente reduzidas do volume de apoA-I (Kamanna e col., 2008), é uma causa monogénica altamente hereditária em humanos (Tall, 1990; Cuchel e Rader, 2003). Portanto, a inibição da CETP é alvo de uma abordagem farmacológica para elevar o c-HDL e diminuir o risco de doença cardiovascular. Pequenas moléculas inibidoras da CETP que entraram em desenvolvimento clínico, incluindo o torcetrapibe (Nissen e col., 2007; Kastelein e col., 2007; Bots e col., 2007; Barter e col., 2007), o dalcetrapibe (Schwartz e col., 2012; Fayad e col., 2011; Luscher e col., 2012), o anacetrapibe (Cannon e col., 2010; Bloomfield e col., 2009) e o evacetrapibe (Cao e col., 2011; Nicholls e col., 2011), aumentaram significativamente o nível de c-HDL em seres humanos. Eles também diminuíram os níveis de c-LDL, excepto o dalcetrapibe, que teve um efeito mínimo sobre o nível de c-LDL (Luscher e col., 2012).

O torcetrapibe não mostrou quaisquer efeitos protectores contra a aterosclerose coronária em pacientes tratados com atorvastatina com DAC, como demonstrado no ensaio ILLUSTRATE (Nissen e col., 2007), ou contra a aterosclerose carotídea em pacientes tratados com atorvastatina com hipercolesterolemia familiar (HF) e dislipidemia mista, como demonstrado nos estudos RADIANCE 1 e 2 (Kastelein e col., 2007; Bots e col., 2007). Inesperadamente, a terapêutica com torcetrapibe resultou num aumento do risco de mortalidade e morbidade em pacientes que estavam em alto risco de eventos coronários, o que levou a rescisão antecipada do ensaio ILLUMINATE (Barter e col., 2007). Os efeitos adversos do torcetrapibe foram atribuídos a efeitos fora do alvo do fármaco, incluindo um aumento da pressão arterial, que resultou de um aumento da produção de

aldosterona (Barter e col., 2007; Vergeer e col., 2008) e comprometimento da função endotelial (Connelly e col., 2010; Simic e col., 2012).

O dalcetrapibe é um modulador da CETP que inibe a transferência heterotípica de lípidos neutros (EC e TGs) entre as HDL e as lipoproteínas contendo apoB (por exemplo, VLDL e LDL), mas preserva a transferência homotípica de EC, entre as partículas de HDL (por exemplo, das HDL₃ para as HDL₂) (Niesor e col., 2010; Shinkai, 2012).

A segurança do dalcetrapibe foi avaliada em pacientes com, ou que estavam em alto risco de DAC no ensaios dal-VESSEL e dal-PLAQUE (Fayad e col., 2011; Luscher e col., 2012). O dalcetrapibe não demonstrou quaisquer efeitos adversos sobre a função endotelial, tal como avaliado por dilatação braquial mediada por fluxo (Luscher e col., 2012), na pressão sanguínea (Fayad e col., 2011; Luscher e col., 2012), na estrutura do vaso, avaliando a hemorragia da carótida por IRM (imagem de ressonância magnética) (Fayad e col., 2011), e o tamanho da placa e inflamação arterial, avaliada por PET/CT (tomografia por emissão de positrões/tomografia computacional) utilizando 18F-fluorodesoxiglicose como marcador (Fayad e col., 2011). O ensaio dal-OUTCOMES testou a hipótese de que o dalcetrapibe reduz a morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes com síndrome coronário agudo (SCA) recente (Schwartz e col., 2009). No entanto, o dalcetrapibe não reduziu o risco de eventos cardiovasculares recorrentes (Schwartz e col., 2012), o que resultou no cancelamento do ensaio dal-OUTCOMES por causa da inutilidade, bem como todos os estudos no programa dal-HEART, que envolviam originalmente seis ensaios clínicos: dal-OUTCOMES (terminado), dal-OUTCOMES 2, dal-PLAQUE, dal-ACUTE, dal-PLAQUE (concluído) e dal-VESSEL (concluído).

A segurança do anacetrapibe também foi avaliada em pacientes com, ou que estavam em alto risco, de DAC no ensaio DEFINE (Cannon e col., 2010). O anacetrapibe não teve os efeitos cardiovasculares adversos observados com o torcetrapibe (Cannon e col., 2010). Embora o dalcetrapibe tenha aumentado moderadamente o c-HDL (31-40%), e tenha tido um efeito mínimo sobre os níveis de c-LDL (Schwartz e col., 2012), o anacetrapibe aumentou o c-HDL em cerca de 138% e também reduziu o c-LDL em 40% quando comparado com o placebo (Cannon e col., 2010). O ensaio REVEAL, que teve como objectivo determinar se o anacetrapibe reduz o risco de eventos coronários maiores em pacientes com problemas circulatórios (história de enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica ou DMT2 com outras

evidências de DAC sintomática) e que são tratados com atorvastatina para reduzir os níveis de c-LDL, está ainda a decorrer e será concluído em 2017 (REVEAL, 2012). O evacetrapibe é outro novo inibidor da CETP que está agora a ser testado num estudo com evolução clínica (ACCELERATE) (Guyton e Bays, 2007). Semelhante ao anacetrapibe, tem efeitos tanto sobre o c-HDL como sobre o nível de c-LDL; aumentou o c-HDL entre 54 e 129% e reduziu o c-LDL em 36% em pacientes com dislipidemia (c-LDL alto ou baixo nível de c-HDL) (Nicholls e col., 2011), e não aumentou a pressão arterial ou induziu a produção de aldosterona (Cao e col., 2011). O ensaio ACCELERATE teve como objectivo testar os efeitos do evacetrapibe sobre resultados cardiovasculares (tempo para a primeira ocorrência de desfecho de morte cardiovascular, enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, revascularização coronária ou hospitalização por angina instável) em pacientes que estavam em alto risco para a doença vascular (ACCELERATE, 2013).

É ainda incerto se o aumento do nível de c-HDL utilizando inibidores da CETP como terapêutica farmacológica pode reduzir o risco de DAC, sugerindo que o aumento do nível de c-HDL por si só pode não ser suficiente para evitar a DAC, razão pela qual existem alguns estudos que se têm centrado na possibilidade de aumentar a qualidade/funcionalidade das HDL.

2.7.2.2- Novas terapêuticas direccionadas para o aumento da funcionalidade das HDL

a) ApoA-I / Infusões de HDL reconstituídas (rHDL)

Apesar da intensa pesquisa, pequenas moléculas que possam aumentar a expressão endógena de apoA-I sem os vários efeitos secundários encontrados em algumas substâncias já mencionadas permanecem ainda desconhecidas. Uma estratégia alternativa tem sido a infusão directa de apoA-I ou rHDL para a circulação que podem actuar como receptores de colesterol.

A apoA-I Milano tem sido conhecida, há anos, por ser uma variante da proteína apoA-I estruturante das HDL e que aumenta a capacidade de transporte de colesterol para fora do corpo. Pessoas de uma pequena vila na Itália, que têm essa variante genética têm menos eventos coronários e vivem mais. Uma forma recombinante da apoA-I Milano com um complexo de fosfolípidos (ETC-216) está a ser desenvolvida como um produto para infusão.

Infusões em animais “*wild-type*” para apoA-I/HDL e apoA-I Milano foram testadas e associadas com a atenuação, e até mesmo regressão da aterosclerose em modelos de coelho (Badimon e col., 1990; Miyazaki e col., 1995; Ibanez e col., 2008; Ibanez e col., 2012), e até em ensaios clínicos iniciais em humanos (Shaw e col., 2008; Nissen e col., 2003; Nicholls e col., 2006; Tardif e col., 2007). A administração intravenosa de complexos lipossômicos contendo apoA-I humana, em quatro pacientes com hipercolesterolemia familiar mostrou uma estimulação > 30% da excreção fecal de ácidos biliares e colesterol (Eriksson e col., 1999).

O aumento do TRC foi confirmado no primeiro ensaio clínico utilizando apoA-I humana purificada e fosfolípidos sintéticos (Nanjee e col., 2001). A apoA-I purificada foi então combinada com fosfatidilcolinas de soja e o produto foi chamado CSL-111. Estas HDLs reconstituídas foram testadas no estudo ERASE (*Effect of rHDL on Atherosclerosis Safety and Efficacy*) em pacientes com síndrome coronário agudo (Tardif e col., 2007). Embora o CSL-111 tenha produzido uma redução de volume de 3,4% na placa aterosclerótica após uma perfusão por semana durante um mês, o seu desenvolvimento foi interrompido devido à sua toxicidade no fígado. Surgiram entretanto produtos de segunda geração, como o CSL-112 (CSL Laboratories, Victoria, Austrália) e o CER-001 (Cerenis Therapeutics Labège, França), que estão actualmente a ser testados em pacientes com síndrome coronária aguda (estudo de fase II) e em pacientes com hipercolesterolemia familiar (para o CER-001).

Além deste efeito sobre a regressão da placa aguda as infusões apoA-I/HDL parecem exercer também efeitos anti-inflamatórios (Shaw e col., 2008; Ibanez e col., 2012). Contudo, até que estes compostos possam eventualmente chegar à prática clínica, maiores ensaios que avaliem o seu impacto sobre os eventos cardiovasculares vão ser necessários. No entanto, devido à sua complexidade, a proteína é muito difícil e cara de produzir e a sua utilização por via intravenosa limita a sua aplicação em ensaios, em comparação com a medicação oral.

b) Deslipidação das HDL

Uma técnica nova relacionada com o conceito de infusão de rHDL envolve a recolha de plasma que é subsequentemente submetido a um processo que remove selectivamente lípidos das HDL. As HDLs resultantes, pobres em lípidos, assemelham-se

às rHDLs apoA-I/fosfolípidos já descritas anteriormente. Elas são, em seguida, reinfundidas de volta ao doente. Num pequeno estudo clínico em humanos, o LS-001 (*Lipid Sciences Selective Delipidation Trial*), que envolveu 28 pacientes com SCA (síndrome coronário agudo), sujeitos a 7 tratamentos, um por semana, resultou numa tendência numérica, mas não significativa, para uma diminuição no volume do ateroma comparado com os tamanhos basais (Waksman e col., 2010). Outros estudos maiores, que usam esta abordagem, estão já a ser planeados.

c) Peptídeos miméticos da apoA-I

Os peptídeos miméticos da apoA-I são péptídeos curtos anfipáticos sintéticos de 18-22 aminoácidos, que imitam o domínio de ligação de lípidos das apoA-I e retêm as propriedades funcionais das apoA-I, como a capacidade de formar complexos com lípidos, promovendo o efluxo de colesterol celular e activando a LCAT (Sethi e col., 2007; Getz e col., 2010). Têm a vantagem de ser relativamente baratos e fáceis de sintetizar em comparação com as apoA-I de tamanho completo.

O mais promissor dos peptídeos miméticos da apoA-I parece ser o D-4F, um peptídeo activo por via oral, com aminoácidos-D (que são resistentes à hidrólise gástrica ao contrário dos aminoácidos-L) e quatro substituições de fenilalanina, e tem sido estudado para mostrar melhorar a função antioxidante e anti-inflamatória das HDL e melhorar a sua capacidade de efluxo de colesterol sem aumentar os níveis plasmáticos de c-HDL em modelos de rato (Sherman e col., 2010).

O peptídeo D-4F também é o único peptídeo mimético da apolipoproteína relatado até agora por passar por testes em humanos. Num estudo de Fase I, 50 pacientes com doença cardíaca coronária receberam uma dose única de 30, 100, 300 ou 500 mg de D-4F não formulado. Mesmo que não tenha sido observada toxicidade evidente neste estudo, verificou-se alguma apreensão sobre o uso a longo prazo de D-4F (Bloedon e col., 2008).

Portanto, o optimismo inicial em relação ao potencial terapêutico destes peptídeos miméticos foi atenuada pela incapacidade de qualquer um deles se deslocar para uma fase avançada de desenvolvimento clínico. No entanto, outros ensaios clínicos estão em curso com outras moléculas similares.

2.8 – “Contextualização do problema e desafios actuais”

A ideia de que as HDL protegem contra o desenvolvimento da doença cardiovascular baseia-se num número de observações robustas e consistentes: 1) estudos populacionais em humanos têm mostrado consistentemente que as altas concentrações plasmáticas de c-HDL e da maior apolipoproteína (apo) das HDL, apoA-I, são preditores inversos e independentes do risco de evento CV em modelos multivariados que se ajustam para covariáveis de factores de risco estabelecidas (Di Angelantonio e col., 2009); 2) as HDL possuem várias propriedades com potencial para proteger contra a DCV (Rye e col., 2009; Teslovich e col., 2010); 3) intervenções que aumentam a concentração de HDL numa variedade de modelos animais inibem o desenvolvimento de aterosclerose (Badimon e col., 1990; Rubin e col., 1991; Liu e col., 1994; Plump e col., 1994); 4) em estudos de prova-de-conceito em humanos, as infusões de HDL reconstituídas (rHDL) e de formas mutantes de HDL (apoA-I Milano) promoveram a regressão do ateroma coronário, avaliada por ultra-som intravascular (IVUS) (Nissen e col., 2003; Tardif e col., 2007).

No entanto, o aumento da concentração de c-HDL em doentes tratados com estatinas não se traduziu numa redução de eventos cardiovasculares clínicos. Para além disso, ensaios clínicos recentes que investigaram os efeitos de agentes que aumentam o c-HDL não conseguiram encontrar qualquer benefício clínico na DCV (Boden e col., 2011; Schwartz e col., 2012). Estes aspectos levantam a seguinte pergunta: porque é que as evidências robustas obtidas de ensaios clínicos, de estudos experimentais em modelos animais e de estudos funcionais de HDL não se traduzem numa redução de eventos clínicos cardiovasculares em estudos recentes com agentes que aumentam a concentração do c-HDL? Neste momento, não é possível dar uma resposta definitiva a esta questão. Contudo, é obviamente muito cedo e, por isso, totalmente imprudente abandonar já a “hipótese das HDL”; antes pelo contrário, a comunidade científica considera que talvez a “ponta-do-véu” esteja a ser levantada, merecendo esforços continuados para aprofundar esta temática. Nesta tese de doutoramento, concordamos com essa ideia e defendemos que muito mais estudos são necessários para compreender as razões dos resultados inesperados destes ensaios clínicos, devendo continuar-se a procurar agentes eficazes e seguros que aumentem a funcionalidade das HDL e que possam contribuir com dados preciosos para a melhoria do tratamento da dislipidemia e para a redução do risco CV associado.

2.9 – Referências

- A Study of Evacetrapib in High-Risk Vascular Disease (ACCELERATE). Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition With Evacetrapib in Patients at a High-Risk for Vascular Outcomes. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01687998> (accessed June 7, 2013).
- Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R, et al. Elevated HDL cholesterol is a risk factor for ischemic heart disease in white women when caused by a common mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene. *Circulation* 2000; 101(16):1907-12.
- Alagona P Jr. Beyond LDL cholesterol: the role of elevated triglycerides and low HDL cholesterol in residual CVD risk remaining after statin therapy. *Am J Manag Care* 2009; 15(3 Suppl):S65-73.
- Altschul R, Hoffer A, Stephen JD. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch Biochem Biophys* 1955; 54(2):558-9.
- Anderson TJ. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Fail Rev* 2003; 8(1):71-86.
- Ansell BJ, Navab M, Hama S, et al. Inflammatory/anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 2003; 108(22):2751-6.
- Assmann G, Funke H. HDL metabolism and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 16 Suppl 9:S15-20.
- Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, et al. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124 Suppl:S11-20.
- Asztalos B, Lefevre M, Wong L, et al. Differential response to low-fat diet between low and normal HDL-cholesterol subjects. *J Lipid Res* 2000; 41(3):321-8.
- Asztalos B, Zhang W, Roheim PS, et al. Role of free apolipoprotein A-I in cholesterol efflux. Formation of pre-alpha-migrating high-density lipoprotein particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(9):1630-6.
- Asztalos BF, Batista M, Horvath KV, et al. Change in alpha1 HDL concentration predicts progression in coronary artery stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(5):847-52.
- Asztalos BF, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. *Am J Cardiol* 2003; 91(7A):12E-17E.
- Asztalos BF, Tani M, Schaefer EJ. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol* 2011; 22(3):176-85.
- Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, et al. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(10):2185-91.
- Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 1990; 85(4):1234-41.
- Badimon L, Vilahur G. LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1254:18-32.
- Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366(9493):1267-78.

- Ballantyne CM, Herd JA, Ferlic LL, et al. Influence of low HDL on progression of coronary artery disease and response to fluvastatin therapy. *Circulation* 1999; 99(6):736-43.
- Barter P, Kastelein J, Nunn A, et al. High-density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis: the unanswered questions. *Atherosclerosis* 2003; 168(2):195-211.
- Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007; 357(21):2109-22.
- Barter PJ, Brandrup-Wognsen G, Palmer MK, et al. Effect of statins on HDL-C: a complex process unrelated to changes in LDL-C: analysis of the VOYAGER Database. *J Lipid Res* 2010; 51(6):1546-53.
- Barter PJ, Rye KA. Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(1):39-46.
- Behrens WA, Thompson JN, Madère R. Distribution of alpha-tocopherol in human plasma lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1982; 35(4):691-6.
- Bergheanu SC, Van Tol A, Dallinga-Thie GM, et al. Effect of rosuvastatin versus atorvastatin treatment on paraoxonase-1 activity in men with established cardiovascular disease and a low HDL-cholesterol. *Curr Med Res Opin* 2007; 23(9):2235-40.
- Beyer TP, Chen Y, Porter RK, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists regulate cholesterol ester transfer protein. *Lipids* 2008; 43(7):611-8.
- Birjmohun RS, Hutten BA, Kastelein JJ, et al. Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(2):185-97.
- Bloedon LT, Dunbar R, Duffy D, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *J Lipid Res* 2008; 49(6):1344-52.
- Bloomfield D, Carlson GL, Sapre A, et al. Efficacy and safety of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor anacetrapibe as monotherapy and coadministered with atorvastatin in dyslipidemic patients. *Am Heart J* 2009; 157(2):352-360. e2.
- Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* 2011; 365(24):2255-67.
- Bodor ET, Offermanns S. Nicotinic acid: an old drug with a promising future. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1:S68-75.
- Borggreve SE, Hillege HL, Dallinga-Thie GM, et al. High plasma cholesteryl ester transfer protein levels may favour reduced incidence of cardiovascular events in men with low triglycerides. *Eur Heart J* 2007; 28(8):1012-8.
- Borggreve SE, Hillege HL, Wolffenbuttel BH, et al. An increased coronary risk is paradoxically associated with common cholesteryl ester transfer protein gene variations that relate to higher high-density lipoprotein cholesterol: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(9):3382-8.
- Bots ML, Visseren FL, Evans GW, et al. Torcetrapib and carotid intima-media thickness in mixed dyslipidaemia (RADIANCE 2 study): A randomised, double-blind trial. *Lancet* 2007; 370(9582):153-60.
- Brandt C, Pedersen BK. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010:520258.
- Braun A, Trigatti BL, Post MJ, et al. Loss of SR-BI expression leads to the early onset of occlusive atherosclerotic coronary artery disease, spontaneous myocardial infarctions, severe cardiac dysfunction, and premature death in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res* 2002; 90(3):270-6.

- Breuer HW. Hypertriglyceridemia: a review of clinical relevance and treatment options: focus on cerivastatin. *Curr Med Res Opin* 2001; 17(1):60-73.
- Brinton EA. Lipid abnormalities in the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 2003; 3(1):65-72.
- Brown BG, Zhao XQ, Cheung MC. Should both HDL-C and LDL-C be targets for lipid therapy? A review of current evidence. *J Clin Lipidol* 2007; 1(1):88-94.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89(3):331-40.
- Canales A, Sanchez-Muniz FJ. Paraoxonase, something more than an enzyme? *Med Clin (Barc)* 2003; 12(14):537-48.
- Cannon CP, Shah S, Dansky HM, et al. Safety of anacetrapibe in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med* 2010; 363(25):2406-15.
- Cannon RO. 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998; 44(8 Pt 2):1809-19.
- Cao G, Beyer TP, Zhang Y, et al. Evacetrapib is a novel, potent, and selective inhibitor of cholesteryl ester transfer protein that elevates HDL cholesterol without inducing aldosterone or increasing blood pressure. *J Lipid Res* 2011; 52(12):2169-76.
- Cao H, Girard-Globa A, Berthezene F, et al. Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q^R genetic polymorphism. *J Lipid Res* 1999; 40(1):133-9.
- Carlson LA, Hamsten A, Asplund A. Pronounced lowering of serum levels of lipoprotein Lp(a) in hyperlipidaemic subjects treated with nicotinic acid. *J Intern Med* 1989; 226(4):271-6.
- Casella-Filho A, Chagas AC, Maranhao RC, et al. Effect of exercise training on plasma levels and functional properties of high-density lipoprotein cholesterol in the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2011; 107(8):1168-72.
- Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis* 2011; 217(1):3-46.
- Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem* 2007; 282(1):743-51.
- Chapman MJ. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* 2003; 171(1):1-13.
- Chapman MJ. Fibrates: therapeutic review. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2006; 6:11-21.
- Cheung MC, Albers JJ. Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem* 1984; 259(19):12201-9.
- Chirovsky DR, Fedirko V, Cui Y, et al. Prospective studies on the relationship between high-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular risk: a systematic review. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; 16(4):404-23.
- Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000; 28(12):1815-26.
- Chong PH, Kezele R, Franklin C. High-density lipoprotein cholesterol and the role of statins. *Circ J* 2002; 66(11):1037-44.

- Christidis DS, Liberopoulos EN, Kakafika AI, et al. Effect of paraoxonase 1 polymorphisms on the response of lipids and lipoprotein-associated enzymes to treatment with fluvastatin. *Arch Med Res* 2007; 38(4):403-10.
- Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A, et al. Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1 induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation* 2001; 103(1):108-12.
- Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, et al. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(4):910-7.
- Connelly MA, Parry TJ, Giardino EC, et al. Torcetrapib produces endothelial dysfunction independent of cholesteryl ester transfer protein inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 55(5):459-468.
- Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, et al. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis* 2009; 206(2):611-6.
- Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, et al. How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; 16(3):304-14.
- Crouse SF, O'Brien BC, Grandjean PW, et al. Effects of training and a single session of exercise on lipids and apolipoproteins in hypercholesterolemic men. *J Appl Physiol* 1997; 83(6):2019-28.
- Cuchel M, Rader DJ. Genetics of increased HDL cholesterol levels: Insights into the relationship between HDL metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(10):1710-2.
- Cuchel M, Rader DJ. The role of high-density lipoproteins in thrombosis. *Scientific World Journal* 2002; 12(2):89-95.
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 107(10):1255-62.
- Davidson MH, Armani A, McKenney JM, et al. Safety considerations with fibrate therapy. *Am J Cardiol* 2007; 99(6A):3C-18C.
- Davidson MH, Ose L, Frohlich J, et al. Differential effects of simvastatin and atorvastatin on high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I are consistent across hypercholesterolemic patient subgroups. *Clin Cardiol* 2003; 26(11):509-14.
- Davidson MH. Statin/fibrate combination in patients with metabolic syndrome or diabetes: evaluating the risks of pharmacokinetic drug interactions. *Expert Opin Drug Saf* 2006; 5(1):145-56.
- Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, et al. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(6):870-6.
- Davidsson P, Hulthe J, Fagerberg B, et al. Proteomics of apolipoproteins and associated proteins from plasma high-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(2):156-63.
- Deakin S, Leviev I, Guernier S, et al. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(11):2083-9.
- deGoma EM, deGoma RL, Rader DJ. Beyond high-density lipoprotein cholesterol levels evaluating high-density lipoprotein function as influenced by novel therapeutic approaches. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(23):2199-211.
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999; 85(5):394-402.

Després JP, Golay A, Sjostrom L; Rimonabant in Obesity-Lipids Study Group. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidaemia. *N Engl J Med* 2005; 353(20):2121-34.

Dierkes J, Luley C, Westphal S. Effect of lipid-lowering and anti-hypertensive drugs on plasma homocysteine levels. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3(1):99-108.

Digby JE, Martinez F, Jefferson A, et al. Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in human monocytes are mediated by GPR109A dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(3):669-76.

Digby JE, McNeill E, Dyar OJ, et al. Anti-inflammatory effects of nicotinic acid in adipocytes demonstrated by suppression of fractalkine, RANTES, and MCP-1 and upregulation of adiponectin. *Atherosclerosis* 2010; 209(1):89-95.

Drew BG, Carey AL, Natoli AK, et al. Reconstituted high-density lipoprotein infusion modulates fatty acid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Lipid Res* 2011; 52(3):572-81.

Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, et al. High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2009; 119(15):2103-11.

Duffy D, Rader DJ. Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nature Reviews Cardiology* 2009; 6(7):455-63.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(4):473-80.

Durstine JL, Grandjean PW, Cox CA, et al. Lipids, lipoproteins, and exercise. *J Cardiopulm Rehabil* 2002; 22(6):385-98.

Durstine JL, Grandjean PW, Davis PG, et al. Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise: A quantitative analysis. *Sports Med* 2001; 31(15):1033-62.

Elam MB, Hunninghake DB, Davis KB, et al. Effect of niacin on lipid and lipoprotein levels and glycemic control in patients with diabetes and peripheral arterial disease: the ADMIT study: A randomized trial. Arterial Disease Multiple Intervention Trial. *JAMA* 2000; 284(10):1263-70.

Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009; 302(18):1993-2000.

Eriksson M, Carlson LA, Miettinen TA, et al. Stimulation of fecal steroid excretion after infusion of recombinant proapolipoprotein A-I. Potential reverse cholesterol transport in humans. *Circulation* 1999; 100(6):594-8.

Fayad ZA, Mani V, Woodward M, et al. Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): A randomised clinical trial. *Lancet* 2011; 378(9802):1547-59.

Fazio S, Linton MF. Apolipoprotein AI as therapy for atherosclerosis: does the future of preventive cardiology include weekly injections of the HDL protein? *Mol Interv* 2003; 3(8):436-40.

Fazio S, Linton MF. Elevated high-density lipoprotein (HDL) levels due to hepatic lipase mutations do not reduce cardiovascular disease risk: another strike against the HDL dogma. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(4):1081-3.

Fazio S, Linton MF. Sorting out the complexities of reverse cholesterol transport: CETP polymorphisms, HDL, and coronary disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(9):3273-5.

Festa A, William SK, Hanley AJ, et al. Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin ResistanceAtherosclerosis Study. *Circulation* 2005; 111(25):3465-72.

- Franceschini G, Sirtori CR, Capurso II A, et al. A-Milano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest* 1980; 66(5):892-900.
- Franceschini G, Calabresi L, Colombo C, et al. Effects of fenofibrate and simvastatin on HDL-related biomarkers in low-HDL patients. *Atherosclerosis* 2007; 195(2):385-91.
- Francone OL, Aiello RJ. ABCA1: regulation, function and relationship to atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3(3):415-9.
- Fredenrich A, Bayer P. Reverse cholesterol transport, high-density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data. *Diabetes Metab* 2003; 29(3):201-05.
- Frick MH, Elo O, Haapa K, et al. Helsinki Heart Study: primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987; 317(20):1237-45.
- Friedland SN, Leong A, Filion KB, et al. The cardiovascular effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Am J Med* 2012; 125(2):126-33.
- Fruchart JC, Sacks F, Hermans MP, et al. The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol* 2008; 102(10 Suppl):1K-34K.
- Fryirs MA, Barter PJ, Appavoo M, et al. Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(8):1642-8.
- G HB, Rao VS, Kakkar VV. Friend turns foe: transformation of anti-inflammatory HDL to proinflammatory HDL during acute-phase response. *Cholesterol* 2011; 2011:274629.
- Ganji SH, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease (review). *J Nutr Biochem* 2003; 14(6):298-305.
- Ganji SH, Qin S, Zhang L, et al. Niacin inhibits vascular oxidative stress, redox-sensitive genes, and monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 2009; 202(1):68-75.
- Ganji SH, Tavintharan S, Zhu D, et al. Niacin noncompetitively inhibits DGAT2 but not DGAT1 activity in HepG2 cells. *J Lipid Res* 2004; 45(10):1835-45.
- Gao X, Yuan S, Jayaraman S, et al. Differential stability of high-density lipoprotein subclasses: effects of particle size and protein composition. *J Mol Biol* 2009; 387(3):628-38.
- Garg A, Grundy SM. Nicotinic acid as therapy for dyslipidemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *JAMA* 1990; 264(6):723-6.
- Getz GS, Reardon CA. High-density lipoprotein function in regulating insulin secretion: possible relevance to metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(8):1497-9.
- Getz GS, Wool GD, Reardon CA. Biological properties of apolipoprotein a-I mimetic peptides. *Curr Atheroscler Rep* 2010; 12(2):96-104.
- Ghali WA, Rodondi N. HDL cholesterol and cardiovascular risk. *BMJ* 2009; 338: a3065.
- Gille A, Bodor ET, Ahmed K, et al. Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48:79-106.
- Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, et al. The anti-inflammatory effects of exercise: Mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(9):607-15.
- Gofman JW, Young W, Tandy R. Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity. *Circulation* 1966; 34(4):679-97.

- Goldbourt U, Medalie JH. High density lipoprotein cholesterol and incidence of coronary heart disease—the Israeli Ischemic Heart Disease Study. *Am J Epidemiol* 1979; 109(3):296-308.
- Golomb BA, Evans MA. Statin adverse effects: a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am J Cardiovasc Drugs* 2008; 8(6):373-418.
- Gordon DJ, Knoke J, Probstfield JL, et al. High density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in hypercholesterolemic men: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation* 1986; 74(6):1217-25.
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1):8-15.
- Gordon SM, Deng J, Lu LJ, et al. Proteomic characterization of human plasma high density lipoprotein fractionated by gel filtration chromatography. *J Proteome Res* 2010; 9(10):5239-49.
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62(5):707-14.
- Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, et al. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(1):189-97.
- Guyton JR, Bays HE. Safety considerations with niacin therapy. *Am J Cardiol* 2007; 99(6):22C-31C.
- Haas MJ, Alamir AR, Sultan S, et al. Nicotinic acid induces apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 and Caco-2 cell lines. *Metabolism* 2011; 60(12):1790-6.
- Han SH, Quon MJ, Koh KK. Beneficial vascular and metabolic effects of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *Hypertension* 2005; 46(5):1086-92.
- Harangi M, Mirdamadi HZ, Seres I, et al. Atorvastatin effect on the distribution of high-density lipoprotein subfractions and human paraoxonase activity. *Transl Res* 2009; 153(4):190-8.
- Harrison DG. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 1994; 89 Suppl 1:87-102.
- Hayashino Y, Jackson JL, Fukumori N, et al. Effects of supervised exercise on lipid profiles and blood pressure control in people with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 98(3):349-60.
- Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360(9326):7-22.
- Heinecke JW. The HDL proteome: a marker and perhaps mediator of coronary artery disease. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S167-71.
- Heinecke JW. The not-so-simple HDL story: A new era for quantifying HDL and cardiovascular risk? *Nature Medicine* 2012; 18(9):1346-7.
- Hennes S, Robinson DM, Lyseng-Williamson KA. Rimonabant. *Drugs* 2006; 66(16):2109-19.
- Henry RR, Lincoff AM, Mudaliar S, et al. Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist aleglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes (SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study. *Lancet* 2009; 374(9684):126-35.
- Higashihara M, Kinoshita M, Teramoto T, et al. The role of apoE in inhibitory effects of apoE-rich HDL on platelet function. *FEBS Lett* 1991; 282(1):82-6.

- Hoofnagle AN, Heinecke JW. Lipoproteomics: using mass spectrometry-based proteomics to explore the assembly, structure, and function of lipoproteins. *J Lipid Res* 2009; 50(10):1967-75.
- Hossain MA, Tsujita M, Gonzalez FJ, et al. Effects of fibrate drugs on expression of ABCA1 and HDL biogenesis in hepatocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008; 51(3):258-66.
- Huang JM, Huang ZX, Zhu W. Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein. *Clin Biochem* 1998; 31(7):537-43.
- Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, et al. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(5):1834-8.
- Hulley S, Ashman P, Kuller L, et al. HDL-cholesterol levels in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) by the MRFIT Research Group 1,2. *Lipids* 1979; 14(1):119-123.
- Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, et al. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001; 155(2):269-81.
- Ibanez B, Giannarelli C, Cimmino G, et al. Recombinant HDL(Milano) exerts greater anti-inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL(wild-type). *Atherosclerosis* 2012; 220(1):72-7.
- Ibanez B, Vilahur G, Cimmino G, et al. Rapid change in plaque size, composition, and molecular footprint after recombinant apolipoprotein A-I Milano (ETC-216) administration: magnetic resonance imaging study in an experimental model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(11):1104-9.
- Jacobson TA. Myopathy with statin-fibrate combination therapy: clinical considerations. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5(9):507-18.
- Jialal I, Devaraj S. The role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. *J Nutr* 1996; 126(4 Suppl):1053S-7S.
- Johannsen TH, Kamstrup PR, Andersen RV, et al. Hepatic lipase, genetically elevated high-density lipoprotein, and risk of ischemic cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(4):1264-73.
- Jones PH, Hunninghake DB, Ferdinand KC, et al. Effects of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin on non-high-density lipoprotein cholesterol, apolipoproteins, and lipid ratios in patients with hypercholesterolemia: additional results from the STELLAR trial. *Clin Ther* 2004; 26(9):1388-99.
- Joyner MJ, Green DJ. Exercise protects the cardiovascular system: Effects beyond traditional risk factors. *J Physiol* 2009; 587(Pt 23):5551-8.
- Judge EP, Phelan D, O'Shea D. Beyond statin therapy: a review of the management of residual risk in diabetes mellitus. *J R Soc Med* 2010; 103(9):357-62.
- Kamanna VS, Kashyap ML. Mechanism of action of niacin. *Am J Cardiol* 2008; 101(8A):20B-26B.
- Karpe F, Frayn KN. The nicotinic acid receptor - a new mechanism for an old drug. *Lancet* 2004; 363(9424):1892-4.
- Kastelein JJ, van Leuven SI, Burgess L, et al. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 2007; 356(16):1620-30.
- Keech A, Simes RJ, Barter P, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 366(9500):1849-61.
- Kelley GA, Kelley KS, Franklin B. Aerobic exercise and lipids and lipoproteins in patients with cardiovascular disease: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Cardiopulm Rehabil* 2006; 26(3):131-9.

Kelley GA, Kelley KS. Aerobic exercise and HDL2-C: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 2006; 184(1):207-15.

Keys A. Alpha lipoprotein (HDL) cholesterol in the serum and the risk of coronary heart disease and death. *Lancet* 1980; 2(8195 pt 1):603-6.

Knopp RH, Walden CE, Retzlaff BM, et al. Long-term cholesterol-lowering effects of 4 fat-restricted diets in hypercholesterolemic and combined hyperlipidemic men: The Dietary Alternatives Study. *JAMA* 1997; 278(18):1509-15.

Kodama S, Tanaka S, Saito K, et al. Effect of aerobic exercise training on serum levels of high-density lipoprotein cholesterol: A meta analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167(10):999-1008.

Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev* 2006; 58(3):342-74.

Kontush A, Chapman MJ. High-density lipoproteins: structure, metabolism, function, and therapeutics. 1st ed., John Wiley & Sons, Inc: NJ, 2012.

Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(10):1881-8.

Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL - guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3(3):144-53.

Kota SK, Meher LK, Rao ES, et al. Efficacy and safety of statin and fibrate combination therapy in lipid management. *Diabetes Metab Syndr* 2012; 6(3):173-4.

Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 2002; 347(19):1483-92.

Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidyl-choline, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90(3):1138-44.

Kuvin JT, Dave DM, Sliney KA, et al. Effects of extended-release niacin on lipoprotein particle size, distribution, and inflammatory markers in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2006; 98(6):743-5.

Kuvin JT, Rämetsä ME, Patel AR, et al. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. *Am Heart J* 2002; 144(1):165-72.

Lamarche B, Moorjani S, Cantin B, et al. Associations of HDL2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(6):1098-105.

Lamon-Fava S, Diffenderfer MR, Barrett PH, et al. Extended-release niacin alters the metabolism of plasma apolipoprotein (Apo) A-I and ApoB-containing lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(9):1672-8.

Lamon-Fava S, Herrington DM, Reboussin DM, et al. Plasma levels of HDL subpopulations and remnant lipoproteins predict the extent of angiographically-defined coronary artery disease in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(3):575-9.

Lavigne PM, Karas RH. The current state of niacin in cardiovascular disease prevention: a systematic review and meta-regression. *J Am Coll Cardiol* 2013; 61(4):440-6.

- Lawrence SP. Transient focal hepatic defects related to sustained-release niacin. *J Clin Gastroenterol* 1993; 16(3):234-6.
- Le Goff W, Guerin M, Chapman MJ. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol Ther* 2004; 101(1):17-38.
- Leon AS, Sanchez OA. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(6 Suppl):S502-15; discussion S528-9.
- Lesnik P, Vonica A, Guérin M, et al. Anti-coagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a). *Arterioscl Thromb* 1993; 13(7):1066-75.
- Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:89-118.
- Liu AC, Lawn RM, Verstuyft JG, et al. Human apolipoprotein A-I prevents atherosclerosis associated with apolipoprotein[a] in transgenic mice. *J Lipid Res* 1994; 35(12):2263-7.
- Luliano L. The oxidant stress hypothesis of atherogenesis. *Lipids* 2001; 36 Suppl:S41-4.
- Lupattelli G, Marchesi S, Lombardini R, et al. Mechanisms of high-density lipoprotein cholesterol effects on the endothelial function in hyperlipemia. *Metabolism* 2003; 52(9):1191-5.
- Luscher TF, Taddei S, Kaski JC, et al. Vascular effects and safety of dalcetrapib in patients with or at risk of coronary heart disease: The dal-VESSEL randomized clinical trial. *Eur Heart J* 2012; 33(7):857-65.
- Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness M. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318(3):680-3.
- Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet* 1999a; 353(9151):468-9.
- Mackness M, Mackness B. Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radic Biol Med* 2004; 37(9):1317-23.
- Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995; 115(2):243-53.
- Mackness MI, Abbott C, Arrol S, et al. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294(Pt 3):829-34.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286(1-2):152-4.
- Mackness MI, Durrington PN, Ayub A, et al. Low serum paraoxonase: a risk factor for atherosclerotic disease? *Chem Biol Interact* 1999b; 119-120:389-97.
- Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11(4):383-8.
- Mardones P, Pilon A, Bouly M, et al. Fibrates down-regulate hepatic scavenger receptor class B type I protein expression in mice. *J Biol Chem* 2003; 278(10):7884-90.
- Marma AK, Lloyd-Jones DM. Systematic examination of the updated Framingham heart study general cardiovascular risk profile. *Circulation* 2009; 120(5):384-90.
- Martin G, Duez H, Blanquart C, et al. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest* 2001; 107(11):1423-32.
- Marx N, Sukhova GK, Collins T, et al. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 1999; 99(24):3125-31.

- Masson D, Koseki M, Ishibashi M, et al. Increased HDL cholesterol and apoA-I in humans and mice treated with a novel SR-BI inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(12):2054-60.
- McTaggart F, Jones P. Effects of statins on high-density lipoproteins: a potential contribution to cardiovascular benefit. *Cardiovasc Drugs Ther* 2008; 22(4):321-38.
- Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975; 1(7897):16-9.
- Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, et al. High-density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem* 2003; 278(11):9142-9.
- Miyazaki A, Sakuma S, Morikawa W, et al. Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(11):1882-8.
- Montali A, Vega GL, Grundy SM. Concentrations of apolipoprotein A-I-containing particles in patients with hypoalphalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb* 1994; 14(4):511-7.
- Mora S, Szklo M, Otvos JD, et al. LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2007; 192(1):211-7.
- Movva R, Rader DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem* 2008; 54(5):788-800.
- Moyer MP, Tracy RP, Tracy PB, et al. Plasma lipoproteins support prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(3):458-65.
- Nagila A, Permpongpaiboon T, Tantrarongroj S, et al. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. *Pharmacol Rep* 2009; 61(5):892-8.
- Naik SU, Wang X, Da Silva JS, et al. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 2006; 113(1):90-7.
- Nanjee MN, Cooke CJ, Garvin R, et al. Intravenous apoA-I/lecithin discs increase pre-beta-HDL concentration in tissue fluid and stimulate reverse cholesterol transport in humans. *J Lipid Res* 2001; 42(10):1586-93.
- Natarajan P, Ray KK, Cannon CP. High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(13):1283-99.
- National Cholesterol Education Panel. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106(25):3143-421.
- Neufeld M, Nofer JR, Becker P, et al. High-density lipoproteins inhibit fibrinogen binding on adenosine diphosphate-activated monocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11(6):505-9.
- Nicholls SJ, Brewer HB, Kastelein JJ, et al. Effects of the CETP inhibitor evacetrapib administered as monotherapy or in combination with statins on HDL and LDL cholesterol: A randomized controlled trial. *JAMA* 2011; 306(19): 2099-109.
- Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, et al. Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* 2005; 111(12):1543-50.
- Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, et al. Relationship between atheroma regression and change in lumen size after infusion of apolipoprotein A-I Milano. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:992-997.
- Nielsen S, Pedersen BK. Skeletal muscle as an immunogenic organ. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8(3):346-51.

- Niesor EJ, Magg C, Ogawa N, et al. Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre-beta-HDL formation and increases reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 2010; 51(12):3443-54.
- Nissen SE, Tardif JC, Nicholls SJ, et al. Effect of torcetrapibe on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* 2007; 356(13):1304-16.
- Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290(17):2292-300.
- Nofer JR, Junker R, Pulawski E, et al. High density lipoproteins induce cell cycle entry in vascular smooth muscle cells via mitogen activated protein kinase-dependent pathway. *Thromb Haemost* 2001; 85(4):730-5.
- Nofer JR, Walter M, Kehrel B, et al. HDL3-mediated inhibition of thrombin induced platelet aggregation and fibrinogen binding occurs via decreased production of phosphoinositide-derived second messengers 1,2-diaclyglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(6):861-9.
- O'Connell BJ, Genest J Jr. High density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 2001; 104(16):1978-83.
- Oram JF. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13(4):373-81.
- Oseroff A, Krishnamurti C, Hassett A, et al. Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor activities in men with coronary artery disease. *J Lab Clin Med* 1989; 113(1):88-93.
- Parra HJ, Arveiler D, Evans AE, et al. A case-control study of lipoprotein particles in two populations at contrasting risk for coronary heart disease. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:701-7.
- Pearson TA, Bulkley BH, Achuff SC, et al. The association of low levels of HDL cholesterol and arteriographically defined coronary artery disease. *Am J Epidemiol* 1979; 109(103):285-95.
- Pearson TA. Coronary arteriography in the study of the epidemiology of coronary artery disease. *Epidemiol Rev* 1984; 6:140-66.
- Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 2008; 88(4):1379-406.
- Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8(8):457-65.
- Peng D, Hiipakka RA, Xie JT, et al. A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR (-/-) mice. *Br J Pharmacol* 2011; 162(8):1792-804.
- Perk J, De Backer G, Gohlke H, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Atherosclerosis* 2012; 223(1):1-68.
- Perugini C, Bagnati M, Cau C, et al. Distribution of lipid-soluble antioxidants in lipoproteins from healthy subjects. I. Correlation with plasma antioxidant levels and composition of lipoproteins. *Pharmacol Res* 2000a; 41(1):55-65.
- Perugini C, Bagnati M, Cau C, et al. Distribution of lipid-soluble antioxidants in lipoproteins from healthy subjects. II. Effects of *in vivo* supplementation with alpha-tocopherol. *Pharmacol Res* 2000b; 41(1):67-74.
- Phuntuwate W, Suthisang C, Koanantakul B, et al. Effect of fenofibrate therapy on paraoxonase1 status in patients with low HDL-C levels. *Atherosclerosis* 2008; 196(1):122-8.

Plaisance EP, Lukasova M, Offermanns S, et al. Niacin stimulates adiponectin secretion through the GPR109A receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296(3):E549-58.

Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(20):9607-11.

Podrez EA. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; 37(7):719-25.

Pownall HJ, Ballantyne CM, Kimball KT, et al. Effect of moderate alcohol consumption on hypertriglyceridemia: A study in the fasting state. *Arch Intern Med* 1999; 159(9):981-7.

Poynten AM, Gan SK, Kriketos AD, et al. Nicotinic acid-induced insulin resistance is related to increased circulating fatty acids and fat oxidation but not muscle lipid content. *Metabolism* 2003; 52(6):699-704.

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, et al. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33(3):498-507.

Printseva OYu, Peclo MM, Gown AM. Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody 10F3. *Am J Pathol* 1992; 140(4):889-96.

Rämet ME, Rämet M, Lu Q, et al. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(12):2288-97.

Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. The Expert Panel. *Arch Intern Med* 1988; 148(1):36-69.

REVEAL: Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib Through Lipid-modification. A Large-scale, Randomized Placebo-controlled Trial of the Clinical Effects of Anacetrapib Among People With Established Vascular Disease. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01252953> (accessed November 29, 2012).

Rhoads GG, Gulbrandsen CL, Kagan A. Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men. *N Engl J Med* 1976; 294(6):293-8.

Ricote M, Villedor AF, Glass CK. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(2):230-9.

Riddell DR, Graham A, Owen JS. Apolipoprotein E inhibits platelet aggregation through the L-arginine: nitric oxide pathway. Implications for vascular disease. *J Biol Chem* 1997; 272(1):89-95.

Riddell DR, Vinogradov DV, Stannard AK, et al. Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *J Lipid Res* 1999; 40(10):1925-30.

Robins SJ, Collins D, Wittes JT, et al. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285(12):1585-91.

Rosenson RS, Otvos JD, Freedman DS. Relations of lipoprotein subclass levels and low-density lipoprotein size to progression of coronary artery disease in the Pravastatin Limitation of Atherosclerosis in the Coronary Arteries (PLAC-I) trial. *Am J Cardiol* 2002; 90(2):89-94.

Rosenson RS, Brewer HB Jr, Chapman MJ, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem* 2011; 57(3):392-410.

Rosenson RS. Antiatherothrombotic effects of nicotinic acid. *Atherosclerosis* 2003; 171(1):87-96.

Ruan X, Li Z, Zhang Y, et al. Apolipoprotein A-I possesses an anti-obesity effect associated with increase of energy expenditure and up-regulation of UCP1 in brown fat. *J Cell Mol Med* 2011; 15(4):763-72.

- Rubic T, Trottmann M, Lorenz RL. Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoid cells by niacin. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(3):411-9.
- Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, et al. Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein A. *Nature* 1991; 353(6341):265-7.
- Rubins HB, Robins SJ, Collins D, et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999; 341(6):410-8.
- Ruiz J, Blanché H, James RW, et al. Gln-Arg 192 polymorphism of paraoxonase and coronary disease in type 2 diabetes. *Lancet* 1995; 346(8979):869-72.
- Rütti S, Ehses JA, Sibler RA, et al. Low- and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2009; 150(10):4521-30.
- Rye KA, Barter PJ. Formation and metabolism of prebetamigrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 2004; 24(3):421-8.
- Rye KA, Bursill CA, Lambert G, et al. The metabolism and antiatherogenic properties of HDL. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S195–200.
- Saito Y. Is cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency atherogenic in familial hypercholesterolemia. *Intern Med* 1998; 37(6):495-6.
- Sakuma N, Yoshikawa M, Hibino T, et al. HDL3 exerts a more powerful antiperoxidative and protective effect against peroxidative modification of LDL than HDL2 does. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2002; 48(4):278-82.
- Salonen JT, Salonen R, Seppänen K, et al. HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men. *Circulation* 1991; 84(1):129-39.
- Saougos VG, Tambaki AP, Kalogirou M, et al. Differential effect of hypolipidemic drugs on lipoprotein-associated phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(10):2236-43.
- Schaefer EJ, Asztalos BF. Where are we with high-density lipoprotein raising and inhibition of cholesteryl ester transfer for heart disease risk reduction? *Curr Opin Cardiol* 2007; 22(4):373-8.
- Schmitz G, Buechler C. ABCA1: regulation, trafficking and association with heteromeric proteins. *Ann Med* 2002; 34(5):334-47.
- Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2012; 367(22):2089-99.
- Schwartz GG, Olsson AG, Ballantyne CM, et al. Rationale and design of the dal-OUTCOMES trial: Efficacy and safety of dalcetrapib in patients with recent acute coronary syndrome. *Am Heart J* 2009; 158(6):896-901. e3.
- Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995; 96(6):3005-8.
- Sethi AA, Amar M, Shamburek RD, et al. Apolipoprotein AI mimetic peptides: possible new agents for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* 2007; 8(3):201-12.
- Shah A, Rader DJ, Millar JS. The effect of PPAR-alpha agonism on apolipoprotein metabolism in humans. *Atherosclerosis* 2010; 210(1):35-40.
- Sharma RK, Singh VN, Reddy HK. Thinking beyond low-density lipoprotein cholesterol: strategies to further reduce cardio-vascular risk. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5:793-9.

Shaw JA, Bobik A, Murphy A, et al. Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ Res* 2008; 103(10):1084-91.

Sherman CB, Peterson SJ, Frishman WH. Apolipoprotein A-I mimetic peptides: a potential new therapy for the prevention of atherosclerosis. *Cardiol Rev* 2010; 18(3):141-7.

Shinkai H. Cholesteryl ester transfer-protein modulator and inhibitors and their potential for the treatment of cardiovascular diseases. *Vasc Health Risk Manag* 2012; 8:323-31.

Shiroma EJ, Lee IM. Physical activity and cardiovascular health: Lessons learned from epidemiological studies across age, gender, and race/ethnicity. *Circulation* 2010; 122(7):743-52.

Simic B, Hermann M, Shaw SG, et al. Torcetrapib impairs endothelial function in hypertension. *Eur Heart J* 2012; 33(13):1615-24.

Singh IM, Shishehbor MH, Ansell BJ. High-density lipoprotein as a therapeutic target: A systematic review. *JAMA* 2007; 298(7):786-98.

Singh K, Chander R, Kapoor NK. High density lipoprotein subclasses inhibit low-density lipoprotein oxidation. *Indian J Biochem Biophys* 1997; 34(3):313-8.

Smith JD, Le Goff W, Settle M, et al. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 2004; 45(4):635-44.

Smith JD. Dysfunctional HDL as a diagnostic and therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(2):151-5.

Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, et al. Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation* 2010; 121(1):110-22.

Spieker LE, Sudano I, Hürlimann D, et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 2002; 105(12):1399-402.

Srivastava N. ATP-binding cassette transporter A1: key roles in cellular lipid transport and atherosclerosis. *Mol Cell Biochem* 2002; 237(1-2):155-64.

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, et al. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998; 98(19):2088-93.

Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, et al. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991; 325(6):373-81.

Steinberg D. Oxidative modification of LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Geriatr Cardiol* 1993; 2(5):38-41.

Steiner G. Fibrates and coronary risk reduction. *Atherosclerosis* 2005; 182(2):199-207.

Sviridov D, Mukhamedova N, Remaley AT, et al. Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: how much versus how good. *J Atheroscler Thromb* 2008; 15(2):52-62.

Sweetnam PM, Bolton CH, Yarnell JW, et al. Associations of the HDL2 and HDL3 cholesterol subfractions with the development of ischemic heart disease in British men. The Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease Studies. *Circulation* 1994; 90(2):769-74.

Szostak J, Laurant P. The forgotten face of regular physical exercise: A 'natural' anti-atherogenic activity. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121(3):91-106.

Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC, et al. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 164(1):1-13.

- Tall AR. Plasma high density lipoproteins: Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 1990; 86(2):379-84.
- Tardif JC, Grégoire J, L'Allier PL, et al. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 297(15):1675-82.
- Tavintharan S, Kashyap ML. The benefits of niacin in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2001; 3(1):74-82.
- Tavintharan S, Lim SC, Sum CF. Effects of niacin on cell adhesion and early atherogenesis: biochemical and functional findings in endothelial cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 104(3):206-10.
- Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010; 466(7307):707-13.
- Thompson PD, Cullinane EM, Sady SP, et al. Modest changes in high-density lipoprotein concentration and metabolism with prolonged exercise training. *Circulation* 1988; 78(1):25-34.
- Thompson PD, Yurgalevitch SM, Flynn MM, et al. Effect of prolonged exercise training without weight loss on high density lipoprotein metabolism in overweight men. *Metabolism* 1997; 46(2):217-23.
- Tolle M, Pawlak A, Schuchardt M, et al. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(8):1542-8.
- Tomás M, Sentí M, García-Faria F, et al. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(9):2113-9.
- Ton VK, Martin SS, Blumenthal RS, et al. Comparing the new European cardiovascular disease prevention guideline with prior American Heart Association guidelines: An editorial review. *Clin Cardiol* 2013; 36(5):E1-6.
- Tracy RP. Thrombin, inflammation, and cardiovascular disease: an epidemiologic perspective. *Chest* 2003; 124(3 Suppl):49S-57S.
- Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(10):1732-8.
- Tseng ML, Ho CC, Chen SC, et al. A simple method for increasing levels of high-density lipoprotein cholesterol: a pilot study of combination aerobic- and resistance exercise training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2013; 23(3):271-81.
- Tsimihodimos V, Kakafika A, Tambaki AP, et al. Fenofibrate induces HDL-associated PAF-AH but attenuates enzyme activity associated with apoB-containing lipoproteins. *J Lipid Res* 2003; 44(5):927-34.
- U, Yaari S, Medalie JH. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. A 21-year follow-up of 8000 men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(1):107-13.
- Vaisar T, Pennathur S, Green PS, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 2007; 117(3):746-56.
- van der Steeg WA, Holme I, Boekholdt SM, et al. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for cardiovascular risk: the IDEAL and EPIC-Norfolk studies. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(6):634-42.
- Vega GL, Grundy SM. Effect of statins on metabolism of apo-B-containing lipoproteins in hypertriglyceridemic men. *Am J Cardiol* 1998; 81(4A):36B-42B.
- Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(22):12097-102.

Vergeer M, Bots ML, van Leuven SI, et al. Cholesteryl ester transfer protein inhibitor torcetrapib and off-target toxicity: A pooled analysis of the rating atherosclerotic disease change by imaging with a new CETP inhibitor (RADIANCE) trials. *Circulation* 2008; 118(24):2515-22.

von Eckardstein A, Huang Y, Wu S, et al. Lipoproteins containing apolipoprotein A-IV but not apolipoprotein A-I take up and esterify cell-derived cholesterol in plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(10):1755-63.

von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High-density lipoprotein and atherosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(1):13-27.

von Eckardstein A, Sibling RA. Possible contributions of lipoproteins and cholesterol to the pathogenesis of diabetes mellitus type 2. *Curr Opin Lipidol* 2011 ;22(1):26-32.

Waksman R, Torguson R, Kent KM, et al. A first-in-man, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and feasibility of autologous delipidated high-density lipoprotein plasma infusions in patients with acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(24):2727-35.

Wang N, Tall AR. Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(7):1178-84.

Wang N, Silver DL, Thiele C, et al. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem* 2001; 276(26):23742-7.

Wang, M, Briggs, MR. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem Rev* 2004; 104(1):119-37.

Warnholtz A, Wild P, Ostad MA, et al. Effects of oral niacin on endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: results of the randomized, double-blind, placebo-controlled INEF study. *Atherosclerosis* 2009; 204(1):216-21.

Watson AD, Berliner JA, Hama SY, et al. Protective effect of high-density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidised low-density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96(6):2882-891.

West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998; 97(15):1440-5.

Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27(1):1-10.

Westphal S, Borucki K, Taneva E, et al. Extended-release niacin raises adiponectin and leptin. *Atherosclerosis* 2007; 193(2):361-5.

Williams PT, Feldman DE. Prospective study of coronary heart disease vs. HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort. *Atherosclerosis* 2011; 214(1):196-202.

Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, et al. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 2000; 43(4):527-50.

Wu BJ, Yan L, Charlton F, et al. Evidence that niacin inhibits acute vascular inflammation and improves endothelial dysfunction independent of changes in plasma lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(5):968-75.

Wu ZH, Zhao SP. Niacin promotes cholesterol efflux through stimulation of the PPARgamma-LXRalpha-ABCA1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Pharmacology* 2009; 84(5):282-7.

Yamashita S, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, et al. Molecular mechanisms of HDL-cholesterol elevation by statins and its effects on HDL functions. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17(5):436-51.

Yu L, York J, von Bergmann K, et al. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003; 278(18):15565-70.

Yu S, Yarnell JW, Sweetnam P, et al. High density lipoprotein subfractions and the risk of coronary heart disease: 9-years follow-up in the Caerphilly Study. *Atherosclerosis* 2003; 166(2):331-8.

Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001; 7(7):853-7.

Zambon A, Gervois P, Pauletto P, et al. Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: clinical and experimental evidence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(5):977-86.

Zhang B, Kawachi E, Miura S, et al. Therapeutic approaches to the regulation of metabolism of high-density lipoprotein. *Circ J* 2013; 77(11):2651-63.

Zhong S, Sharp DS, Grove JS, et al. Increased coronary heart disease in Japanese- American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest* 1996; 97(12):2917-23.

Capítulo 3

Objetivos

Objectivos gerais e específicos

Na sequência do já abordado nos capítulos introdutórios, partimos para este trabalho com alguns dados nos quais assenta a necessidade da investigação que nos propusemos fazer, e que se poderão resumir através dos seguintes pontos: a) as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte prematura e/ou de incapacitação em muitos países do Mundo, incluindo na Europa, e também cada vez mais em países em desenvolvimento; b) a dislipidemia é um dos factores de risco *major* para a doença CV e a acumulação de colesterol e/ou as modificações das lipoproteínas que o transportam estão entre os aspectos chave da fisiopatologia da aterosclerose; c) a redução do c-HDL tem sido associada a um aumento do risco de DCV, e dados epidemiológicos colocam-no com um dos preditores independentes de desenvolvimento de doença CV; d) a redução do c-Total e do c-LDL através de terapêutica antidislipidémica, nomeadamente através das estatinas, tem sido incapaz de eliminar o risco CV, existindo um risco CV residual (mas muito preocupante) que está associado a valores reduzidos de c-HDL, o que suscitou a necessidade de encontrar ferramentas que sejam capazes de modular de forma benéfica; e) o arsenal terapêutico antidislipidémico actualmente disponível e em utilização clínica tem um efeito moderado, senão mesmo reduzido, sobre o c-HDL, e os novos compostos testados em ensaios clínicos foram incapazes de demonstrar o impacto esperado a nível da redução da mortalidade por DCV, não obstante o aumento significativo dos teores de c-HDL; f) o conhecimento actual aponta para a necessidade de conhecer melhor as HDL e de encontrar formas de não apenas aumentar os seus conteúdos séricos mas, sobretudo, entender o conceito de HDL disfuncional, saber se tem um relacionamento com a doença CV e com outros mediadores da aterogénese em populações de risco, para que posteriormente seja possível modular a sua funcionalidade e assim melhorar os *endpoints* clínicos de morbidade e mortalidade por DCV.

O nosso trabalho pretende constituir-se como mais um contributo para a melhoria do conhecimento da relevância das HDL e da sua funcionalidade a nível da doença cardiovascular aterogénica. Como tal, os principais objectivos do trabalho foram perceber o peso relativo das subpopulações de HDL na determinação do perfil cardiometabólico e a sua associação/correlação com outros mediadores (marcadores) do fenómeno aterogénico em populações com factores de risco para a DCV.

Como forma de atingir estes objectivos gerais, foram identificados os seguintes objectivos específicos:

i) – Partindo do princípio de que existem potenciais diferenças de género e do estado de menopausa (antes versus pós) em termos de perfil de risco CV, que podem ter uma associação com o c-HDL, pretendeu-se avaliar a influência do género e da menopausa no perfil cardiometabólico de uma população de voluntários sem doença cardiovascular diagnosticada, usando marcadores tradicionais e não-tradicionais, incluindo as subpopulações de HDL.

ii) – Considerando que a diabetes é uma doença com uma clara associação a perturbações cardiovasculares, e que os doentes diabéticos apresentam um risco aumentado para a DCV, pretendeu-se seguidamente avaliar a influência do género e da menopausa no perfil cardiometabólico de uma população diabética, usando marcadores tradicionais mas também novos marcadores não-tradicionais relacionados com o perfil lipídico, oxidativo e inflamatório.

iii) – Face ao aumento do risco CV precoce que os doentes com esclerose múltipla parecem apresentar, foi nosso objectivo caracterizar uma população de jovens adultos com EM não apenas em termos de factores de risco CV clássicos mas, acima de tudo, usando possíveis novos biomarcadores e, em comparação com indivíduos controlo, identificar os marcadores potencialmente mais relevantes e estudar a sua possível correlação com a actividade clínica da doença.

iv) – Por fim, pretendeu-se estudar em doentes dislipidémicos, com factores de risco para a DCV, mas conteúdos normalizados de c-LDL (actualmente designados de doentes com risco CV residual), a influência de baixos níveis de c-HDL e/ou elevados de TGs no perfil cardiometabólico, utilizando marcadores tradicionais e não-tradicionais, incluindo as subpopulações de HDL, as LDL oxidadas e mediadores inflamatórios e de angiogénese.

Se, como à partida nos era sugerido pelo conhecimento existente, as subpopulações de HDL apresentarem uma implicação importante no perfil cardiometabólico neste tipo de populações, designadamente por associação com marcadores estabelecidos de risco para a DCV e/ou com marcadores emergentes, este trabalho poderá ter como objectivo mais ambicioso a sugestão de algumas estratégias para melhor abordagem clínica e/ou terapêutica deste tipo de doentes com risco cardiovascular residual.

PARTE II

TRABALHO EXPERIMENTAL

Capítulo 4

Influência do género e menopausa no perfil cardiometabólico de indivíduos sem doença cardiovascular diagnosticada

Publicado sob o formato:

Mascarenhas-Melo F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Ribeiro S, Rocha-Pereira P, Cotterill E, Teixeira F, Reis F. Markers of increased cardiovascular risk in postmenopausal women: focus on oxidized-LDL and HDL subpopulations. *Disease Markers* 2013; 35(2):85-96.

4.1 – Introdução

A doença cardiovascular (DCV) é um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo e a principal causa de morte em Portugal e na maioria dos países industrializados e em desenvolvimento (Barr e col., 2007; Cortez-Dias e col., 2010). Os estrogénios endógenos parecem prevenir as doenças cardiovasculares em mulheres antes da menopausa, comparativamente aos homens da mesma idade; após a menopausa, com a consequente perda dos efeitos hormonais, as diferenças no risco para DCV com base no género tornam-se reduzidas (Leuzzi e col., 2012), mas as causas exactas deste processo continuam por elucidar. Embora estudos anteriores já tenham destacado os efeitos dos estrogénios, nenhuma evidência conclusiva provou o seu papel na redução da incidência de doenças cardiovasculares (Kaushik e col., 2010), e alguns estudos indicam mesmo que os efeitos cardiovasculares usualmente atribuídos à menopausa são meramente uma consequência da idade avançada das mulheres nesta fase (Casiglia e col., 2008; Smulyan e col., 2001). Assim, torna-se claro que mais estudos sejam necessários para compreender a exacta influência do género e da menopausa no risco cardiovascular (RCV). Para além disso, parece ser imperativo desenvolver técnicas mais flexíveis, utilizando não só os marcadores clássicos de DCV, mas também novos marcadores "não tradicionais", que têm sido cada vez mais associados a esta condição.

A inflamação crónica é actualmente vista como um factor chave no desenvolvimento da aterosclerose, contribuindo para aumentar o RCV global nas populações com DCV. Um desequilíbrio inflamatório, tal como o resultante do aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), e/ou a redução dos mediadores anti-inflamatórios e antiaterogénicos, tal como a adiponectina, tem sido considerado um factor chave para o aumento do RCV em algumas patologias (Mangge e col., 2010; Huang e col., 2010) e, como tal, merece ainda mais atenção nas mulheres em fase de menopausa. Importância semelhante é também atribuída ao fenómeno da angiogénese, sendo o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) um recente biomarcador e que tem vindo a ganhar cada vez mais importância (Girardi e col., 2010).

A oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-ox) está associada à doença arterial coronária (DAC), uma vez que promove um dos passos fundamentais do aparecimento e evolução da aterosclerose, incluindo a estimulação da infiltração de monócitos e a migração e proliferação de células do músculo liso vascular; inversamente, os níveis elevados de lipoproteínas de alta densidade (HDL) evitam o desenvolvimento da aterosclerose e da DAC, principalmente devido ao transporte reverso do colesterol e à inibição da oxidação das LDL (Mertens e col., 2001). A funcionalidade, para além da quantidade, das lipoproteínas parece poder desempenhar um papel crucial no desenvolvimento e progressão da aterosclerose.

A paraoxonase 1 (PON1) é uma enzima contida nas HDL com propriedades antiaterogénicas e antioxidantes, incluindo a protecção contra a oxidação das LDL (Mackness e col., 2004). Na verdade, as LDL-ox e o c-HDL são antagonistas no desenvolvimento da DCV (Girardi e col., 2010). Vários estudos têm mostrado uma forte correlação negativa entre os níveis de c-HDL e o desenvolvimento da aterosclerose, mas o seu papel na determinação do RCV em função do género e da fase menstrual continua por esclarecer (Mahdy Ali e col., 2012; Redondo e col., 2011). Descobertas recentes sugerem que monitorizar o tipo de partículas de HDL (que transportam proteínas e/ou lípidos distintos e específicos e que são diferenciadas pela sua densidade e tamanho - grandes, intermédias e pequenas), em vez da sua quantidade total, é uma forma mais correcta de determinar o risco cardiovascular, sugerindo que diferentes subpopulações podem ter um papel diferente no transporte reverso do colesterol e na protecção antiaterogénica (Asztalos e col., 2000). De facto, alguns estudos recentes têm constatado que os níveis de HDL grandes estão reduzidos em pacientes com DAC comparados com indivíduos saudáveis e que estão inversamente relacionados tanto com a gravidade da doença como com a progressão das lesões coronárias (Pirillo e col., 2013).

Este estudo teve como objectivo avaliar a influência do género e da menopausa no perfil cardiometabólico de uma população de voluntários sem doença cardiovascular diagnosticada, usando marcadores tradicionais e não-tradicionais.

4.2 – População e métodos

4.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas

Cento e vinte e quatro voluntários, dos quais 56 homens e 68 mulheres (48 em pré e 20 em pós-menopausa), com idades compreendidas entre os 21 e os 75 anos, foram recrutados aleatoriamente durante a realização de testes laboratoriais de rotina num laboratório de análises clínicas (Laboratório de Análises Clínicas Soares & Figueiredo, de Viseu). Os voluntários foram seleccionados depois de não expressarem qualquer diagnóstico ou toma de medicação para doenças cardiovasculares, nem história familiar de doenças cardiovasculares. Foi obtido o consentimento informado escrito por parte de todos os voluntários, que leram e assinaram o questionário protocolado. Os participantes declararam não tomar esteróides exógenos, nem qualquer outra medicação. O estado de menopausa (mulheres pré e pós-menopausa) foi referido durante as entrevistas e registado no questionário. Esta avaliação baseou-se na definição da Organização Mundial de Saúde, que considera o estado de pós-menopausa como a ausência de menstruação por um período de pelo menos 12 meses. A duração média da menopausa na nossa amostra é de $11,9 \pm 1,6$ anos. Nenhum caso de menopausa cirúrgica foi incluído. As mulheres grávidas e/ou em amamentação foram excluídas deste estudo, bem como os voluntários com idade inferior a 16 e superior a 75 anos. Este estudo foi realizado de acordo com o código de ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsínquia) e recebeu autorização do comité de ética local.

4.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue

Os seguintes dados foram obtidos para cada indivíduo: peso e altura (sem sapatos e vestindo roupa leve), com o objectivo de calcular o índice de massa corporal (IMC), perímetro abdominal e pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), tendo estas sido determinadas na posição sentada após 5 minutos de descanso. As amostras de sangue foram recolhidas por punção venosa, após um período de jejum durante a noite, através de tubos

contendo EDTA e tubos sem anticoagulante, para obtenção de plasma, *buffy-coat* e soro, e foram processadas no prazo de 2 horas após a recolha. As alíquotas foram imediatamente armazenadas a -80°C até serem utilizadas para os diversos ensaios.

4.2.3 – Determinações analíticas

4.2.3.1 – Perfil glicídico e lipídico

As concentrações séricas de colesterol total (c-Total), colesterol-HDL (c-HDL), colesterol-LDL (c-LDL) e triglicérideos (TGs) foram quantificadas num analisador Hitachi 717 (Roche Diagnostics) utilizando métodos laboratoriais convencionais. Os reagentes para c-Total e os kits de TGs foram adquiridos à bioMérieux SA (Lyon, França). Os testes de c-HDL plus e c-LDL plus foram obtidos à F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Roche Diagnostics Division, Basileia, Suíça). Os níveis séricos de glicose foram medidos utilizando um kit comercial de glicose-oxidase (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA). A concentração sérica de LDL-ox foi doseada utilizando um kit de Elisa comercial da Mercodia (Uppsala, Suécia). O colesterol não HDL (c-nHDL) foi calculado através da seguinte fórmula matemática: $c\text{-nHDL} = c\text{-Total} - c\text{-HDL}$.

4.2.3.2 – Subpopulações de HDL

As subpopulações de HDL foram separadas e quantificadas utilizando um kit *Lipoprint* da Quantimetrix Corporation (Redondo Beach, Califórnia, EUA). A técnica envolve um ensaio de electroforese em gel de poliacrilamida e um sistema Lipoprint para aquisição de dados e quantificação das diferentes subpopulações de HDL, em função do tamanho (grandes, intermédias e pequenas) (Figura 4.1). O Sistema Lipoprint baseia-se num processo de electroforese com um gel de poliacrilamida não desnaturante, linear (não-gradiente) (PAGE), para separar as fracções de lipoproteínas e as subfracções em soro ou plasma com base no tamanho. O ensaio utiliza um corante lipofílico que se liga ao colesterol na partícula da lipoproteína antes da electroforese. Os géis de electroforese são submetidos a um scanner para determinar a área relativa de cada subfracção de lipoproteína. A subfracção de colesterol é calculada multiplicando a área relativa de cada subfracção pelo colesterol total da amostra (neste caso, pelo c-HDL total). O Lipoprint pode processar 12 amostras de cada

vez; são colocados 25 μL de soro ou plasma dentro dos tubos de gel, já colocados numa rack própria, e adicionados 300 μL da solução de *Loading Gel*. De seguida, cobre-se os tubos de gel e procede-se à mistura da amostra com o *Loading Gel* invertendo os tubos cerca de 10 vezes. Depois os tubos de gel são colocados na frente de uma preparação de luz onde as amostras irão fotopolimerizar durante 30 minutos. De imediato são inseridos na câmara de electroforese, onde foi previamente colocada uma solução tampão electrolítica, sendo a câmara ligada a uma fonte de energia e a electroforese feita durante um período de 50 minutos. Uma vez completa, os géis são colocados dentro do *scanner* e a área corada dos géis é medida directamente e traduzida nos histogramas finais. O sistema *Lipoprint* de HDL pode separar até dez subfracções de HDL. Essas subfracções são agrupadas em três subclasses principais: HDL grandes, que representam as HDL de 1 a 3, HDL intermédias, que representam as HDL de 4 a 7 e as HDL pequenas que representam as HDL de 8 a 10.

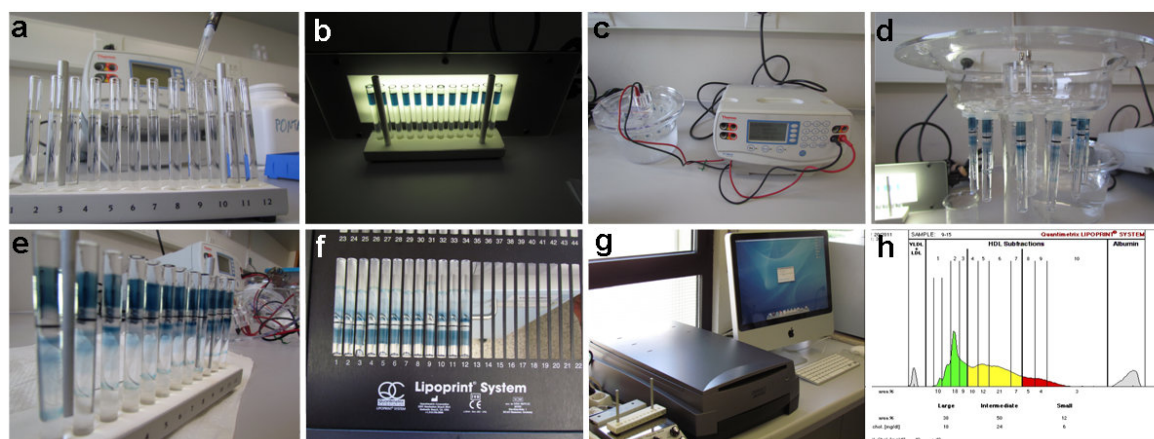


Figura 4.1 – Método *Lipoprint* para separação e quantificação das subpopulações de HDL: a) são colocados 25 μL de soro dentro dos tubos de gel, adicionando de seguida uma solução de *Loading Gel*, colocados numa *rack* própria; b) fotopolimerização das amostras durante 30 minutos, diante de uma preparação de luz; c) os tubos são colocados na câmara de electroforese, onde foi colocada uma solução de tampão electrolítica, sendo a câmara ligada a uma fonte de energia e a electroforese feita durante um período de 50 minutos; d) retiram-se os tubos de gel da câmara de electroforese; e) todos os tubos são bem limpos e secos, para não ficarem com marcas e colocados novamente na *rack* apropriada; f) os tubos de gel são colocados dentro do *scanner*; g) aparelho *Lipoprint* da Quantimetrix Corporation constituído pelo computador com o *software* apropriado e um aparelho de scanner; h) a área corada dos géis é medida directamente e traduzida nos histogramas finais.

4.2.3.3 – Actividade paraoxonase da PON1

A actividade paraoxonase da PON1 foi avaliada espectrofotometricamente através de um ensaio enzimático que consiste na adição de 5 µL de soro a 1 ml de tampão Tris/HCl (100 mmol/L, pH 8,0) contendo 2 mmol/L de CaCl₂ e 5,5 mmol/L de paraoxon (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfosfato; Sigma Chemical Company). A taxa de produção de p-nitrofenol, a 37°C, foi determinada a 412 nm, através da utilização de um espectrofotómetro de registo contínuo (Beckman deuterium UV lamp-68), e expressa em nmol de p-nitrofenol/mL/min (U/mL/min).

4.2.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial

Os teores séricos de adiponectina, TNF-α e VEGF no soro foram avaliados utilizando Kits Elisa Quantikine da R&D Systems (Minneapolis, EUA). Os níveis séricos de moléculas de adesão intercelulares 1 (ICAM-1) foram avaliados utilizando um kit de ELISA da Abcam (Cambridge, Massachusetts, EUA). A concentração sérica de proteína C reactiva de alta sensibilidade (PCR_{hs}) foi avaliada por imunoturbidimetria, usando kits da F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Roche Diagnostics Division, Basileia, Suíça); os níveis séricos de ácido úrico foram determinados num analisador Hitachi 717 (Roche Diagnostics) utilizando métodos padronizados, validados e calibrados para análises clínicas.

4.2.4 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows, versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, EUA). A distribuição das variáveis contínuas foi analisada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov, para avaliar desvios significativos da normalidade. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o t-teste de amostras independentes e o teste de Mann-Whitney, consoante as variáveis seguiam distribuição normal ou não, respectivamente, para cada população em análise. O ajuste das diferenças estatísticas para os factores de confusão (idade e IMC) foi realizado utilizando uma análise de covariância (ANCOVA). A associação entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste de Pearson. Foi considerado estatisticamente significativo um *P* menor que 0,05.

4.3 – Resultados

4.3.1 – Caracterização geral da população

Os dados demográficos e antropométricos dos indivíduos voluntários (homens e mulheres – pré e pós-menopausa) estão resumidos na Tabela 4.1. Cento e vinte e quatro voluntários foram recrutados: 56 homens e 68 mulheres (48 em pré-menopausa e 20 em pós-menopausa). A população masculina apresentou valores significativamente mais elevados de idade e IMC, relativamente à população feminina; deste modo, todos os dados foram analisados depois de feito o ajuste dos resultados para as diferenças de idade e de IMC. Os homens apresentaram valores significativamente mais elevados de perímetro abdominal e de pressão arterial sistólica e diastólica, em relação às mulheres ($p = 0,000$ para todos).

As mulheres em pós-menopausa apresentaram idade e IMC significativamente mais elevados do que as mulheres em pré-menopausa (Tabela 4.1), tendo também sido os restantes dados analisados após o ajuste feito para ambos os parâmetros. As mulheres em pós-menopausa apresentaram valores significativamente superiores de perímetro abdominal e de pressão arterial sistólica e diastólica ($p = 0,000$ para todos).

Tabela 4.1 – Dados demográficos e antropométricos dos grupos de estudo

Parâmetros	População Masculina (n = 56)	População Feminina (n = 68)	P	Pré-menopausa (n = 48)	Pós-menopausa (n = 20)	P
Idade (anos)	53,07 ± 1,90	43,16 ± 1,81	0,000	35,40 ± 1,39	61,80 ± 1,40	0,000
IMC (Kg/m ²)	27,55 ± 0,61	25,28 ± 0,50	0,003	24,51 ± 0,59	27,14 ± 0,81	0,016
P. abdominal (cm)	99,50 ± 1,53	89,16 ± 1,32	0,000*	87,57 ± 1,48	93,08 ± 2,60	0,000*
PAS (mmHg)	141,77 ± 2,57	131,95 ± 2,82	0,000*	123,04 ± 2,59	154,00 ± 4,38	0,000*
PAD (mmHg)	85,36 ± 1,40	82,85 ± 1,51	0,000*	79,74 ± 1,70	90,53 ± 2,41	0,000*
Glicemia (mmol/L)	5,44 ± 0,08	4,94 ± 0,06	0,000*	4,78 ± 0,06	5,33 ± 0,14	0,000*

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *Os valores de P foram ajustados para a idade e para o IMC. IMC, índice de massa corporal; P. abdominal, perímetro abdominal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica.

4.3.2 – Perfis glicídico e lipídico clássicos

Os homens apresentaram valores de glicemia em jejum significativamente superiores aos encontrados nas mulheres ($p = 0,000$). Analisando o perfil lipídico clássico, foram encontradas várias diferenças significativas entre homens e mulheres: (1) níveis séricos de c-Total ($p = 0,001$), TGs e c-LDL ($p = 0,000$, para ambos) elevados, e (2) de c-HDL reduzidos na população masculina ($p = 0,000$) [Tabela 4.2 e Figura 4.2 (a) e (c)]. Também se verificaram níveis significativamente mais elevados de c-nHDL, c-Total/c-HDL e c-LDL/c-HDL no grupo dos homens ($p = 0,000$, para todos). Apesar destas diferenças, deve salientar-se que, com exceção do c-Total (ligeiramente acima dos limites recomendáveis para indivíduos sem patologia CV), todos estes parâmetros estavam dentro da faixa considerada normal (Tabela 4.2).

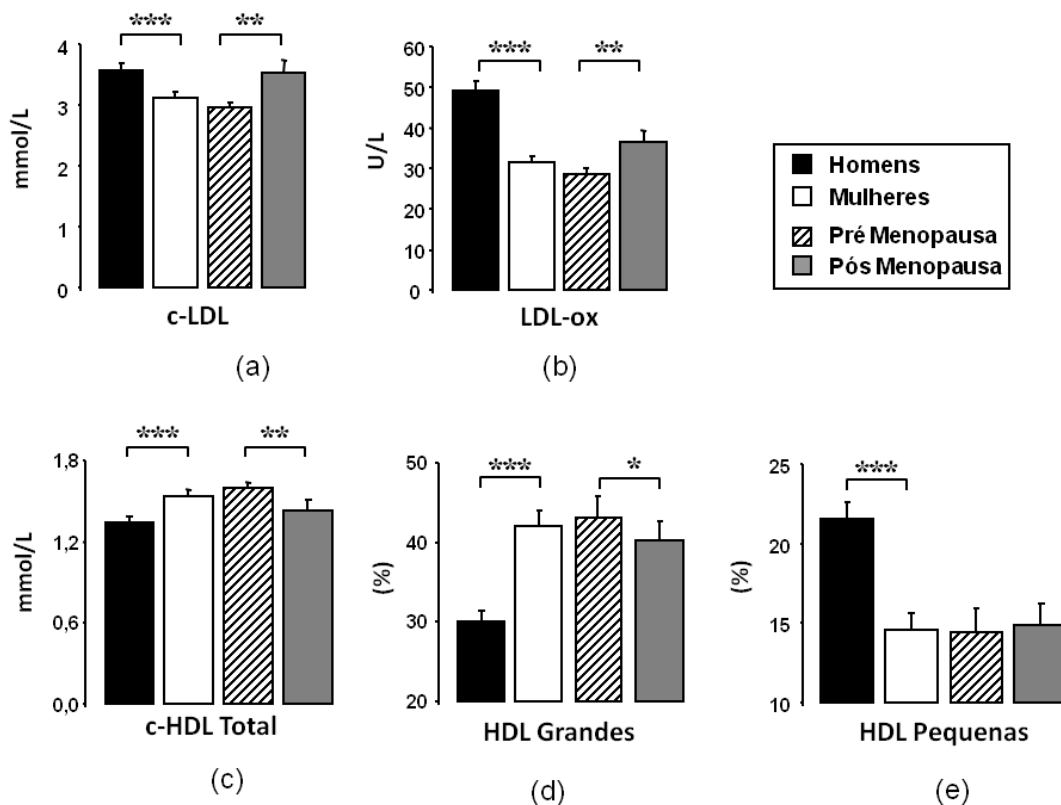


Figura 4.2 – Concentração sérica de c-LDL (a), LDL-ox (b), c-HDL total (c) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (d) e pequenas (e) nas populações em estudo. Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. Valores de P ajustados para a idade e IMC. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$.

Quando analisado só o grupo das mulheres, constata-se que com a entrada na menopausa existe um aumento significativo da glicemia ($p = 0,000$) (Tabela 4.1). Para além disso, foram ainda observadas as seguintes diferenças: (1) os níveis séricos de c-LDL foram significativamente mais elevados nas mulheres pós-menopausa ($p = 0,005$), enquanto (2) os níveis de c-HDL foram significativamente inferiores ($p = 0,001$) [Tabela 4.2 e Figuras 4.2 (a) e (c), respectivamente]. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em relação aos níveis de c-Total e TGs (Tabela 4.2).

4.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1

O conteúdo sérico de LDL-ox foi significativamente superior no grupo dos homens e das mulheres pós-menopausa ($p = 0,000$ e $p = 0,009$, respectivamente) [Tabela 4.2 e Figura 4.2 (b)]. A concentração das subpopulações mais protectoras de HDL (HDL grandes) foi significativamente superior nas mulheres (em comparação aos homens) e nas mulheres em pré-menopausa (relativamente às mulheres em pós-menopausa) ($p = 0,000$ e $p = 0,044$, respectivamente) [Tabela 4.2 e Figura 4.2 (d)]. Relativamente às subpopulações “menos protectoras” de HDL (HDL pequenas) verificou-se uma diminuição significativa da sua percentagem no grupo das mulheres relativamente aos homens, sem alterações entre os estados de pré e pós-menopausa nas mulheres [Tabela 4.2 e Figura 4.2 (e)]. O perfil cardiometabólico menos favorável nos homens também se manifesta pela maior proporção de LDL-ox/c-LDL ($p = 0,000$), enquanto nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos de pré e pós-menopausa (Tabela 4.2). Relativamente à actividade da PON1, esta foi menor na população feminina ($p = 0,008$) quando comparada com a masculina, sem alterações entre os subgrupos de pré e pós-menopausa nas mulheres (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Perfil lipídico dos grupos de estudo

Parâmetros	População Masculina (n = 56)	População Feminina (n = 68)	P*	Pré-menopausa (n = 48)	Pós-menopausa (n = 20)	P*
c-Total (mmol/L)	5,53 ± 0,13	5,16 ± 0,10	0,001	4,99 ± 0,10	5,55 ± 0,21	0,063
TGs (mmol/L)	1,29 ± 0,08	1,00 ± 0,05	0,000	0,93 ± 0,06	1,18 ± 0,11	0,145
c-LDL (mmol/L)	3,58 ± 0,12	3,13 ± 0,09	0,000	2,96 ± 0,09	3,54 ± 0,20	0,005
LDL-ox (U/L)	49,21 ± 2,29	31,42 ± 1,50	0,000	28,51 ± 1,44	36,46 ± 2,98	0,009
LDL-ox/c-LDL	13,69 ± 0,50	9,95 ± 0,31	0,000	9,66 ± 0,41	10,43 ± 0,46	0,352
c-HDL (mmol/L)	1,34 ± 0,05	1,54 ± 0,04	0,000	1,59 ± 0,05	1,43 ± 0,08	0,001
HDL grandes (%)	30,10 ± 1,32	42,11 ± 1,92	0,000	43,11 ± 2,67	40,27 ± 2,41	0,044
HDL interméd. (%)	48,38 ± 0,67	43,22 ± 1,16	0,000	42,35 ± 1,49	44,82 ± 1,81	0,092
HDL pequenas (%)	21,53 ± 1,07	14,61 ± 1,03	0,000	14,46 ± 1,43	14,88 ± 1,33	0,338
c-nHDL (mmol/L)	4,19 ± 0,13	3,62 ± 0,10	0,000	3,40 ± 0,10	4,12 ± 0,22	0,002
c-Total/c-HDL	4,38 ± 0,17	3,56 ± 0,14	0,000	3,31 ± 0,13	4,16 ± 0,34	0,000
c-LDL/c-HDL	2,86 ± 0,14	2,21 ± 0,12	0,000	2,00 ± 0,11	2,70 ± 0,28	0,000
PON1 (U/mL/min)	513,96 ± 17,93	441,57 ± 16,09	0,008	429,63 ± 18,66	470,22 ± 31,27	0,274

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *Os valores de P foram ajustados para a idade e IMC. c-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade; c-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; LDL-ox, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas; PON1, paraoxonase 1; TGs, triglicerídeos; c-Total, colesterol total.

4.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogênese e lesão endotelial

Os homens apresentavam níveis séricos superiores de TNF- α ($p = 0,000$) e inferiores de adiponectina ($p = 0,015$) em relação às mulheres (Tabela 4.3); nestes parâmetros não se verificaram alterações entre os subgrupos de pré e pós-menopausa das mulheres. Os níveis séricos de PCRhs foram mais elevados nas mulheres ($p = 0,019$) em relação aos homens e também nas mulheres em pós-menopausa ($p = 0,002$) em relação às mulheres em pré-menopausa. A concentração sérica de ácido úrico foi maior nos homens ($p = 0,000$) relativamente às mulheres, e não foram encontradas diferenças entre as mulheres em pré e pós-menopausa. Os valores séricos do marcador de lesão endotelial (ICAM-1) não mostraram diferenças entre os diferentes grupos em estudo. Os níveis séricos de VEGF foram significativamente maiores nas mulheres em pós-menopausa ($p = 0,047$), quando

comparadas com as pré-menopáusicas, não havendo diferenças entre a população masculina e feminina (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Marcadores de inflamação, angiogénese e lesão endotelial dos grupos de estudo

Parâmetros	População Masculina (n = 56)	População Feminina (n = 68)	P*	Pré-menopausa (n = 48)	Pós-menopausa (n = 20)	P*
PCRhs (µg/mL)	0,24 ± 0,04	0,33 ± 0,09	0,019	0,22 ± 0,08	0,51 ± 0,20	0,002
VEGF (pg/mL)	403,99 ± 56,57	325,82 ± 34,82	0,143	316,85 ± 41,15	342,27 ± 65,08	0,047
TNF-α (pg/mL)	4,23 ± 0,50	1,81 ± 0,27	0,000	1,74 ± 0,41	1,93 ± 0,22	0,135
Adiponectina (µg/mL)	9,88 ± 0,91	10,87 ± 0,93	0,015	10,88 ± 1,15	10,85 ± 1,61	0,195
ICAM-1 (ng/mL)	566,64 ± 177,37	555,06 ± 80,02	0,912	581,69 ± 125,52	524,63 ± 98,49	0,710
Ác. Úrico (mmol/L)	0,36 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,000	0,24 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,130

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *Os valores de P foram ajustados para a idade e IMC. PCRhs, proteína C reactiva de alta sensibilidade; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; TNF-α, factor de necrose tumoral alfa; VEGF, factor de crescimento vascular endotelial; Ác. Úrico, ácido úrico.

4.3.5 – Análises de correlações entre marcadores

4.3.5.1 – Correlações entre LDL-ox e subpopulações de HDL

Foi encontrada uma correlação significativa e negativa entre as LDL-ox e as HDL grandes no grupo dos homens, das mulheres [Figura 4.3 (b1)] e das mulheres em pós-menopausa [Figura 4.3 (b2)] ($r = -0,288$, $p = 0,045$; $r = -0,366$, $p = 0,008$; $r = -0,570$, $p = 0,011$, respectivamente); uma correlação significativa e positiva também foi estabelecida entre as LDL-ox e as HDL pequenas, para os mesmos grupos mencionados anteriormente ($r = 0,306$, $p = 0,033$; $r = 0,324$, $p = 0,020$; $r = 0,579$, $p = 0,009$, respectivamente) [Figura 4.3 (c1) e (c2), respectivamente]. Não foram encontradas correlações significativas entre estes parâmetros no grupo de mulheres em pré-menopausa [Figura 4.3 (b2) e (c2), respectivamente]. Para além disso, o conteúdo de c-HDL total não mostrou qualquer correlação com os níveis de LDL-ox em nenhum dos grupos em estudo [Figura 4.3 (a1) e (a2)].

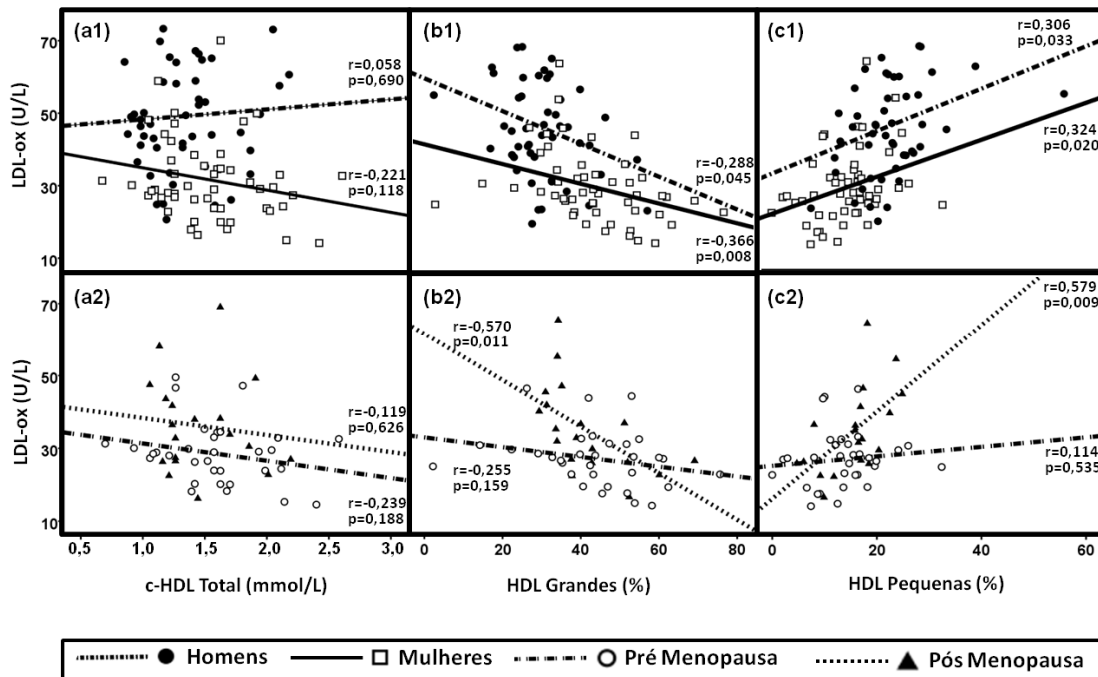


Figura 4.3 – Correlações entre as LDL-ox com c-HDL total (a), HDL grandes (b) e HDL pequenas (c). Painele superior – influência do género (homens vs mulheres); Painele inferior – influência da menopausa (pré- vs pós-menopausa).

4.3.5.2 – Correlações entre TNF- α e parâmetros lipídicos

Verificou-se uma correlação significativa e negativa entre os níveis de TNF- α e de c-HDL total na população feminina ($r = -0,345$, $p = 0,013$) [Figura 4.4 (a1)]; relativamente às subpopulações de HDL só se encontraram correlações significativas com o TNF- α na população de mulheres em pós-menopausa: de forma inversa com as HDL grandes ($r = -0,489$, $p = 0,033$) e de forma directa com as HDL pequenas ($r = 0,658$, $p = 0,002$) [Figura 4.4 (b2) e (c2)]. Em relação aos níveis séricos de c-LDL e de LDL-ox, o primeiro parâmetro mostrou uma correlação positiva e significativa com a concentração sérica de TNF- α no grupo das mulheres ($r = 0,283$, $p = 0,044$) [Figura 4.5 (b1)], sem correlações nos restantes grupos de estudo; os níveis séricos de LDL-ox apresentaram uma correlação positiva e significativa com os valores de TNF- α nos homens e nas mulheres em pós-menopausa ($r = 0,612$, $p = 0,000$ e $r = 0,570$, $p = 0,011$, respectivamente) [Figura 4.5 (a1) e (a2)].

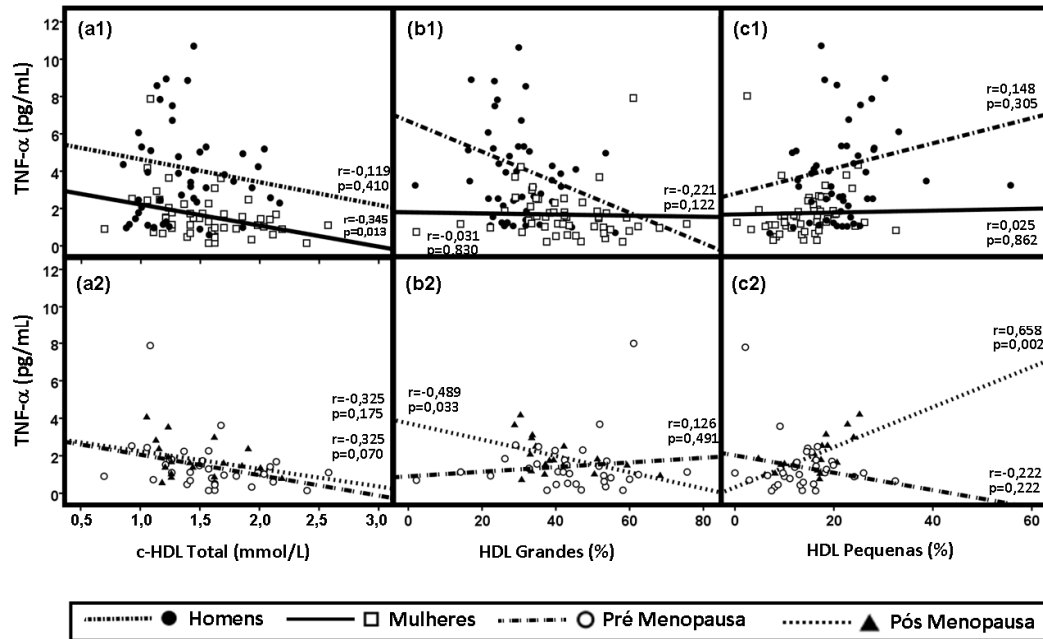


Figura 4.4 – Correlações do TNF-α com o c-HDL total (a), HDL grandes (b) e HDL pequenas (c). Painel superior – influência do gênero (homens vs mulheres); Painel inferior – influência da menopausa (pré- vs pós-menopausa).

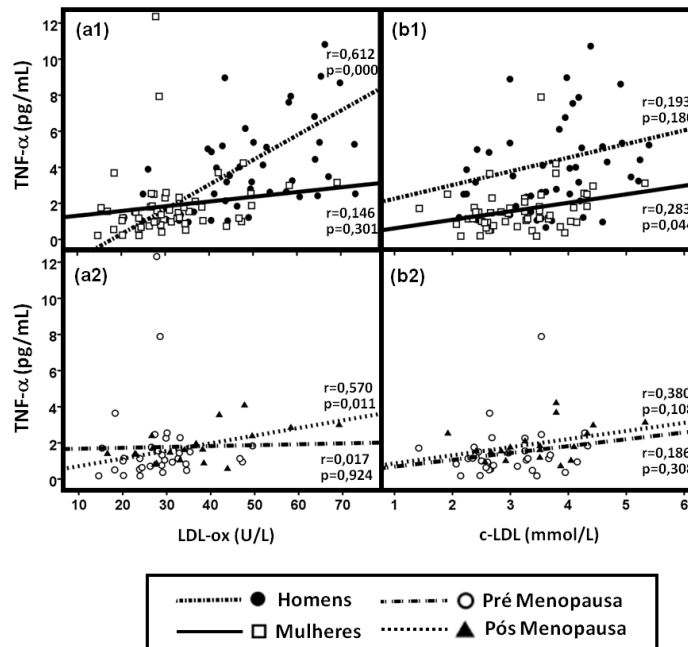


Figura 4.5 – Correlações do TNF-α com LDL-ox (a) e c-LDL (b). Painel superior – influência do gênero (homens vs mulheres); Painel inferior – influência da menopausa (pré- vs pós-menopausa).

4.4 – Discussão e conclusão

O principal resultado desta parte do estudo é que os homens e as mulheres em pós-menopausa apresentam um perfil cardiometabólico menos favorável, que parece ser melhor identificado se analisado em termos de marcadores não-tradicionais. Entre os géneros, o perfil mais nefasto nos homens está mascarado por um perfil lipídico clássico quase normal, reforçando a importância de recorrer a novos marcadores. De facto, embora os conteúdos em c-Total, c-LDL e TGs tenham sido significativamente mais elevados nos homens, e os de c-HDL significativamente menores (relativamente aos das mulheres), todos os valores estavam dentro dos limites considerados normais. Uma vez que estudos anteriores descreveram a existência de uma variação no perfil lipídico ao longo do tempo de acordo com a idade (em ambos os sexos) (Singh e col., 2012; Dalpino e col., 2012), os nossos resultados estatísticos que comparam os diferentes grupos foram obtidos após o ajuste para a idade, a fim de eliminar este factor de possível confusão. Os homens também apresentaram valores mais elevados do conteúdo sérico de LDL-ox e da razão LDL-ox/c-LDL, bem como menor percentagem das HDL grandes e maior das HDL pequenas, todos estes considerados parâmetros de perfil lipídico não-clássicos. A hiperlipidemia combinada (isto é, níveis elevados de c-LDL e TGs) tem mostrado aumentar o risco de doença cardíaca coronária (DCC) numa extensão muito mais significativa do que c-LDL ou TGs elevados de forma isolada, o que pode ser resultado de um efeito aditivo que potenciará a oxidação das LDL (Manninen e col., 1992). No nosso estudo, apesar de ambos os parâmetros estarem dentro da faixa considerada normal, os homens apresentaram valores superiores de c-LDL e de TGs, bem como um conteúdo mais elevado de LDL-ox. Comparativamente às mulheres, os homens apresentaram também um aumento significativo do IMC, do perímetro abdominal e da glicemia que, aparentemente, também contribuem para os valores elevados de LDL-ox, como já sugerido por outros estudos (Zelzer e col., 2011; Kotani e col., 2012; Maytin e col., 1999). Assim, o ligeiro (mas acoplado) aumento de lípidos e glicose séricos, bem como a obesidade, ainda que dentro dos limites considerados normais, poderá criar uma condição pró-oxidativa

que conduz à oxidação das LDL e das HDL, tal como parece ocorrer na população masculina do nosso estudo.

Enquanto níveis baixos de c-HDL estão associados ao aumento do risco de DAC (Movva e col., 2008), um estudo recente sugere que uma quantidade alta de c-HDL no soro não é sempre igualmente ateroprotectora (Rader e col., 2007). Aliás, tem sido sugerido que um melhor indicador da funcionalidade das HDL pode ser a sua qualidade (Eren e col., 2012; Soran e col., 2012), o que depende do tipo das suas subpopulações (grandes, intermédias e pequenas) e dos seus constituintes, incluindo a actividade da PON1 (Mackness e col., 2004; Mackness e col., 2002). Os nossos resultados estão de acordo com esta teoria: de facto, o perfil benéfico do c-HDL encontrado nas mulheres, em relação aos homens, foi reforçado pelo aumento significativo no teor das HDL grandes e diminuição das HDL pequenas. Assim, os valores de c-HDL nos homens (ainda que dentro dos valores de referência) estão associados a uma tipologia das subpopulações aparentemente menos protectora. Curiosamente, enquanto que não foram encontradas correlações entre o c-HDL total e as LDL-ox quer nos homens quer nas mulheres, verificaram-se correlações significativas entre as LDL-ox e as principais subpopulações de HDL: com as HDL grandes (correlação negativa) e com as HDL pequenas (correlação positiva) em todos os grupos (com excepção do subgrupo das mulheres em pré-menopausa), apoiando assim a ideia de que a tipologia das subpopulações de HDL é um marcador mais relevante do que o tradicional conteúdo total de c-HDL. A PON1, uma enzima contida nas partículas de HDL, tem sido associada a propriedades antioxidantes e antiaterogénicas, e está reduzida em algumas populações de maior risco cardiovascular (Mackness e col., 2004; Mackness e col., 2002). No nosso estudo, as mulheres apresentaram actividade da PON1 inferior, apesar de possuírem níveis de c-HDL superiores; estes dados são contrários a outros estudos onde a actividade da PON1 foi superior nas mulheres (Kleemola e col., 2002). No entanto, a actividade da PON1 é modulada por vários factores, incluindo a dieta, hábitos tabágicos e exercício físico (Thomàs-Moyà e col., 2007, 2006, 2008). Na verdade, como importante factor de risco cardiovascular, o tabagismo também pode modular outros mediadores ou factores envolvidos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incluindo o IMC, a PCRhs, lipoproteínas

oxidadas e c-HDL. Como tal, trabalhos futuros deverão também analisar esta influência. Para além dos marcadores não-tradicionais de perfil lipídico (em particular as LDL-ox e as subpopulações de HDL), os homens também apresentaram um padrão pró-inflamatório, que é um importante contributo para o desenvolvimento da aterogénese. Com efeito, a população masculina apresentou concentrações séricas de TNF- α e de ácido úrico superiores, acompanhadas por níveis de adiponectina inferiores. As concentrações reduzidas de citocinas (incluindo IL-6 e TNF- α) em mulheres têm sido atribuídas ao efeito inibitório dos estrogénios sobre a expressão de genes de marcadores inflamatórios (Ershler e col., 2000; An e col., 1999; Imahara e col., 2005). A distribuição da gordura corporal, tem sido associada a variações dos marcadores inflamatórios relacionadas com o género, incluindo PCRhs, IL-6, TNF- α e adiponectina. De facto, é conhecido que a distribuição de gordura difere entre os géneros, tendo os homens mais gordura visceral e menos gordura subcutânea (Ludescher e col., 2007). No nosso estudo, apesar de os resultados terem sido ajustados ao IMC, não podemos excluir a contribuição da adiposidade visceral abdominal nos homens (que se manifesta por um aumento no perímetro abdominal) para um estado inflamatório mais prejudicial relativamente à população feminina, que incluiu não só níveis de TNF- α superiores, mas também inferiores de adiponectina. A adiponectina é sintetizada principalmente nos adipócitos subcutâneos que existem em maior quantidade nas mulheres, enquanto as citocinas inflamatórias são secretadas principalmente a partir de células não-gordas do tecido adiposo (Fain e col., 2006; Ahonen e col., 2011), o que está de acordo com os nossos dados. De facto, outros autores já sugeriram que o tecido adiposo visceral é responsável pela libertação de factores (incluindo o TNF- α) que inibem a síntese de adiponectina pelos adipócitos subcutâneos (Halleux e col., 2001; Maeda e col., 2001; Matsuzawa e col., 2010). Isto vai de encontro aos nossos resultados que mostram que os homens têm mais tecido adiposo visceral (tal como o maior perímetro abdominal sugere), bem como maior teor de TNF- α e, conseqüentemente, menores níveis de adiponectina. Curiosamente, no grupo das mulheres o TNF- α correlacionou-se significativamente com os teores de c-HDL total (de forma negativa) e com os níveis de c-LDL (de forma positiva), enquanto que na população masculina os valores de TNF- α foram melhor correlacionados

com os níveis de LDL-ox, que também foram significativamente maiores nos homens do que nas mulheres. Estes resultados apontam para que as LDL-ox sejam um bom marcador de risco nos homens e que o dano oxidativo das lipoproteínas esteja associado ao aumento da inflamação. Na verdade, o conteúdo de LDL-ox já tem sido sugerido como um bom marcador de risco para outras situações patológicas (Huang e col., 2008, 2012; Huang e col., 2011).

A inflamação crónica e a disfunção endotelial, observadas em pacientes com aumento do ácido úrico (AU) sérico, são susceptíveis de intervir em mecanismos através dos quais o ácido úrico afecta a estrutura renal (Zoccali e col., 2006), levando ao desenvolvimento de hipertensão (especialmente em jovens) (Feig e col., 2003). Por outro lado, tem sido questionado se o aumento do ácido úrico poderá ser um mecanismo de defesa para contrariar o aumento do stresse oxidativo que está relacionado com a resistência à insulina, inflamação e outros factores de risco que normalmente estão ligados ao aumento das concentrações séricas de AU (Nieto e col., 2000). Muitos estudos mostram uma forte relação entre os níveis séricos de AU e o risco cardiovascular em mulheres, justificando assim atenção para uma avaliação baseada no género. Por outro lado, a síndrome metabólica foi positivamente associada com o aumento de AU, independentemente do género. A obesidade abdominal e a hipertrigliceridemia foram os principais factores associados à hiperuricemia mesmo em normotensos, que podem vir a ter um risco mais elevado para desenvolver hipertensão (Rodrigues e col., 2012). Os nossos resultados estão de acordo com cada uma dessas observações, pois mostram um aumento simultâneo de ácido úrico, triglicédeos, perímetro abdominal e pressão arterial nos homens em relação às mulheres. Se o aumento de ácido úrico nos homens é um mecanismo compensatório de protecção contra a inflamação e oxidação, ou um contribuinte para o agravamento do perfil cardiometabólico, é uma questão que continua por ser esclarecida.

Relativamente à influência da menopausa no perfil cardiometabólico, verificou-se que os marcadores não-tradicionais mais uma vez desempenham um papel chave na distinção entre pré e pós-menopausa. Com efeito, a quantidade relativamente superior de c-LDL e inferior de c-HDL encontrada na pós-menopausa parece ter pouco significado clínico, uma vez que os valores estão dentro dos limites considerados normais; para além disso, não foram

encontradas diferenças no conteúdo de c-Total e de TGs. No entanto, o conteúdo de LDL-ox foi superior e o de HDL grandes inferior em mulheres na pós-menopausa, uma tendência que foi acompanhada por níveis superiores de PCRhs, demonstrando assim a existência de um perfil dislipidémico e pró-inflamatório. Adicionalmente, as mulheres em pós-menopausa apresentaram um aumento significativo do IMC, do perímetro abdominal, da pressão arterial e da glicemia, sem um típico perfil de dislipidemia. Estas tendências parecem ser mais bem expressas por parâmetros não clássicos, tais como as LDL oxidadas (em oposição ao conteúdo de c-LDL normalmente usado) e HDL grandes (em oposição ao teor total de c-HDL). Curiosamente, o conteúdo em LDL-ox não tem correlação com o c-Total em mulheres na pós-menopausa, mas foi significativamente correlacionado com as HDL grandes (inversamente) e com as HDL pequenas (directamente), o que sublinha a importância destes parâmetros na determinação do risco na pós-menopausa. Assim, a menopausa parece causar uma redução nos níveis de c-HDL total mas, principalmente, alterações mais importantes na composição das partículas de HDL. Esta conclusão está de acordo com Eapen e col. (2009) que descreveram uma alteração na distribuição das subpopulações de HDL com a menopausa, havendo uma redução na proporção das grandes, que se pensa serem mais activas no transporte reverso do colesterol (Huang e col., 1995), e um aumento da percentagem das pequenas e mais densas (Stevenson e col., 1993; Li e col., 1996). A análise bioquímica *ex-vivo* de lipoproteínas durante a pré e pós-menopausa sugere que as partículas de HDL na pós-menopausa possuem uma capacidade limitada para a inibição da oxidação das LDL (Zago e col., 2004). Apesar da alteração da composição das partículas de HDL em mulheres na pós-menopausa, não foram encontradas diferenças na actividade da PON1. Tem sido apontado que esta enzima, que se encontra associada às HDL, tem efeitos protectores contra a inflamação da parede arterial e que é capaz de destruir os lípidos biologicamente activos; outros estudos têm relatado anteriormente que a DCC (doença cardíaca coronária) está associada a uma reduzida actividade da PON1 (Laplaud e col., 1998; Durrington e col., 2001). No entanto, no nosso estudo, a actividade da PON1 está inalterada nas mulheres em pós-menopausa, o que está de acordo com dados anteriores de Zago e col. (2004), que também não encontraram diferenças entre as mulheres em pré e pós-menopausa, assim como com o

estudo de Horter e col. (2002), que não conseguiu encontrar qualquer associação significativa entre a DCC e as actividades paraoxonase e arilesterase da PON1 em mulheres pós-menopáusicas.

Níveis de adipocitoquinas têm sido já associados com os estrogénios, o que sugere que a menopausa tem implicações nos mediadores inflamatórios (Hong e col., 2007). No nosso estudo, apesar dos níveis de TNF- α serem superiores nas mulheres em pós-menopausa (em relação às pré-menopáusicas), as diferenças não foram estatisticamente significativas; contudo, foram obtidas correlações significativas com alguns dos marcadores anteriores: uma correlação negativa com as HDL grandes e uma correlação positiva com as HDL pequenas. Surpreendentemente, não foi encontrada nenhuma correlação entre os níveis de TNF- α com os de c-HDL total nem com os conteúdos de c-LDL, que são os parâmetros mais utilizados na prática clínica diária. Nas mulheres em pré-menopausa nenhuma correlação foi encontrada entre o TNF- α e o c-HDL (total ou subpopulações) nem com os níveis de c-LDL (oxidado ou não oxidado), demonstrando assim que os parâmetros não tradicionais ganham especial relevância após a menopausa e são merecedores de mais atenção nas mulheres pós-menopáusicas. No que diz respeito a outros mediadores/marcadores do processo inflamatório, foram encontrados valores significativamente superiores de PCRhs nas mulheres em pós-menopausa. Estudos anteriores sobre a menopausa e a inflamação mostraram que a obesidade está associada a um estado inflamatório que é frequentemente caracterizado por elevados níveis de PCRhs (Arsenault e col., 2009). No nosso estudo, a concentração sérica de PCRhs foi significativamente superior em mulheres em pós-menopausa, que também apresentaram excesso de peso/obesidade. A PCRhs é um importante marcador para esta condição, porque após a menopausa a consequente diminuição dos níveis de estrogénios contribui para um ganho generalizado do peso nas mulheres; para além disso, o aumento do conteúdo em PCRhs, um marcador de inflamação sistémica, está associado ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares, independentemente de outros factores de risco convencionais (Danesh e col., 2004). Assim, parece que a menopausa afecta menos a adiponectina como mediador, mas que as mulheres têm teores mais elevados de adiponectina do que os homens, independentemente do seu

estado menopáusico. Uma associação semelhante foi encontrada para o TNF- α , com as mulheres a apresentarem concentrações significativamente inferiores, quer antes quer após a menopausa.

Os níveis séricos de VEGF foram mais baixos nas mulheres em pré-menopausa do que em pós-menopausa, o que está em desacordo com o estudo de Loucif e col. (2011). É de salientar que nenhum dos indivíduos do nosso estudo estava sob terapêutica hormonal de substituição (THS), o que poderia influenciar os níveis de VEGF, embora alguns estudos publicados sejam contraditórios sobre este efeito (Agrawal e col., 2000; Sumino e col., 2000).

Os dados obtidos sugerem que os homens apresentam um perfil cardiometabólico menos favorável quando comparados com as mulheres, que fica principalmente patente ao analisar marcadores não-tradicionais, que podem resultar de ligeiras, mas concomitantes, variações de diversos factores (apesar dos valores estarem dentro dos recomendados na clínica normal), incluindo valores mais elevados de c-Total, c-LDL, TGs e glicemia e mais baixos de c-HDL, juntamente com um elevado IMC. A acumulação destes factores parece promover um perfil oxidativo e inflamatório, com um conteúdo superior de LDL-ox, de TNF- α e de HDL pequenas e inferior de HDL grandes e de adiponectina. Este conjunto de alterações pró-cardiometabólicas (mesmo que de ligeira intensidade), juntamente com o aumento do ácido úrico e da pressão arterial, pode representar um maior risco cardiovascular, quando comparado com o das mulheres, que parecem estar protegidas, nomeadamente antes da menopausa. Do mesmo modo, após a menopausa, as mulheres apresentam um aumento do IMC, do perímetro abdominal e da glicemia, o que pode ser responsável pelas modificações do perfil cardiometabólico. De facto, as mulheres na pós-menopausa, apesar de apresentarem valores superiores de c-LDL e ligeiramente inferiores de c-HDL (sem alterações dos níveis de c-Total e de TGs), evidenciaram um perfil mais oxidativo, angiogénico e pró-inflamatório, com conteúdos superiores de LDL-ox, VEGF e PCRhs e percentagens inferiores de HDL grandes, sugerindo mais uma vez que um conjunto de pequenas variações dos marcadores tradicionais (ainda que dentro dos valores de referência da clínica) pode promover um perfil cardiometabólico mais nefasto.

Para concluir, numa população sem diagnóstico prévio nem medicação para doenças cardiovasculares, bem como sem antecedentes familiares de DCV, e com níveis séricos dos marcadores lipídicos tradicionais e de glicemia dentro dos valores considerados normais, há que ter cada vez mais em atenção os marcadores não tradicionais relacionados com o perfil lipídico, inflamatório e angiogénico, que não podem ser desvalorizados, pois são eles que podem marcar e mostrar um aumento da RCV em homens e em mulheres pós-menopáusicas. Embora a questão não seja consensual, quando se refere a factores que podem afetar o RCV numa população saudável, estes dados sugerem que se deve dar uma maior atenção aos parâmetros não-clássicos como possíveis biomarcadores do estado CV numa população sem qualquer sinal clássico visível, sintoma ou história prévia anunciada de DCV.

Os homens e as mulheres em pós-menopausa apresentam um perfil lipídico indicativo de um aumento do risco cardiovascular, relativamente às mulheres e às mulheres em pré-menopausa, respectivamente. Este aumento do risco pode ser quantificado por meio de marcadores não tradicionais, incluindo o conteúdo das LDL-ox e as subpopulações de HDL, bem como marcadores de inflamação e angiogénese (incluindo o TNF- α e a adiponectina) para comparações entre os géneros e o VEGF, as LDL-ox e as subpopulações de HDL para comparações entre mulheres em pré e pós-menopausa. Adicionalmente, as mulheres em pós-menopausa manifestaram um risco pró-aterogénico que deve merecer uma atenção especial podendo justificar uma intervenção farmacoterapêutica mais precoce para prevenir o desenvolvimento prematuro de doenças cardiovasculares. Finalmente, este estudo sugere que alguns dos marcadores clássicos do perfil cardiovascular (nomeadamente a ficha lipídica) muitas vezes podem não traduzir o verdadeiro risco, por apresentarem valores normais ou apenas ligeiramente alterados, mas dentro da faixa clínica normal, recomendando que os dados bioquímicos de rotina poderão ser mais esclarecedores com a inclusão de outros marcadores mais confiáveis e específicos, que transmitam informações adicionais do risco cardiometabólico.

4.5 – Referências

- Agrawal R, Prelevic G, Conway GS, et al. Serum vascular endothelial growth factor concentrations in postmenopausal women: the effect of hormone replacement therapy. *Fertility and Sterility* 2000; 73(1):56-60.
- Ahonen T, Vanhala M, Kautiainen H, et al. Sex differences in the association of adiponectin and low-grade inflammation with changes in the body mass index from youth to middle age. *Gender Medicine* 2011; 9(1):1-8.
- An J, Ribeiro RCJ, Webb P, et al. Estradiol repression of tumor necrosis factor- α transcription requires estrogen receptor activation function-2 and is enhanced by coactivators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(26):15161-6.
- Arsenault BJ, Earnest CP, Després JP, et al. Obesity, coffee consumption and CRP levels in postmenopausal overweight/obese women: importance of hormone replacement therapy use. *European Journal of Clinical Nutrition* 2009; 63(12):1419-24.
- Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, et al. Distribution of apoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20(12):2670-6.
- Barr EL, Zimmet PZ, Welborn TA, et al. Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation* 2007; 116(2):151-7.
- Casiglia E, Tikhonoff V, Caffi S, et al. Menopause does not affect blood pressure and risk profile, and menopausal women do not become similar to men. *Journal of Hypertension* 2008; 26(10):1983-92.
- Cortez-Dias N, Martins S, Belo A, et al. VALSIM. Prevalence, management and control of diabetes mellitus and associated risk factors in primary health care in Portugal. *Rev Port Cardiol* 2010; 29(4):509-37.
- Dalpino FB, Menna-Barreto L, de Faria EC. Influences of sex and age on biological rhythms of serum lipids and lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 2009; 406(1-2):57-61.
- Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *The New England Journal of Medicine* 2004; 350(14):1387-97.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2001; 21(4):473-80.
- Eapen DJ, Kalra GL, Rifai L, et al. Raising HDL cholesterol in women. *International Journal of Women's Health* 2010; 1:181-91.
- Eren E, Yilmaz N, Aydin O. High density lipoprotein and its dysfunction. *The Open Biochemistry Journal* 2012; 6:78-93.
- Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annual Review of Medicine* 2000; 51:245-70.
- Fain JN. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitamins and Hormones* 2006; 74:443-77.
- Feig DI, Johnson RJ. Hyperuricemia in childhood primary hypertension. *Hypertension* 2003; 42(3):247-52.
- Girardi F, Franceschi E, Brandes AA. Cardiovascular safety of VEGF-targeting therapies: current evidence and handling strategies. *Oncologist* 2010; 15(7):683-94.

- Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, et al. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 288(5):1102-7.
- Hong SC, Yoo SW, Cho GJ, et al. Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. *Menopause* 2007; 14(5):835-40.
- Horter MJ, Sondermann S, Reinecke H, et al. Associations of HDL phospholipids and paraoxonase activity with coronary heart disease in postmenopausal women. *Acta Physiologica Scandinavica* 2002; 176(2):123-30.
- Huang H, Ma R, Liu D, et al. Oxidized low-density lipoprotein cholesterol and the ratio in the diagnosis and evaluation of therapeutic effect in patients with coronary artery disease. *Disease Markers* 2012; 33(6):295-302.
- Huang H, Mai W, Liu D, et al. The oxidation ratio of LDL: a predictor for coronary artery disease. *Disease Markers* 2008; 24(6):341-9.
- Huang SS, Huang PH, Chen YH, et al. Association of adiponectin with future cardiovascular events in patients after acute myocardial infarction. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2010; 17(3):295-303.
- Huang Y, Hu Y, Mai W, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein is an independent risk factor in young patients with coronary artery disease. *Disease Markers* 2011; 31(5):295-301.
- Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, et al. Cholesterol efflux, cholesterol esterification, and cholesteryl ester transfer by LpA-I and LpA-I/A-II in native plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1995; 15(9):1412-8.
- Imahara SD, Jelacic S, Junker CE, et al. The influence of gender on human innate immunity. *Surgery* 2005; 138(2):275-82.
- Kaushik M, Sontineni SP, Hunter C. Cardiovascular disease and androgens: a review. *International Journal of Cardiology* 2010; 142(1):8-14.
- Kleemola P, Freese R, Jauhiainen M, et al. Dietary determinants of serum paraoxonase activity in healthy humans. *Atherosclerosis* 2002; 160(2):425-32.
- Kotani K, Sakane N, Ueda M, et al. Oxidized high-density lipoprotein is associated with increased plasma glucose in nondiabetic dyslipidemic subjects. *Clinica Chimica Acta* 2012; 414:125-9.
- Laplaud PM, Dantoine T, Chapman MJ. Paraoxonase as a risk marker for cardiovascular disease: facts and hypotheses. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 1998; 36(7):431-41.
- Leuzzi C, Marzullo R, Modena MG. Is menopause a risk factor for ischemic heart disease in women? *Giornale Italiano di Cardiologia* 2012; 13(6):401-6.
- Li Z, McNamara JR, Fruchart JC, et al. Effects of gender and menopausal status on plasma lipoprotein subspecies and particle sizes. *Journal of Lipid Research* 1996; 37(9):1886-96.
- Loucif Y, Méthot J, Tremblay K, et al. Contribution of adiponectin to the cardiometabolic risk of postmenopausal women with loss-of-function lipoprotein lipase gene mutations. *Menopause* 2011; 18(5):558-62.
- Ludescher B, Najib A, Baar S, et al. Gender specific correlations of adrenal gland size and body fat distribution: a whole body MRI study. *Hormone and Metabolic Research* 2007; 39(7):515-8.
- Mackness M, Durrington P, Mackness B. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 2004; 15(4):399-404.

Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 2004; 4(4):211-7.

Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atherosclerosis Supplements* 2002; 3(4):49-55.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001; 50(9):2094-9.

Mahdy Ali K, Wonnerth A, Huber K, et al. Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol - current therapies and future opportunities. *British Journal of Pharmacology* 2012; 167(6):1177-94.

Mangge H, Almer G, Truschnig-Wilders M, et al. Inflammation, adiponectin, obesity and cardiovascular risk. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17(36):4511-20.

Manninen V, Tenkanen L, Koskinen P, et al. Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. Implications for treatment. *Circulation* 1992; 85(1):37-45.

Matsuzawa Y. Establishment of a concept of visceral fat syndrome and discovery of adiponectin. *Proceedings of the Japan Academy - Series B: Physical & Biological Sciences* 2010; 86(2):131-41.

Maytin M, Leopold J, Loscalzo J. Oxidant stress in the vasculature. *Current Atherosclerosis Reports* 1999; 1(2):156-64.

Mertens ANN, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB Journal* 2001; 15(12):2073-84.

Movva R, Rader DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clinical Chemistry* 2008; 54(5):788-800.

Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, et al. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2000; 148(1):131-9.

Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. High-density lipoprotein subfractions - what the clinicians need to know. *Cardiology* 2013; 124(2):116-25.

Rader DJ. Illuminating HDL - is it still a viable therapeutic target? *The New England Journal of Medicine* 2007; 357(21):2180-3.

Redondo S, Martínez-González J, Urraca C, et al. Emerging therapeutic strategies to enhance HDL function. *Lipids in Health and Disease* 2011; 10:175.

Rodrigues SL, Baldo MP, Capingana DP, et al. Gender distribution of serum uric acid and cardiovascular risk factors: population based study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2012; 98(1):13-21.

Singh GM, Danaei G, Pelizzari PM, et al. The age associations of blood pressure, cholesterol, and glucose: analysis of health examination surveys from international populations. *Circulation* 2012; 125(18):2204-11.

Smulyan H, Asmar RG, Rudnicki A, London GM, Safar ME. Comparative effects of aging in men and women on the properties of the arterial tree. *Journal of the American College of Cardiology* 2001; 37(5):1374-80.

Soran H, Hama S, Yadav R, et al. HDL functionality. *Current Opinion in Lipidology* 2012; 23(4):353-66.

Stevenson JC, Crook D, Godsland IF. Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. *Atherosclerosis* 1993; 98(1):83-90.

Sumino H, Nakamura T, Ichikawa S, et al. Serum level of vascular endothelial growth factor is decreased by hormone replacement therapy in postmenopausal women without hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000; 148(1):189-95.

Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Lladó I, et al. Effects of caloric restriction and gender on rat serum paraoxonase 1 activity. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2006; 17(3):197-203.

Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Proenza AM, et al. Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: gender differences in the factors involved. *Molecular Medicine* 2007; 13(3-4):203-9.

Thomàs-Moyà E, Gómez-Pérez Y, Fiol M, et al. Gender related differences in paraoxonase 1 response to high-fat diet-induced oxidative stress. *Obesity* 2008; 16(10):2232-8.

World Health Organization Scientific Group. Research on the menopause in the 1990s. WHO Technical Services Department Series 866, WHO, Geneva, Switzerland.

Zago V, Sanguinetti S, Brites F, et al. Impaired high density lipoprotein antioxidant activity in healthy postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2004; 177(1):203-10.

Zelzer S, Fuchs N, Almer G, et al. High density lipoprotein cholesterol level is a robust predictor of lipid peroxidation irrespective of gender, age, obesity, and inflammatory or metabolic biomarkers. *Clinica Chimica Acta* 2011; 412(15-16):1345-9.

Zoccali C, Maio R, Mallamaci F, et al. Uric acid and endothelial dysfunction in essential hypertension. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006; 17(5):1466-71.

Capítulo 5

A diabetes atenua as diferenças entre os géneros e agrava o perfil cardiometabólico nas mulheres em pós-menopausa

Publicado sob o formato:

Mascarenhas-Melo F, Marado D, Palavra F, Sereno J, Coelho Á, Pinto R, Teixeira-Lemos E, Teixeira F, Reis F. Diabetes abrogates sex differences and aggravates cardiometabolic risk in postmenopausal women. *Cardiovascular Diabetology* 2013; 12:61.

5.1 – Introdução

A mortalidade por causa cardiovascular (CV) tem vindo a aumentar em países onde a diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é prevalente, estando os pacientes diabéticos associados a um risco 2 a 4 vezes mais elevado de desenvolvimento de DCV (representando 50-80% das mortes), para além do aumento da morbilidade e perda da qualidade de vida (Gardete-Correia e col., 2010; Wild e col., 2004). Além de ser, por si só, um factor de risco para a DCV, a DMT2 é frequentemente associada a uma maior prevalência de outros importantes factores de risco, incluindo a hipertensão, a obesidade, a resistência à insulina, a microalbuminúria e a dislipidemia (Fox e col., 2010; Sarwar e col., 2010). Esta condição multifactorial, muitas vezes referida como síndrome metabólica, é responsável pela elevada morbilidade e mortalidade CV nestes pacientes (Lakka e col., 2002). Para a maioria dos doentes com DMT2, o tratamento farmacológico é crucial para atrasar a progressão da doença, mas não parece ser capaz de eliminar o risco de DCV, especialmente em mulheres diabéticas, sobretudo após a menopausa (Sarwar e col., 2010).

Com efeito, o aumento do risco de doença cardiovascular após a menopausa parece estar associado ao aparecimento de características da síndrome metabólica (Carr e col., 2003), apesar das causas exactas ainda não terem sido satisfatoriamente elucidadas. A obesidade é um factor de risco independente para a doença macrovascular em ambos os géneros (Hubert e col., 1983); no entanto, apesar da maior incidência de obesidade nas mulheres durante a pré-menopausa, as taxas de doença macrovascular são ainda assim mais baixas do que as dos homens. Curiosamente, essa diferença entre os géneros, que normalmente desaparece após a menopausa, é perdida rapidamente em mulheres na pré-menopausa com DMT2, onde a DCV alcança taxas duas a 5 vezes mais elevadas do que em mulheres não diabéticas (Kautzky-Willer e col., 2010). Na verdade, as mulheres com DMT2, comparadas com mulheres não diabéticas de idade comparável, exibem taxas várias vezes superiores de morte relacionada com a doença arterial coronária (DAC), com taxas de eventos quase idênticas às observadas em homens com DMT2 (Pan e col., 1986). Os factores de risco cardiovascular (FRCV) tradicionais não conseguem explicar completamente essas diferenças de mortalidade cardiovascular relacionadas com os géneros (Pyorala e col., 1987). Neste contexto, mais estudos são necessários para

entender a influência precisa do género e da menopausa no risco CV, especialmente em pacientes diabéticos, com o objectivo de alcançar um efeito preventivo e novas estratégias para uma gestão mais eficaz da doença reduzindo assim o seu elevado risco, particularmente nas mulheres em pós-menopausa.

Como principal causa de morte em pacientes com DMT2, a DCV é um fenómeno complexo, que envolve factores metabólicos, lipídicos, oxidativos, inflamatórios, bem como genéticos. Além da hiperglicemia, uma série de outros factores de risco comuns podem contribuir para as doenças cardiovasculares em mulheres diabéticas. Os baixos níveis séricos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) têm sido amplamente reconhecidos como um factor de risco para a doença arterial coronária (DAC) (Asztalos e col., 2003; Hayden e col., 2005) e são uma característica comum da dislipidemia associada à diabetes e à resistência à insulina (Taskinen e col., 2003). Actualmente começa a dar-se mais atenção à quantificação das diferentes partículas de HDL (grandes, intermédias e pequenas) que se distinguem pela sua composição, o que lhes confere diferentes funcionalidades, nomeadamente no TRC e na prevenção/protecção do risco CV (Asztalos e col., 2000), estando as HDL grandes directamente relacionadas com uma função ateroprotectora e inversamente com a gravidade da doença e a progressão das lesões coronárias (Pirillo e col., 2013). Um dos constituintes das HDL (a enzima paraoxoanase 1) tem sido apontada como um factor contributivo para a funcionalidade das, nomeadamente na protecção contra a oxidação das LDL (Mackness e col., 2004); as LDL oxidadas (LDL-ox) e o c-HDL têm mostrado actividades totalmente contrárias no que diz respeito à prevenção e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Mertens e col., 2001). No entanto, o papel do c-HDL na determinação do risco cardiovascular no que respeita ao género e à menopausa numa população diabética permanece por esclarecer.

A inflamação crónica também está cada vez mais patente no processo da aterosclerose, nomeadamente em pacientes diabéticos. O aumento de citoquinas pró-inflamatórias juntamente com a redução de mediadores anti-inflamatórios e anti-aterogénicos, têm um valor inequívoco na evolução do RCV, bem como nas diferenças entre géneros e na influência da menopausa nas mulheres, nomeadamente em patologias como a DMT2 (Mangge e col., 2010; Huang e col., 2010).

A angiogénese, tal como já foi dito anteriormente, tem assumido um papel importante na aterosclerose, ainda que existam resultados contraditórios acerca deste

tema; no entanto o VEGF é considerado um biomarcador chave na determinação do crescimento endotelial vascular, devendo ser mais bem estudado o seu papel nos doentes com DMT2 (Hagberg e col., 2012).

Um outro marcador que merece mais atenção é o ácido úrico; embora possa actuar como um antioxidante, a sua acumulação no soro está frequentemente associada a várias condições patológicas, e tem sido sugerido como um factor de risco independente para a aterosclerose carotídea em pacientes com DMT2 (Li e col., 2011). Um estudo de acompanhamento prospectivo mostrou que a hiperuricemia está associada a um maior risco de DMT2, independentemente da obesidade, dislipidemia e hipertensão (Dehghan e col., 2008). Neste contexto, também seria importante entender a sua influência na modulação do risco CV tendo em conta o género e a menopausa, principalmente em doentes com esta patologia.

Assim, esta parte do trabalho teve como objectivo avaliar a influência do género e menopausa no perfil cardiometabólico numa população diabética, usando marcadores tradicionais mas também novos marcadores não-tradicionais relacionados com o perfil lipídico, oxidativo e inflamatório.

5.2 – População e métodos

5.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas

O estudo envolveu 110 doentes com DMT2 com idades compreendidas entre os 36 e os 75 anos, sendo 57 do sexo masculino e 53 do sexo feminino (8 em pré e 45 em pós-menopausa). O diagnóstico da DMT2 foi feito na Unidade de Diabetes e Doenças Metabólicas do Centro Hospitalar de Coimbra (E.P.E.), de acordo com as recomendações actualizadas da ADA (Associação Americana de Diabetes) e da AEED (Associação Europeia para o Estudo da Diabetes). Para além da DMT2, muitos doentes eram hipertensos e dislipidémicos e alguns doentes manifestaram a existência de outras patologias do foro cardiovascular, nomeadamente: enfarte agudo do miocárdio, AVC, angina de peito, fibrilhação auricular, arritmia, insuficiência cardíaca, doença coronária e arterial, valvulopatia cardíaca e doença vascular periférica. Todos os doentes diabéticos estavam

sujeitos a terapêutica antidiabética: 32,73% estavam sujeitos a insulina, 85,45% estavam sob antidiabéticos orais (ADO), entre os quais: metformina, sulfonilureias, moduladores de incretinas, inibidores da glucosidase intestinal- α , rosiglitazona e pioglitazona; 45,45% sob fármacos antilipídicos: estatinas, fibratos, ezetimiba e ácidos ω -3; 79,09% sob fármacos anti-hipertensores, entre os quais inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), antagonistas dos receptores da angiotensina (ARA), bloqueadores dos canais de cálcio e diuréticos. É de salientar a existência de vários doentes com mais do que uma classe de fármacos para cada patologia que apresentava. Esta medicação (antilipídica e anti-hipertensora) pressupõe a existência já de DCV concomitante à DMT2. Como grupo controlo foram aleatoriamente recrutados 74 voluntários com sexo equiparado aos doentes, incluindo 39 homens e 35 mulheres (16 em pré e 19 em pós-menopausa), com idades compreendidas entre os 40 e os 75 anos, durante a realização de testes laboratoriais de rotina num laboratório de análises clínicas (Laboratório de Análises Clínicas Soares & Figueiredo, de Viseu). Os voluntários não estavam a tomar esteróides exógenos, nem qualquer outra medicação e não declararam nenhuma doença diagnosticada.

O estado de menopausa (mulheres pré e pós-menopausa) foi referido durante as entrevistas e registado no questionário. Esta avaliação baseou-se na definição da Organização Mundial de Saúde, que considera o estado de pós-menopausa como a ausência de menstruação por um período de pelo menos 12 meses. As mulheres grávidas, a amamentar e os indivíduos com idade < 16 ou > 75 anos foram excluídos deste estudo. O estudo foi realizado de acordo com o código de ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsínquia) para estudos em humanos e recebeu ainda autorização do comité de ética local, bem como de todos os participantes após leitura e assinatura do consentimento informado.

5.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue

A recolha de dados e colheita de sangue foram realizadas de acordo com o descrito na sessão 4.2.2.

5.2.3 – Determinações analíticas

Foram doseados os parâmetros segundo os métodos descritos na sessão 4.2.3. A HbA1c foi medida utilizando um teste de imunoaglutinação em látex através do aparelho DCA 2000+ (Bayer Diagnostics, Barcelona, Espanha).

5.2.4 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows, versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, EUA). A distribuição das variáveis contínuas foi analisada utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov, para avaliar desvios significativos da normalidade. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o t-teste de amostras independentes e o teste de Mann-Whitney, consoante as variáveis seguiam distribuição normal ou não, respectivamente, para cada população em análise. O ajuste das diferenças estatísticas para os factores de confusão (idade e IMC) foi realizado utilizando uma análise de covariância (ANCOVA), quando necessário. A associação entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste de Pearson. Foi considerado estatisticamente significativo um *P* menor que 0,05.

5.3 – Resultados

5.3.1 – Caracterização geral das populações

Os dados demográficos e antropométricos dos voluntários controlo e dos doentes diabéticos (masculinos, femininos, mulheres em pré e pós-menopausa) estão resumidos nas Tabelas 5.1 e 5.2. Setenta e quatro voluntários controlo foram incluídos no estudo: 39 (52,70%) homens e 35 (47,30%) mulheres (16 em pré-menopausa e 19 em pós-menopausa). Cento e dez doentes com diabetes mellitus tipo 2 foram recrutados: 57 (51,82%) do sexo masculino e 53 (48,18%) do sexo feminino (8 em pré-menopausa e 45 em pós-menopausa). Os doentes diabéticos, de ambos os sexos, apresentaram valores significativamente mais elevados de glicemia, IMC e perímetro abdominal, quando

comparados com os do seu respectivo controlo, emparelhados para género e idade [Tabela 5.1 e Figura 5.3 (a)].

Tabela 5.1 – Dados demográficos e antropométricos da população diabética e dos controlos emparelhados para idade e género

Parâmetros	Grupo Controlo			Grupo Diabético			Diab vs Cont (P)	
	Homens (n = 39)	Mulheres (n = 35)	P	Homens (n = 57)	Mulheres (n = 53)	P	H	M
Idade (anos)	59,97 ± 1,02	54,71 ± 1,68	0,100	58,88 ± 1,34	60,49 ± 1,42	0,524	0,453	0,013
Género (%M/%F)	52,70	47,30	—	51,82	48,18	—	—	—
IMC (Kg/m²)	27,89 ± 0,72	27,09 ± 0,71	0,704	30,37 ± 0,65	30,12 ± 0,67	0,788	0,013	0,002
P. Abdom. (cm)	101,32 ± 1,75	92,26 ± 1,96	0,003	110,36 ± 1,70	104,02 ± 2,05	0,020	0,000*	0,000*
PAS (mmHg)	145,28 ± 3,08	143,74 ± 3,98	0,010	136,86 ± 2,95	137,53 ± 3,61	0,942	0,002*	0,000*
PAD (mmHg)	87,10 ± 1,54	87,76 ± 2,06	0,654	73,54 ± 1,69	72,74 ± 1,77	0,745	0,000*	0,000*
Glicemia (mmol/L)	5,58 ± 0,08	5,12 ± 0,09	0,000	9,70 ± 0,48	10,69 ± 0,59	0,191	0,000*	0,000*
HbA1c (%)	—	—	—	8,13 ± 0,25	9,20 ± 0,30	0,007	—	—

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *O P foi ajustado à idade e/ou ao IMC, quando necessário (através da análise de covariância ANCOVA). IMC, índice de massa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; P. Abdom., perímetro abdominal.

A pressão arterial, sistólica e diastólica, foi significativamente menor nos diabéticos (tanto nos homens como nas mulheres), comparativamente aos respectivos controlos, o que se justificará pela toma de medicamentos anti-hipertensores nestas subpopulações de doentes. Em relação a diferenças entre homens e mulheres em cada população, os controlos do sexo feminino apresentaram valores significativamente mais reduzidos de glicemia e de pressão arterial sistólica, quando comparados com os controlos masculinos e emparelhados para a mesma idade, enquanto que as mulheres diabéticas apresentaram valores superiores de hemoglobina glicosilada (HbA1c), quando comparados com os homens diabéticos de idade equiparada (Tabela 5.1). Os valores de IMC e de perímetro abdominal não devem ser objecto de comparação directa entre sexos diferentes uma vez que os valores de referência são distintos para homem e mulher.

Os resultados foram analisados após ajuste dos valores para a idade e/ou para o IMC, quando adequado.

No que diz respeito às populações pré e pós-menopausa, quer do grupo controlo quer do grupo de diabéticos, as mulheres diabéticas em pré-menopausa apresentaram valores significativamente mais elevados de glicemia e uma tendência (embora não estatisticamente significativa) para um aumento do IMC e do perímetro abdominal, quando comparada com as mulheres controlo também em pré-menopausa. As mulheres diabéticas em pós-menopausa apresentaram alterações adicionais. Na verdade, quando comparadas com o controlo em pós-menopausa, as mulheres diabéticas apresentaram valores significativamente superiores de glicemia, IMC e perímetro abdominal [Tabela 5.2 e Figura 5.4 (a)].

Tabela 5.2 – Dados demográficos e antropométricos da população diabética feminina e dos controlos emparelhados para a idade: influência da menopausa

Parâmetros	Mulheres Controlo			Mulheres Diabéticas			Diab vs Cont (P)	
	Pré Menop. (n = 16)	Pós Menop (n = 19)	P	Pré Menop. (n = 8)	Pós Menop. (n = 45)	P	Pré Menop	Pós Menop
Idade (anos)	45,63 ± 1,12	62,37 ± 1,35	0,000	43,88 ± 1,29	63,44 ± 1,20	0,000	0,349	0,345
IMC (Kg/m ²)	26,93 ± 1,21	27,21 ± 0,85	0,472*	29,43 ± 2,44	30,24 ± 0,67	0,578*	0,221	0,013
P. Abdom. (cm)	91,38 ± 2,86	93,06 ± 2,75	0,575*	100,57 ± 4,93	104,66 ± 2,27	0,081*	0,103	0,000*
PAS (mmHg)	132,69 ± 5,62	153,56 ± 4,61	0,004*	120,38 ± 7,22	140,58 ± 3,91	0,048*	0,187	0,113*
PAD (mmHg)	84,25 ± 3,20	90,89 ± 2,52	0,175*	72,25 ± 3,14	72,82 ± 2,02	0,519*	0,027	0,000*
Glicemia (mmol/L)	4,92 ± 0,10	5,31 ± 0,14	0,038*	10,80 ± 1,65	10,67 ± 0,64	0,832*	0,000	0,000*
HbA1c (%)	—	—	—	9,03 ± 1,08	9,23 ± 0,30	0,477*	—	—

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *O P foi ajustado à idade ou ao IMC, quando necessário (através da análise de covariância ANCOVA). IMC, índice de massa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; P. Abdom., perímetro abdominal.

A pressão arterial diastólica foi significativamente menor nas diabéticas (tanto na pré como na pós-menopausa) quando comparada com a dos respectivos controlos. Relativamente a diferenças entre a pré e a pós-menopausa em cada população, as mulheres controlo na pós-menopausa mostraram aumento da glicemia e da pressão arterial sistólica em relação às mulheres controlo em pré-menopausa, enquanto as mulheres diabéticas em pós-menopausa apresentaram um aumento da PAS sem alterações de IMC e de perímetro abdominal, quando comparadas com as diabéticas em pré-menopausa [Tabela 5.2 e Figura 5.4 (a)].

Os resultados foram analisados após ajuste dos valores para a idade ou para o IMC, quando adequado.

5.3.2 – Perfil lipídico clássico

Tabela 5.3 – Perfil lipídico da população diabética e controlos emparelhados para idade e género

Parâmetros	Grupo Controlo			Grupo Diabético			Diab vs Cont (P*)	
	Homens (n = 39)	Mulheres (n = 35)	P	Homens (n = 57)	Mulheres (n = 53)	P	H	M
c-Total (mmol/L)	5,71 ± 0,15	5,30 ± 0,14	0,121	4,75 ± 0,15	4,89 ± 0,15	0,526	0,000	0,129
TGs (mmol/L)	1,28 ± 0,08	1,08 ± 0,06	0,118	1,85 ± 0,15	1,99 ± 0,15	0,406	0,002	0,000
c-LDL (mmol/L)	3,70 ± 0,15	3,36 ± 0,13	0,222	2,69 ± 0,14	2,69 ± 0,14	0,996	0,000	0,012
LDL-ox (U/L)	52,65 ± 2,60	33,23 ± 1,92	0,000	32,58 ± 1,78	32,42 ± 1,84	1,000	0,000	0,401
LDL-ox/c-LDL	14,54 ± 0,56	9,85 ± 0,33	0,000	12,30 ± 0,50	12,83 ± 0,58	0,557	0,014	0,000
c-HDL (mmol/L)	1,42 ± 0,06	1,44 ± 0,06	0,963	1,25 ± 0,04	1,33 ± 0,05	0,292	0,007	0,377
HDL grandes (%)	30,92 ± 1,62	41,50 ± 2,55	0,002	33,65 ± 1,69	34,08 ± 1,78	0,860	0,535	0,048
HDL intermédi. (%)	47,58 ± 0,74	43,77 ± 1,53	0,041	45,68 ± 0,99	45,02 ± 0,94	0,315	0,370	0,878
HDL pequenas (%)	21,50 ± 1,37	14,65 ± 1,24	0,002	20,66 ± 1,57	20,82 ± 1,29	0,412	0,928	0,003
c-nHDL (mmol/L)	4,28 ± 0,15	3,86 ± 0,14	0,110	3,50 ± 0,16	3,56 ± 0,16	0,635	0,004	0,257
c-Total/c-HDL	4,22 ± 0,18	3,85 ± 0,17	0,338	4,02 ± 0,18	3,97 ± 0,22	0,798	0,456	0,649
c-LDL/c-HDL	2,75 ± 0,16	2,47 ± 0,14	0,419	2,30 ± 0,14	2,23 ± 0,17	0,682	0,107	0,301
PON1 (U/mL/min)	519,66±18,63	449,05±21,66	0,034	426,01±20,27	490,17±30,31	0,077	0,004	0,780

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *O P foi ajustado à idade e/ou ao IMC, quando necessário (através da análise de covariância ANCOVA). c-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade; c-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; LDL-ox, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas; PON1, paraoxonase 1; TGs, triglicerídeos; c-Total, colesterol total.

Como mencionado anteriormente, muitos doentes diabéticos estavam sob terapêutica antilipidémica, o que justifica alguns dos dados obtidos para o perfil lipídico clássico. Neste contexto, os homens diabéticos apresentaram concentrações séricas significativamente mais baixas de c-Total, c-LDL e c-nHDL quando comparados com os indivíduos controlo masculinos. Idêntico perfil foi encontrado entre as mulheres diabéticas e os respectivos controlos, com um conteúdo significativamente menor de c-LDL e uma tendência para a redução de c-Total e c-nHDL nas doentes (Tabela 5.3). No

entanto, as concentrações de TGs e de c-HDL apresentaram um perfil distinto, provavelmente devido ao menor impacto da medicação antilipidémica sobre estes parâmetros de perfil lipídico clássico. Assim, os diabéticos homens apresentaram valores significativamente mais elevados de TGs e reduzidos de c-HDL, quando comparados com os controlos, e os doentes diabéticos do sexo feminino apresentaram também um aumento do conteúdo em TGs e uma tendência para a redução de c-HDL, quando comparados com os seus respectivos controlos [Tabela 5.3 e Figura 5.1 (a)].

Tabela 5.4 – Perfil lipídico da população diabética feminina e dos controlos emparelhados para idade: influência da menopausa

Parâmetros	Mulheres Controlo			Mulheres Diabéticas			Diab vs Cont (P*)	
	Pré Menop. (n = 16)	Pós Menop. (n = 19)	P*	Pré Menop. (n = 8)	Pós Menop. (n = 45)	P*	Pré Menop.	Pós Menop.
c-Total (mmol/L)	5,08 ± 0,16	5,48 ± 0,21	0,364	4,68 ± 0,44	4,93 ± 0,16	0,725	0,313	0,090
TGs (mmol/L)	1,02 ± 0,08	1,13 ± 0,10	0,455	1,51 ± 0,31	2,08 ± 0,17	0,467	0,066	0,003
c-LDL (mmol/L)	3,21 ± 0,17	3,47 ± 0,19	0,514	2,71 ± 0,35	2,69 ± 0,15	0,997	0,164	0,007
LDL-ox (U/L)	29,13 ± 1,76	36,46 ± 2,98	0,044	34,83 ± 0,58	31,89 ± 1,61	0,993	0,897	0,339
LDL-ox/c-LDL	9,12 ± 0,41	10,39 ± 0,46	0,018	12,39 ± 1,19	12,93 ± 0,66	0,883	0,022	0,045
c-HDL (mmol/L)	1,41 ± 0,10	1,47 ± 0,08	0,363	1,32 ± 0,12	1,33 ± 0,05	0,974	0,558	0,301
HDL grandes (%)	42,25 ± 4,99	40,91 ± 2,45	0,138	38,74 ± 2,98	33,22 ± 2,02	0,535	0,632	0,028
HDL interméd. (%)	43,73 ± 2,90	43,81 ± 1,58	0,224	45,55 ± 2,44	44,93 ± 1,02	0,861	0,681	0,169
HDL pequenas (%)	13,83 ± 2,28	15,30 ± 1,33	0,071	15,70 ± 1,08	21,77 ± 1,47	0,227	0,468	0,023
c-nHDL (mmol/L)	3,68 ± 0,17	4,01 ± 0,20	0,390	3,36 ± 0,45	3,60 ± 0,17	0,781	0,236	0,243
c-Total/c-HDL	3,84 ± 0,28	3,86 ± 0,20	0,437	3,69 ± 0,43	4,02 ± 0,25	0,897	0,709	0,842
c-LDL/c-HDL	2,47 ± 0,24	2,47 ± 0,17	0,485	2,18 ± 0,35	2,24 ± 0,19	0,967	0,492	0,460
PON1 (U/mL/min)	415,66±26,78	477,17±32,14	0,420	443,94±31,40	498,39±35,22	0,089	0,527	0,916

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *O P foi ajustado à idade ou ao IMC, quando necessário (através da análise de covariância ANCOVA). c-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade; c-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; LDL-ox, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas; PON1, paraoxonase 1; TGs, triglicérideos; c-Total, colesterol total.

No que diz respeito aos subgrupos de pré e pós-menopausa, as mulheres diabéticas em pré-menopausa não apresentaram valores significativamente diferentes dos respectivos controlos em pré-menopausa, enquanto as diabéticas em pós-menopausa

apresentaram redução de c-LDL e aumento de TGs (Tabela 5.4), sem alterações nos restantes parâmetros de perfil lipídico clássico, relativamente aos controlos.

5.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1

No que diz respeito a diferenças entre homens e mulheres em cada população, uma reduzida concentração de LDL-ox foi encontrada nas mulheres do grupo controlo (vs homens), sem alterações entre homens e mulheres na população diabética (Tabela 5.3). No que diz respeito às diferenças entre as mulheres pré e pós-menopausa em cada população, foi encontrado um aumento da concentração das LDL-ox nas mulheres controlo em pós-menopausa (vs pré-menopausa), sem alterações entre pré e pós-menopausa na população de mulheres diabéticas (Tabela 5.4). Os homens diabéticos apresentaram concentrações séricas significativamente mais baixas de LDL-ox quando comparados com os indivíduos controlo masculinos. Idêntico perfil foi encontrado entre as mulheres diabéticas e os respectivos controlos, com um conteúdo tendencialmente menor de LDL-ox nas doentes (Tabela 5.3).

Em relação às subpopulações de HDL, as mulheres diabéticas apresentaram uma concentração significativamente menor de HDL grandes e superior de HDL pequenas, quando comparadas com as mulheres controlo; os pacientes diabéticos do sexo masculino apresentaram valores inalterados de HDL grandes e HDL pequenas quando comparados com os controlos do mesmo sexo. Para além disso, enquanto não houve alterações dos valores de HDL grandes e pequenas entre mulheres e homens diabéticos, um valor superior das HDL grandes e inferior das pequenas foi encontrado no controlo feminino quando comparado com o masculino [Tabela 5.3 e Figura 5.1 (b) e (c)].

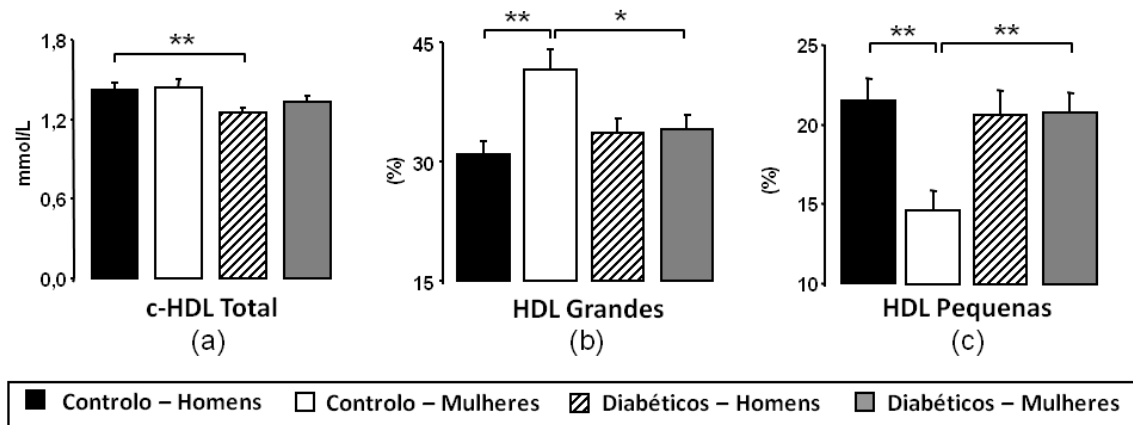


Figura 5.1 – Efeito do género nas populações controlo e diabética. Concentração sérica de c-HDL total (a) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (b) e pequenas (c). Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

No que diz respeito à influência da menopausa, não foram encontradas alterações entre o estado de pré e pós-menopausa para as HDL grandes e pequenas na população controlo, tal como nos doentes diabéticos. No entanto, após a menopausa as mulheres diabéticas apresentaram valores significativamente reduzidos de HDL grandes e elevados de HDL pequenas quando comparadas com os controlos em pós-menopausa, enquanto não houve alterações dos valores das HDL grandes e pequenas entre os controlos e diabéticos em pré-menopausa [Tabela 5.4 e Figura 5.2 (b) e (c)].

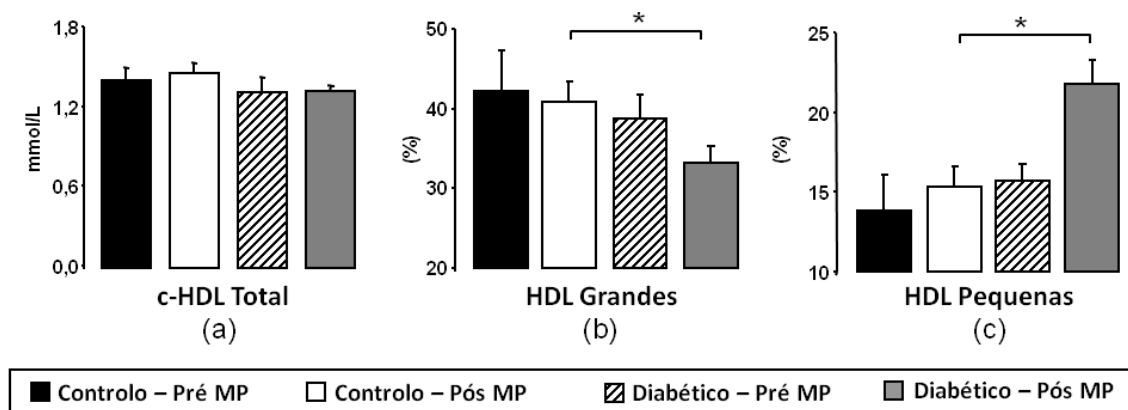


Figura 5.2 – Efeito da menopausa nas populações controlo e diabética. Concentração sérica de c-HDL total (a) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (b) e pequenas (c). Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. * = $p < 0,05$.

Não foram encontradas alterações na actividade paraoxonase entre mulheres controlo e diabéticas, enquanto os homens diabéticos mostraram uma actividade

reduzida quando comparados com os indivíduos controlo masculinos. No que diz respeito a diferenças dentro das populações, os controlos do sexo feminino apresentaram valores significativamente mais baixos de actividade da PON1 (vs masculinos), sem alterações entre os doentes diabéticos masculinos e femininos (Tabela 5.3). Nenhuma alteração foi encontrada entre mulheres pré e pós-menopausa em ambas as populações (controlo e diabéticos), assim como entre grupos diabéticos e controlos emparelhados para pré ou pós-menopausa (Tabela 5.4).

5.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial

As mulheres diabéticas apresentaram níveis séricos significativamente mais elevados de VEGF, ácido úrico, PCRhs e TNF- α , e tendencialmente reduzidos de adiponectina, quando comparadas com as mulheres controlo, enquanto os doentes diabéticos do sexo masculino apresentaram valores significativamente superiores de ácido úrico e PCRhs e inferiores de TNF- α e adiponectina, quando comparados com os controlos masculinos [Tabela 5.5 e Figura 5.3 (b), (c), (d), (e) e (f)].

Tabela 5.5 – Marcadores de inflamação, angiogénese e lesão endotelial da população diabética e controlos emparelhados para idade e género

Parâmetros	Grupo Controlo			Grupo Diabético			Diab vs Cont (P*)	
	Homens (n = 39)	Mulheres (n = 35)	P	Homens (n = 57)	Mulheres (n = 53)	P	H	M
PCRhs ($\mu\text{g/mL}$)	0,23 \pm 0,04	0,40 \pm 0,16	0,972	0,51 \pm 0,11	0,65 \pm 0,09	0,047	0,031	0,001
VEGF (pg/mL)	432,89 \pm 71,43	355,02 \pm 43,01	0,989	378,61 \pm 32,45	546,95 \pm 59,28	0,032	0,976	0,015
TNF- α (pg/mL)	4,90 \pm 0,59	2,11 \pm 0,39	0,000	2,61 \pm 0,35	2,84 \pm 0,41	0,977	0,000	0,012
Adiponectina ($\mu\text{g/mL}$)	10,41 \pm 1,10	9,25 \pm 1,10	0,038	5,27 \pm 0,62	8,38 \pm 1,09	0,011	0,000	0,082
ICAM-1 (ng/mL)	566,65 \pm 177,37	555,06 \pm 80,02	0,994	570,75 \pm 50,72	552,15 \pm 54,09	0,804	0,769	0,325
Ác. úrico (mmol/L)	0,36 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01	0,000	0,81 \pm 0,08	0,73 \pm 0,08	0,496	0,000	0,000

Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. *Os valores de P foram ajustados para a idade e/ou IMC, quando necessário. PCRhs, proteína C reactiva de alta sensibilidade; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; TNF- α , factor de necrose tumoral alfa; VEGF, factor de crescimento vascular endotelial.

Em relação às diferenças entre homens e mulheres, na presença de diabetes as mulheres apresentaram níveis significativamente superiores de VEGF, PCRhs e adiponectina (comparadas com os homens diabéticos), enquanto na população controlo

os níveis de ácido úrico, TNF- α e adiponectina das mulheres foram significativamente mais baixos, quando comparados com os dos homens [Tabela 5.5 e Figura 5.3 (b), (c), (d), (e) e (f)].

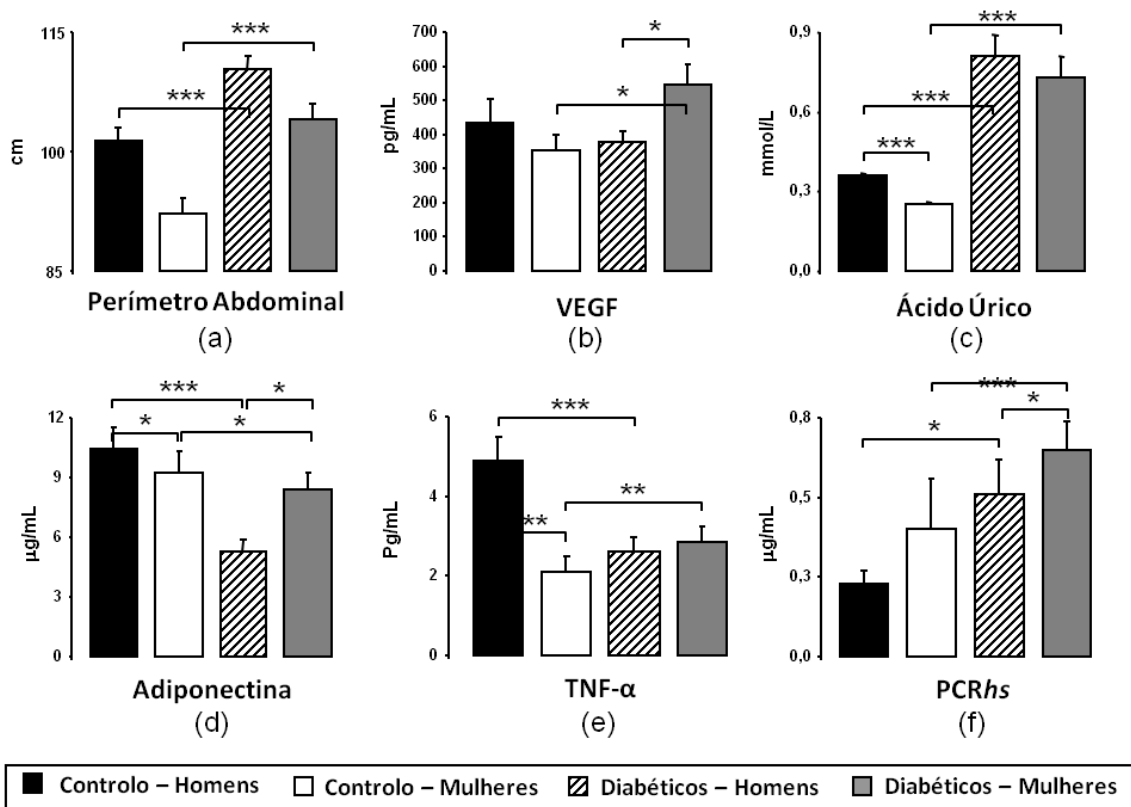


Figura 5.3 – Efeito do género nas populações controlo e diabética. Perímetro abdominal (a), concentração sérica de VEGF (b), ácido úrico (c), adiponectina (d), TNF- α (e), e PCRhs (f). Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. *= p<0,05; **= p<0,01; ***= p<0,001.

No que diz respeito à influência da menopausa, as doentes diabéticas em pós-menopausa apresentaram níveis significativamente mais elevados de ácido úrico, PCRhs, TNF- α e VEGF, sem alterações nos níveis de adiponectina, quando comparadas com as mulheres controlo em pós-menopausa. As mulheres diabéticas em pré-menopausa apresentaram valores de ácido úrico, PCRhs e VEGF significativamente superiores, sem alterações nas concentrações de TNF- α e de adiponectina, relativamente aos controlos também em pré-menopausa [Tabela 5.6 e Figura 5.4 (b), (c), (d), (e) e (f)].

Tabela 5.6 – Marcadores de inflamação, angiogénese e lesão endotelial da população diabética feminina e controlos emparelhados para idade: influência da menopausa

Parâmetros	Mulheres Controlo			Mulheres Diabéticas			Diab vs Cont (P*)	
	Pré Menop. (n = 16)	Pós Menop. (n = 19)	P*	Pré Menop. (n = 8)	Pós Menop. (n = 45)	P*	Pré Menop	Pós Menop.
PCRhs (µg/mL)	0,18 ± 0,12	0,49 ± 0,22	0,045	1,30 ± 0,43	0,55 ± 0,07	0,047	0,045	0,038
VEGF (pg/mL)	370,32 ± 55,66	342,27 ± 65,08	0,621	585,70 ± 9,12	538,57 ± 69,28	0,601	0,038	0,012
TNF-α (pg/mL)	2,34 ± 0,86	1,93 ± 0,22	0,532	2,06 ± 0,36	3,00 ± 0,49	0,003	0,376	0,050
Adiponectina (µg/mL)	7,33 ± 1,33	10,85 ± 1,61	0,126	5,95 ± 1,66	8,86 ± 1,26	0,572	0,561	0,346
ICAM-1 (ng/mL)	581,69 ± 125,52	524,63 ± 98,49	0,831	548,96 ± 108,44	539,24 ± 59,81	0,762	0,160	0,056
Ác. úrico (mmol/L)	0,22 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,190	0,52 ± 0,12	0,79 ± 0,09	0,106	0,039	0,000

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *Os valores de P foram ajustados para a idade ou IMC, quando necessário. PCRhs, proteína C reactiva de alta sensibilidade; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; TNF-α, factor de necrose tumoral alfa; VEGF, factor de crescimento vascular endotelial; Ác. úrico, ácido úrico.

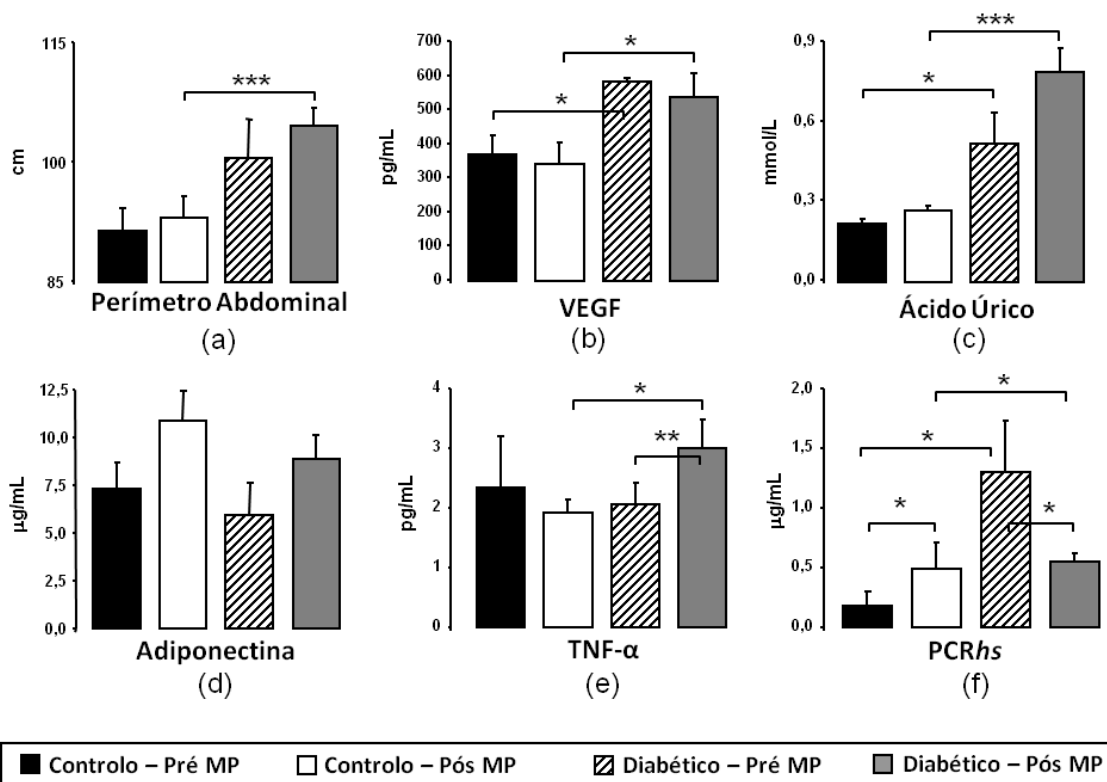


Figura 5.4 – Efeito da menopausa nas populações controlo e diabética. Perímetro abdominal (a), concentração sérica de VEGF (b) ácido úrico (c) adiponectina (d) TNF-α (e) e PCRhs (f). Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *= p<0,05; **= p<0,01; ***= p<0,001.

Quanto às diferenças antes e depois da menopausa, os controlos em pós-menopausa apresentaram conteúdos superiores de PCRhs, relativamente às mulheres

controlo em pré-menopausa, enquanto as diabéticas em pós-menopausa tinham níveis superiores de TNF- α e inferiores de PCRhs comparativamente às diabéticas em pré-menopausa [Tabela 5.6 e Figura 5.4 (e) e (f)].

5.3.5 – Análises de correlações entre marcadores nos doentes diabéticos

Os valores do perímetro abdominal na população diabética feminina foram positiva e significativamente correlacionados com os níveis de TNF- α ($r = 0,340$; $p = 0,040$), VEGF ($r = 0,414$; $p = 0,011$) e PCRhs ($r = 0,448$; $p = 0,022$), enquanto nos diabéticos homens nenhuma destas correlações foi estatisticamente significativa, encontrando-se até associações que mostraram um perfil inverso nesta população: perímetro abdominal vs VEGF e perímetro abdominal vs PCRhs ($r = -0,227$; $p = 0,164$ e $r = -0,222$; $p = 0,408$, respectivamente) [Figura 5.5 (a), (b) e (c)]. No entanto, o perímetro abdominal foi positiva e significativamente correlacionado com ácido úrico no sexo masculino ($r = 0,339$; $p = 0,035$), mas não no sexo feminino ($r = 0,250$; $p = 0,261$) [Figura 5.5 (d)]. Para além disso, também nas mulheres diabéticas, as concentrações séricas de TNF- α mostraram ter uma correlação positiva e significativa com o VEGF ($r = 0,282$; $p = 0,044$) e os níveis de PCRhs apresentaram uma correlação inversa e significativa com a adiponectina ($r = -0,590$; $p = 0,004$); estas correlações foram menos evidentes e estatisticamente não significativas no grupo dos homens diabéticos ($r = -0,027$; $p = 0,853$; $r = -0,164$; $p = 0,490$, respectivamente) [Figura 5.5 (e) e (f)].

No que respeita à população diabética em pós-menopausa, mais uma vez, houve uma correlação positiva e significativa entre o perímetro abdominal e os seguintes parâmetros: TNF- α ($r = 0,354$; $p = 0,046$), VEGF ($r = 0,446$; $p = 0,014$) e PCRhs ($r = 0,496$; $p = 0,019$) [Figura 5.6 (a), (b) e (c)]. Adicionalmente, nesta mesma população, as concentrações séricas de TNF- α mostraram ter uma correlação positiva e significativa com o VEGF ($r = 0,302$; $p = 0,040$), enquanto os níveis de PCRhs apresentaram uma correlação inversa e significativa com a adiponectina ($r = -0,534$; $p = 0,018$) [Figura 5.6 (d) e (e)]. Não foi efectuada a análise de correlação nas mulheres diabéticas em pré-menopausa devido ao número reduzido de doentes nesta subpopulação, que inviabiliza este tipo de análise.

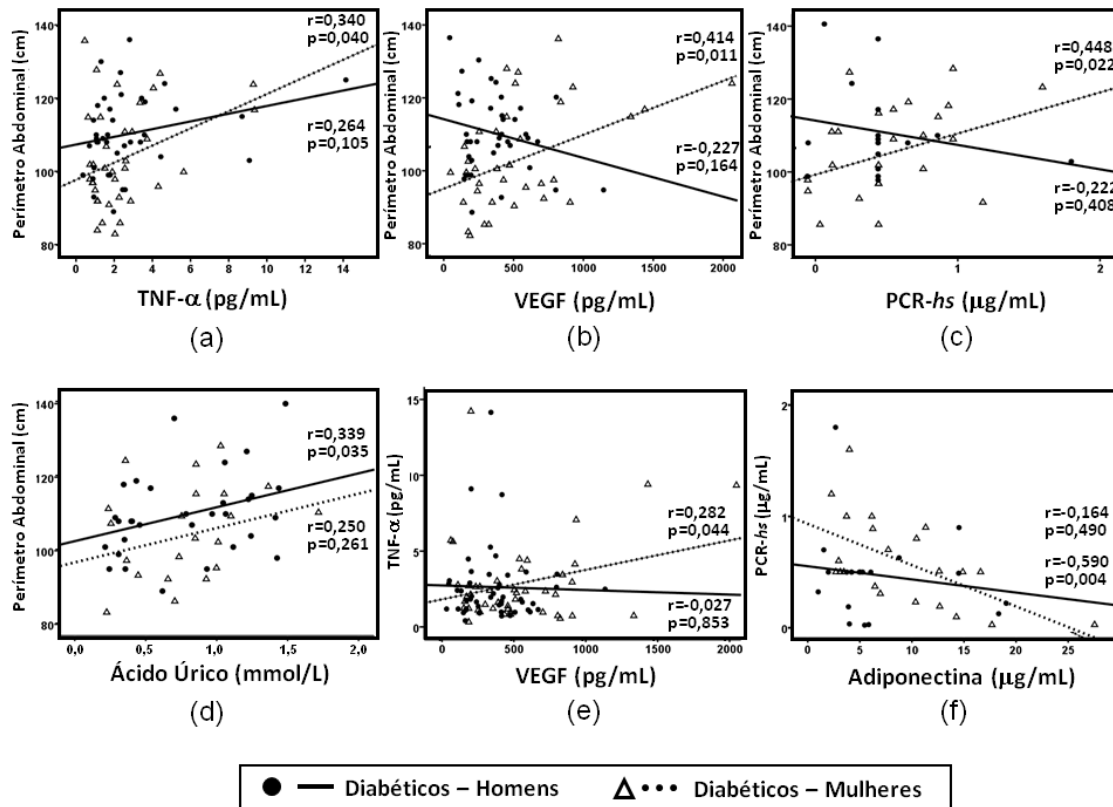


Figura 5.5 – Principais correlações nos homens e mulheres diabéticas. Correlação entre o perímetro abdominal e o TNF- α (a), VEGF (b), PCRhs (c) e ácido úrico (d); entre o TNF- α e o VEGF (e); entre a PCRhs e a adiponectina (f).

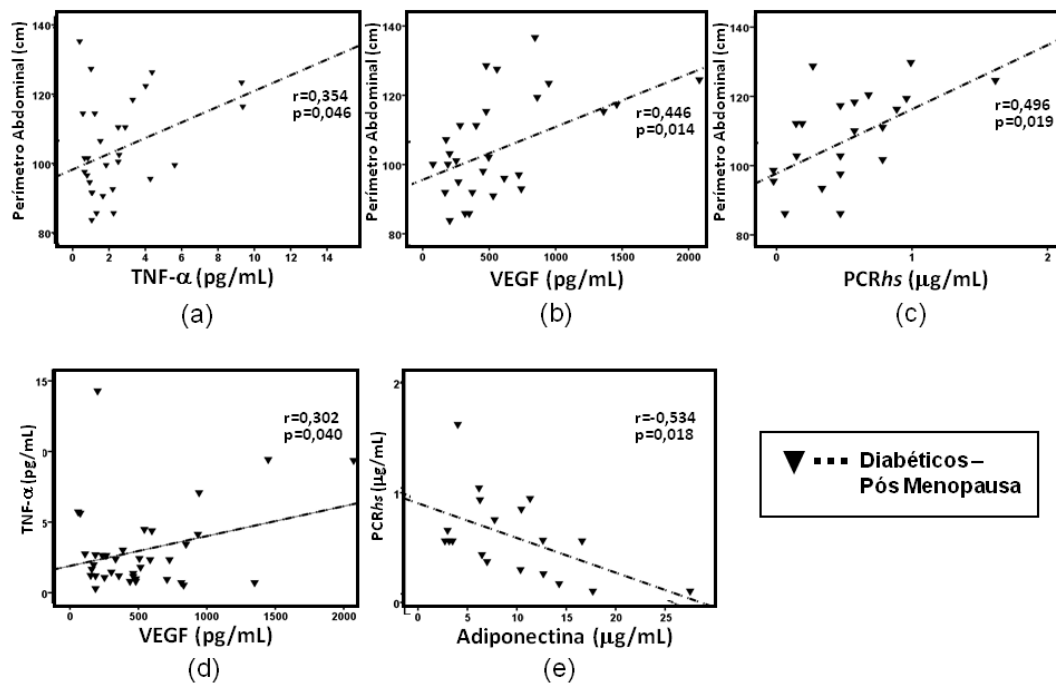


Figura 5.6 – Principais correlações nas mulheres diabéticas em pós-menopausa. Correlação entre o perímetro abdominal e o TNF- α (a), VEGF (b) e PCRhs (c); entre o TNF- α e o VEGF (d); entre a PCRhs e a adiponectina (e).

5.4 – Discussão e conclusão

Mulheres na pré-menopausa têm menor risco de DAC do que na pós-menopausa e do que os homens (Leuzzi e col., 2012; Saltiki e col., 2006). Embora estudos anteriores tenham vindo a realçar os efeitos dos estrogénios, nenhuma evidência conclusiva provou o seu papel na redução da incidência de DCV (Kaushik e col., 2010). De facto, a terapêutica hormonal de substituição para as mulheres na menopausa não confere protecção cardiovascular, de acordo com o estudo “*Women’s Health Initiative*” (Rossouw e col., 2002). Portanto, a deficiência de estrogénios pode indirectamente contribuir para o aumento do risco de DCV em mulheres em pós-menopausa. Alguns estudos sugerem que os efeitos deletérios a nível cardiovascular geralmente atribuídos à menopausa são apenas uma consequência da idade avançada das mulheres nesta fase (Casiglia e col., 2008). Contrariamente, outros estudos demonstraram que a menopausa está associada a um aumento ligeiro na gordura corporal total e uma acumulação acelerada de gordura central que excede as mudanças normalmente atribuídas ao processo de envelhecimento (Toth e col., 2000). Com efeito, a passagem da pré-menopausa para a pós-menopausa está associada ao aparecimento de vários factores de risco para a síndrome metabólica, e o aumento da incidência de DAC durante a menopausa ocorre paralelamente a um aumento da incidência de diabetes mellitus tipo 2 (Carr e col., 2003). A presença de diabetes aumenta o risco de DAC tanto nas mulheres em pré-menopausa como em pós-menopausa e, provavelmente, anula o efeito protector dos estrogénios sobre a vasculatura (Kaseta e col., 1999; Steinberg e col., 2000), de modo que as mulheres diabéticas na pré-menopausa apresentam o mesmo risco para DAC do que os homens e taxas duas a 5 vezes mais elevadas do que as mulheres não diabéticas (Kautzky-Willer e col., 2010; Pan e col., 1986). A hipertensão e a dislipidemia são factores de risco para DAC entre pacientes diabéticos e está bem estabelecido que os doentes com diabetes têm DAC mais extensa e com uma progressão mais rápida do que os indivíduos não diabéticos (Kautzky-Willer e col., 2010; Pan e col., 1986). Outros estudos mostraram que as mulheres diabéticas em geral (independentemente do estado da menopausa) têm maior risco de mortalidade por DAC do que os homens não diabéticos e do que as mulheres não diabéticas (Barrett-Connor e col., 1991). Uma vez que os FRCV tradicionais não conseguem esclarecer totalmente essas diferenças de mortalidade cardiovascular entre

géneros, mais estudos serão necessários para compreender a influência precisa do género e da menopausa no risco de DCV, especialmente em pacientes diabéticos. É importante ressaltar que mesmo apesar da medicação possível que estes doentes já estão a tomar, estes estudos continuam a mostrar um elevado risco CV nestas populações.

Este estudo comparou o efeito do género e da menopausa sobre os parâmetros/marcadores cardiovasculares numa população diabética sob medicação antidiabética, antilipidémica e anti-hipertensiva, em comparação com um grupo controlo, ajustado tanto quanto possível. Os subgrupos do género masculino e feminino, de ambas as populações (controlo e diabética), apresentavam idade, percentagem de homens/mulheres e IMC idênticos. Os valores de referência para o perímetro abdominal são diferentes entre homens e mulheres e, por isso, não podem ser comparados directamente. Como esperado, os doentes diabéticos (de ambos os géneros) apresentaram valores mais elevados de glicemia, IMC e perímetro abdominal, quando comparados com os respectivos controlos emparelhados para idade e género. No entanto, a pressão arterial, sistólica e diastólica, foi significativamente menor nos doentes diabéticos (homens e mulheres), resultado este que poderá ser justificado pela medicação anti-hipertensiva a que estes indivíduos estão sujeitos. A população controlo apresenta valores de pressão arterial ligeiramente acima dos considerados normais, o que poderá estar relacionado com a idade destes indivíduos, que foram recrutados de forma a serem comparáveis com os diabéticos, a fim de minimizar a influência do factor “idade” na análise. Para além disso, valores significativamente inferiores de c-LDL, c-Total, LDL-ox e c-nHDL (estes três últimos só na população masculina) foram encontrados nos doentes diabéticos quando comparados com os controlos. No entanto, níveis significativamente superiores de TGs e inferiores de c-HDL (este último só de forma tendencial nas mulheres) foram encontrados nos doentes diabéticos. Este perfil lipídico clássico está de acordo com o que poderá ser esperado para o tipo de terapêutica antilipidémica praticada, uma vez que as estatinas, a principal classe de fármacos utilizada, têm menos impacto nos níveis de TGs e de c-HDL do que no c-Total e c-LDL. Apesar das intervenções farmacológicas e comportamentais dirigidas para controlar os factores de risco para a doença cardiovascular em doentes diabéticos, a sua incidência permanece alarmantemente alta. A dislipidemia, uma condição associada a um aumento

da mortalidade por doença cardiovascular em indivíduos diabéticos (Zhang e col., 2009), está entre os factores de risco modificáveis mais importantes. Existe agora uma ampla variedade de fármacos antilipídicos (Pollex e col., 2008; Tenenbaum e col., 2006); no entanto, com o aumento da combinação de factores de risco comumente encontrada em várias doenças cardiovasculares, inclusive na DMT2, o controlo do c-Total e do c-LDL não é suficiente, o que requer uma modulação mais eficaz dos níveis de c-HDL, que permanece apenas ligeiramente modificado com o actual arsenal farmacológico (Cardenas e col., 2008; Sharma e col., 2009). O nosso estudo nesta população de diabéticos sob terapêutica antilipídica reforça a necessidade de uma melhor intervenção no c-HDL.

Em relação aos outros marcadores de risco cardiovascular/metabólico, os doentes diabéticos do sexo masculino apresentaram valores significativamente superiores de PCRhs e de ácido úrico e reduzidos de adiponectina, enquanto as mulheres diabéticas também apresentaram níveis significativamente mais elevados de PCRhs e de ácido úrico, bem como de TNF- α e de VEGF, para além de conteúdos tendencialmente reduzidos de adiponectina, quando comparados com os respectivos controlos. Assim, os doentes diabéticos, de ambos os géneros, mostraram um perfil cardiometabólico menos favorável, acompanhado também por um aumento do perímetro abdominal. Este perfil pró-inflamatório, um factor chave no desenvolvimento da aterosclerose, está de acordo com outros estudos que relataram um aumento de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α e PCRhs, e redução dos níveis de mediadores anti-inflamatórios e antiaterogénicos, tal como a adiponectina (Mertens e col., 2001; Calle e col., 2012). Para além disso, os níveis de adiponectina em mulheres diabéticas estão negativamente associados com a PCRhs, de acordo com um estudo recente (Miazgowski e col., 2012). No entanto, no nosso estudo o aumento dos níveis de PCRhs foi maior nas mulheres do que nos homens, de acordo com resultados anteriores (Kawamoto e col., 2011), o que pode ser devido ao aumento significativo da sua concentração nas mulheres diabéticas em pré-menopausa. Assim, embora valores significativamente mais baixos de pressão sanguínea e de c-LDL, bem como de c-Total e c-nHDL (estes últimos dois de forma tendencial, mas não significativa), resultantes da medicação a que estão sujeitas, as doentes diabéticas apresentaram obesidade e adiposidade visceral, acompanhadas por marcadores de inflamação de grau baixo, juntamente com níveis de TGs e c-HDL não corrigidos, sendo

estes últimos parâmetros menos modificáveis pelos agentes antilipidémicos mais utilizados (principalmente as estatinas). Em conjunto, estes parâmetros não controlados podem ser vistos como preditores/marcadores de um maior risco cardiometabólico nesta população diabética.

Em relação às diferenças entre géneros, as mulheres da população controlo apresentaram valores inferiores de glicemia, sem diferenças nos níveis de c-Total, TGs, c-LDL e c-nHDL, juntamente com valores reduzidos de LDL-ox, TNF- α , adiponectina e ácido úrico. No entanto, a atividade da PON1 foi igualmente inferior nas mulheres, o que pode ser explicado pela necessidade de um aumento compensatório da atividade da PON1 nos homens de forma a combater a sua maior tendência para um perfil pró-oxidativo (traduzido pelo teor significativamente aumentado de LDL-ox). Para além disto, e apesar de concentrações de c-HDL total idênticas em ambos os subgrupos, a qualidade das HDL parece ser melhor nas mulheres, pois apresentaram teores aumentados de HDL grandes e reduzidos de HDL pequenas. Portanto, em conjunto, estes dados são indicativos de um perfil cardiometabólico mais favorável em mulheres não diabéticas, comparativamente aos homens. No entanto, quando os subgrupos de doentes diabéticos são comparados, as diferenças entre os homens e mulheres são significativamente reduzidas. Na realidade, nas mulheres diabéticas quase todos os parâmetros de risco reduzido encontrados nas mulheres controlo (vs homens controlo) já não estão diferentes dos homens diabéticos, e estas apresentaram ainda valores mais elevados de HbA1c, VEGF e PCR $_{hs}$, não obstante a concentração aumentada de adiponectina, o que pode ser visto como uma exceção a este perfil cardiometabólico claramente mais desfavorável. Se comparados com os da população controlo feminina, estes resultados são ainda mais claros. As diferenças encontradas na adiponectina podem ser devidas a alterações na distribuição da gordura (que é conhecida por variar entre os sexos, com os homens exibindo mais gordura visceral e menos subcutânea), bem como ao efeito das hormonas sexuais, que estão envolvidas no metabolismo do tecido adiposo e na distribuição da gordura. Os resultados podem ser devidos a um aumento da gordura visceral na população controlo feminina (proporcionalmente maior do que a do sexo masculino). No entanto, quando se compara a população diabética feminina com a população controlo feminina verificou-se que os níveis de adiponectina foram inferiores nas mulheres diabéticas, de acordo também com dados anteriores (Goodarzi e col., 2007), o que é consistente com os resultados do nosso

estudo que mostram um pior perfil cardiometabólico nas mulheres na presença de DMT2. A diminuição significativa dos níveis de adiponectina nos homens diabéticos, quando comparados com os homens controlo, é consistente com outros estudos que sugeriram anteriormente que os baixos níveis de adiponectina estão associados com baixos níveis de testosterona nos homens com diabetes mellitus tipo 2 (Rasul e col., 2011).

As mulheres diabéticas apresentaram não só o esperado aumento de glicemia e obesidade (IMC e perímetro abdominal superiores), quando comparadas com os controlos do sexo feminino, mas também níveis aumentados de PCRhs, TNF- α , ácido úrico e VEGF, acompanhados de valores inferiores de adiponectina. Para além disso, apesar de valores inalterados do perfil lipídico clássico (c-Total e c-nHDL), e até inferiores de c-LDL, previsivelmente devido à medicação, as diabéticas mostraram um aumento dos TGs e da razão LDL-ox/c-LDL e uma menor qualidade das HDL, confirmada pela percentagem inferior de HDL grandes e superior de HDL pequenas, independentemente da quantidade de c-HDL total estar dentro dos valores normais, quando comparadas com as mulheres controlo. Os baixos níveis de c-HDL são um dos principais fatores de risco para a doença cardiovascular em diabéticos tipo 2 (Shepherd e col., 2007). Nestes doentes, os TGs estão geralmente elevados e o metabolismo do c-HDL é perturbado com evidentes alterações qualitativas e quantitativas (Taskinen e col., 2003). Apesar da crescente sustentação de evidências que indicam que a determinação das subpopulações de HDL pode adicionar uma informação importante na previsão do risco para a doença cardiovascular (Asztalos e col., 2003; Asztalos e col., 2000), os dados sobre a distribuição das subpopulações de HDL e dos seus fatores moduladores em mulheres, relativamente aos homens, são limitados, incluindo na população diabética. Os nossos resultados vão de encontro ao estudo de Russo e col. (2010), que mostraram um perfil lipídico não tradicional (razão LDL-ox/c-LDL) e das subpopulações de HDL mais aterogénico para as mulheres diabéticas.

Alguns dos marcadores de risco cardiometabólico analisados mostraram correlações importantes na população de mulheres diabéticas, em contraposição com os dados obtidos na população masculina, o que reforça os dados e as indicações anteriores. De facto, o perímetro abdominal nas mulheres diabéticas correlacionou-se positiva e significativamente com as concentrações de PCRhs, TNF- α e VEGF, o que não foi encontrado nos homens diabéticos, para os quais o aumento do ácido úrico parece ser o factor que melhor se associa com o perímetro abdominal. Para além disso, os conteúdos

de TNF- α estavam positiva e significativamente correlacionados com os níveis de VEGF e as concentrações de PCRhs estavam significativa e inversamente correlacionadas com os valores de adiponectina, só no grupo das mulheres diabéticas. Em conjunto, estes dados sugerem que a obesidade (especialmente a adiposidade abdominal) em indivíduos diabéticos do sexo feminino seja metabolicamente mais ativa e, conseqüentemente, mais nefasta do que no género masculino. Esta informação está de acordo com o facto de que as mulheres com DMT2, quando comparadas com mulheres não diabéticas de idade comparável, exibem taxas mais elevadas de morte relacionadas com a DAC, com taxas de eventos quase idêntica às observadas nos homens com DMT2 (Pan e col., 1986). Os nossos dados sugerem que a diabetes anula o efeito protetor do género conferido às mulheres não diabéticas, o que confirma que o risco de DCC é maior nos homens, mas que esta diferença é reduzida na presença de DMT2 (Liu e col., 2011). No entanto, os FRCV tradicionais não conseguem explicar completamente as diferenças entre géneros, e os novos marcadores ("não-clássicos") parecem ser capazes de melhorar o conhecimento e esclarecer esta discrepância, em particular por conseguirem mostrar um perfil lipídico mais aterogénico e pró-inflamatório, bem como mais pró-angiogénico, visto principalmente pelo conteúdo menos protector das subpopulações de HDL e pelos valores aumentados de TNF- α , PCRhs e VEGF.

No que diz respeito à influência da menopausa, a glicemia foi significativamente superior na população diabética (quer na fase de pré ou de pós-menopausa). No entanto, após a menopausa as mulheres diabéticas apresentaram um aumento significativo de IMC e de perímetro abdominal, quando comparados com os do respectivo controlo em pós-menopausa; estas alterações não foram observadas entre as populações na fase de pré-menopausa. A pressão arterial sistólica também foi significativamente mais elevada após a menopausa, para ambas as populações (controlo e diabéticos). Contudo, os doentes diabéticos apresentaram valores significativamente reduzidos de PAD, quando comparados com a população controlo, tanto na fase de pré como de pós-menopausa, o que pode ser devido à medicação anti-hipertensiva a que a população diabética está sujeita. Em relação ao perfil lipídico clássico, tanto na população controlo como na diabética, não foram encontradas alterações entre as mulheres pré e pós-menopausa para o c-Total, TGs, c-LDL e c-nHDL. Para além disso, só na pós-menopausa, se verificou uma redução de c-LDL nas doentes diabéticas, quando comparadas com as respectivas

mulheres controlo. Este perfil está de acordo, mais uma vez, com o tipo de terapêutica antilipidémica praticada por estes doentes, principalmente a toma de estatinas, que diminuem o c-Total e o conteúdo em c-LDL, mas que têm menor impacto sobre os TGs e o c-HDL. Com efeito, as concentrações séricas de TGs estavam significativamente mais elevadas, mas somente nas mulheres diabéticas em pós-menopausa, quando comparadas com as controlo pós-menopáusicas, apesar da medicação. Para além disso, embora a concentração de c-HDL total não tenha sido diferente nas mulheres diabéticas em pré e pós-menopausa, quando comparadas com as subpopulações controlo correspondentes, na pós-menopausa a qualidade das HDL foi pior, pois verifica-se uma percentagem significativamente reduzida de HDL grandes e aumentada de HDL pequenas. Embora mais estudos sejam necessários para esclarecer o papel complexo das diferentes subpopulações de HDL no desenvolvimento da doença coronária, várias evidências indicam que a avaliação do perfil das HDL (subpopulações) pode fornecer algumas informações adicionais sobre a definição de risco de doença cardiovascular, independentemente da medição de c-HDL total (Asztalos e col., 2003; Asztalos e col., 2000). Os nossos dados reforçam claramente esta recomendação, em particular nas mulheres com diabetes em pós-menopausa, nas quais a qualidade do HDL é notoriamente menos favorável.

Em relação aos outros marcadores de risco cardiovascular/metabólico, antes da menopausa as mulheres diabéticas apresentaram níveis séricos significativamente aumentados de ácido úrico, PCR_{hs} e VEGF, com uma tendência para valores reduzidos de adiponectina, quando comparadas com as mulheres não diabéticas. Estas alterações foram mantidas após a menopausa, acompanhadas também por um aumento da concentração de TNF- α . Nesta população, algumas associações importantes foram encontradas entre alguns dos marcadores de risco cardiometabólico. O perímetro abdominal nas mulheres diabéticas em pós-menopausa estava positiva e significativamente correlacionado com as concentrações de PCR_{hs}, TNF- α e VEGF. Para além disso, os conteúdos de TNF- α estavam positiva e significativamente correlacionados com os níveis de VEGF, e as concentrações de PCR_{hs} significativa e inversamente correlacionadas com os valores de adiponectina. Deste modo, as diabéticas em pós-menopausa têm um aumento da obesidade, que parece ser metabolicamente mais prejudicial do que nas mulheres diabéticas em pré-menopausa, principalmente devido à

obesidade induzida pela inflamação crónica de grau baixo, através da maior expressão de citocinas derivadas do tecido adiposo, de acordo com estudos recentes (Göb e col., 2012). A transição da pré para a pós-menopausa pode estar relacionada com as características da síndrome metabólica, incluindo um aumento da gordura corporal central, o que aponta para um perfil lipídico mais aterogénico, bem como outros factores de risco. Curiosamente, a diferença entre os géneros, que normalmente desaparece após a menopausa, é perdida rapidamente em doentes com DMT2 na pré-menopausa, atingindo a DCV taxas duas a 5 vezes mais elevadas do que em mulheres não diabéticas (Kautzky-Willer e col., 2010). Na verdade, as mulheres com diabetes mellitus tipo 2, relativamente às mulheres não diabéticas de idade comparável, exibem taxas de morte relacionadas com a doença arterial coronária significativamente maiores, semelhantes às observadas em homens com DMT2 (Pan e col., 1986). O surgimento de factores de risco cardiovasculares nas mulheres em pós-menopausa pode ser um resultado directo da falência ovariana, ou um resultado indirecto das consequências metabólicas resultantes da centralização da gordura do corpo devido à deficiência de estrogénios. Estudos anteriores demonstraram que a menopausa está associada com um aumento modesto na gordura total e com uma mais rápida acumulação de gordura na zona central do corpo, que excede mudanças normalmente atribuídas ao processo de envelhecimento (Toth e col., 2000; Lin e col., 2006). Da mesma forma, no nosso estudo, as mulheres em pós-menopausa quando comparadas com as mulheres em pré-menopausa, tinham níveis aumentados de perímetro abdominal, triglicéridos e de marcadores não clássicos, sugerindo assim um perfil cardiometabólico menos favorável. Trabalhos anteriores indicaram que as mulheres diabéticas na pós-menopausa desenvolvem DAC mais grave em comparação com mulheres não diabéticas. Esta associação é independente de outros factores predisponentes e sugere um efeito independente de DMT2 no processo aterosclerótico, pelo menos em mulheres após a menopausa (Saltiki e col., 2008). Apesar do pequeno número de mulheres diabéticas em pré-menopausa, que pode ser visto como uma limitação do estudo, e que merece reforço, as mulheres diabéticas na pós-menopausa têm um perfil cardiometabólico claramente pior. Com efeito, ainda que vários parâmetros não estejam alterados entre mulheres diabéticas em pré-menopausa quando comparadas com os seus controlos em pré-menopausa, eles agravam-se nas mulheres diabéticas em pós-menopausa, em comparação com o respectivo controlo em

pós-menopausa, incluindo um aumento significativo dos TGs, HDL pequenas, perímetro abdominal, IMC, e TNF- α , e níveis significativamente inferiores de HDL grandes. Em conjunto, os nossos dados reforçam que um tratamento multidirecionado para vários fatores de risco é ainda mais justificado em mulheres na pós-menopausa, o que é sugerido principalmente através de marcadores de risco não-tradicionais para esta população de diabéticos já medicados para a hipertensão e dislipidemia. A aparentemente mais deletéria obesidade visceral, o perfil lipídico mais aterogénico e o perfil pró-inflamatório em pacientes diabéticos em geral, mas em particular nas mulheres pós-menopausa, requer uma atenção mais precisa e uma intervenção multiterapêutica cada vez mais apropriada.

Em conclusão, o nosso estudo sugere que a diabetes anula o efeito protector conferido ao sexo feminino em mulheres não diabéticas quando comparadas com os homens, e que as mulheres diabéticas em pós-menopausa apresentam um pior perfil cardiometabólico, incluindo um perfil lipídico mais aterogénico, pró-inflamatório e pró-angiogénico. Os FRCV tradicionais não conseguem explicar completamente estas diferenças, que ficam mais bem esclarecidas com marcadores "não-clássicos", tais como os teores das subpopulações de HDL (em detrimento do conteúdo total de c-HDL), e alguns mediadores de inflamação e angiogénese, nomeadamente TNF- α e VEGF, quando se pretende avaliar a diferença de risco entre géneros, numa população diabética; enquanto que o risco da entrada na menopausa nas mulheres diabéticas pode ser mais bem avaliado/prevenido avaliando as subpopulações de HDL, parâmetros de obesidade (perímetro abdominal e IMC), TGs e TNF- α . Uma intervenção multiterapêutica, dirigida sobretudo para a obesidade, partículas lipídicas aterogénicas e mediadores inflamatórios, é recomendável, a fim de evitar mais eficazmente as graves complicações cardiovasculares da diabetes nesta população de maior risco.

5.5 – Referências

- Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, et al. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(12):2670-6.
- Asztalos BF, Schaefer EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atherosclerosis* 2003; 4(1):21-9.
- Barr EL, Zimmet PZ, Welborn TA, et al. Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation* 2007; 116(2):151-7.
- Barrett-Connor EL, Cohn BA, Wingard DL, et al. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. *JAMA* 1991; 265(5):627-31.
- Calle MC, Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2012; 38(3):183-91.
- Cardenas GA, Lavie CJ, Cardenas V, et al. The importance of recognizing and treating low levels of high-density lipoprotein cholesterol: a new era in atherosclerosis management. *Rev Cardiovasc Med* 2008; 9(4):239-58.
- Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(6):2404-11.
- Casiglia E, Tikhonoff V, Caffi S, et al. Menopause does not affect blood pressure and risk profile, and menopausal women do not become similar to men. *J Hypertens* 2008; 26(10):1983-92.
- Cortez-Dias N, Martins S, Belo A, et al. VALSIM. Prevalence, management and control of diabetes mellitus and associated risk factors in primary health care in Portugal. *Rev Port Cardiol* 2010; 29(4):509-37.
- Dehghan A, van Hoek M, Sijbrands EJ, et al. High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31(2):361-2.
- Eckel RH, Kahn R, Robertson RM, et al. Preventing cardiovascular disease and diabetes: a call to action from the American Diabetes Association and the American Heart Association. *Diabetes Care* 2006; 29(7):1697-9.
- Fox CS: Cardiovascular disease risk factors, type 2 diabetes mellitus, and the Framingham Heart Study. *Trends Cardiovasc Med* 2010; 20(3):90-95.
- Gardete-Correia L, Boavida JM, Raposo JF, et al. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. *Diabet Med* 2010; 27(8):879-81.
- Göbl CS, Bozkurt L, Lueck J, et al. Sex-specific differences in long-term glycemic control and cardiometabolic parameters in patients with type 1 diabetes treated at a tertiary care centre: gender aspects in type 1 diabetes. *Wien Klin Wochenschr* 2012; 124(21-22):742-9.
- Goodarzi MT, Babaahmadi-Rezaei H, Kadkhodaei-Eliaderani M, et al. Relationship of serum adiponectin with blood lipids, HbA(1)c, and hs-CRP in type II diabetic postmenopausal women. *J Clin Lab Anal* 2007; 21(3):197-200.
- Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, et al. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 339(4):229-34.
- Hagberg CE, Mehlem A, Falkevall A, et al. Targeting VEGF-B as a novel treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490(7420):426-30.
- Hayden MR, Tyagi SC. Isolated low high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C): implications of global risk reduction. Case report and systematic scientific review. *Cardiovasc Diabetol* 2005; 4(1):1.

- Huang SS, Huang PH, Chen YH, et al. Association of adiponectin with future cardiovascular events in patients after acute myocardial infarction. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17(3):295-303.
- Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, et al. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26 year follow up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983; 67(5):968-77.
- Hyvärinen M, Tuomilehto J, Laatikainen T, et al. The impact of diabetes on coronary heart disease differs from that on ischaemic stroke with regard to the gender. *Cardiovasc Diabetol* 2009; 8:17.
- Kaseta JR, Skafar DF, Ram JL, et al. Cardiovascular disease in the diabetic woman. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(6):1835-8.
- Kaushik M, Sontineni SP, Hunter C. Cardiovascular disease and androgens: a review. *Int J Cardiol* 2010; 142(1):8-14.
- Kautzky-Willer A, Kamyar MR, Gerhat D, Handisurya et al. Sex-specific differences in metabolic control, cardiovascular risk, and interventions in patients with type 2 diabetes mellitus. *Gen Med* 2010; 7(6):571-83.
- Kawamoto R, Tabara Y, Kohara K, et al. Association between fasting plasma glucose and high-sensitivity C-reactive protein: gender differences in a Japanese community-dwelling population. *Cardiovasc Diabetol* 2011; 10:51.
- Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002; 288(21):2709-16.
- Leuzzi C, Marzullo R, Modena MG. Is menopause a risk factor for ischemic heart disease in women? *G Ital Cardiol* 2012, 13(6):401-6.
- Li Q, Yang Z, Lu B, et al. Serum uric acid level and its association with metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2011; 10:72.
- Lin W-Y, Yang W-S, Lee L-T, et al. Insulin resistance, obesity, and metabolic syndrome among non-diabetic pre- and post-menopausal women in North Taiwan. *Int J Obes* 2006; 30(6):912-7.
- Liu Z, Ho SC. The association of serum C-reactive protein, uric acid and magnesium with insulin resistance in Chinese postmenopausal women with prediabetes or early untreated diabetes. *Maturitas* 2011; 70(2):176-81.
- Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004; 4(4):211-7.
- Mangge H, Almer G, Truschnig-Wilders M, et al. Inflammation, adiponectin, obesity and cardiovascular risk. *Curr Med Chem* 2010; 17(36):4511-20.
- Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001; 15(12):2073-84.
- Miazgowski T, Noworyta-Zietara M, Safranow K, et al. Serum adiponectin, bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women with newly diagnosed Type 2 diabetes: a 12-month follow-up. *Diabet Med* 2012; 29(1):62-9.
- Pan WH, Cedres LB, Liu K, et al. Relationship of clinical diabetes and asymptomatic hyperglycemia to risk of coronary heart disease mortality in men and women. *Am J Epidemiol* 1986; 123(3):504-16.
- Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. High-density lipoprotein subfractions - what the clinicians need to know. *Cardiology* 2013; 124(2):116-25.
- Pollex RL, Joy TR, Hegele RA. Emerging antidyslipidemic drugs. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008; 13(2):363-81.

- Pyorala K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3(2):463-524.
- Rasul S, Ilhan A, Reiter MH, et al. Relations of adiponectin to levels of metabolic parameters and sexual hormones in elderly type 2 diabetic patients. *Gend Med* 2011; 8(2):93-102.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288(3):321-33.
- Russo GT, Horvath KV, Di Benedetto A, et al. Influence of menopause and cholesteryl ester transfer protein (CETP) TaqIB polymorphism on lipid profile and HDL subpopulations distribution in women with and without type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2010; 210(1):294-301.
- Saltiki K, Cimponeriu A, Lili K, et al. Severity of coronary artery disease in postmenopausal diabetic women. *Hormones* 2008; 7(2):148-55.
- Saltiki K, Doukas C, Kanakakis J, et al. Severity of cardiovascular disease in women: relation with exposure to endogenous estrogen. *Maturitas* 2006; 55(1):51-7.
- Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet* 2010; 375(9733):2215-22.
- Sharma RK, Singh VN, Reddy HK. Thinking beyond low-density lipoprotein cholesterol: strategies to further reduce cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5:793-9.
- Shepherd J. Dyslipidaemia in diabetic patients: time for a rethink. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9(5):609-16.
- Steinberg HO, Paradisi G, Cronin J, et al. Type II diabetes abrogates sex differences in endothelial function in premenopausal women. *Circulation* 2000; 101(17):2040-6.
- Taskinen MR. Diabetic dyslipidemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 2003; 46(6):733-49.
- Tenenbaum A, Fisman EZ, Motro M, et al. Atherogenic dyslipidemia in metabolic syndrome and type 2 diabetes: therapeutic options beyond statins. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5:20.
- Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, et al. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(2):226-31.
- Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(5):1047-53.
- Zhang L, Qiao Q, Tuomilehto J, et al. The impact of dyslipidaemia on cardiovascular mortality in individuals without a prior history of diabetes in the DECODE Study. *Atherosclerosis* 2009; 206(1):298-302.

Capítulo 6

Biomarcadores do risco cardiovascular precoce em doentes com esclerose múltipla – enfoque nas subpopulações de HDL e nas LDL oxidadas

Publicado sob o formato:

Palavra F, Marado D, Mascarenhas-Melo F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Nunes CC, Gonçalves G, Teixeira F, Reis F. New markers of early cardiovascular risk in multiple sclerosis patients: oxidized-LDL correlates with clinical staging. *Disease Markers* 2013; 34(5):341-8.

6.1 – Introdução

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), com um componente neurodegenerativo importante, sendo responsável por muita da incapacidade neurológica encontrada em adultos jovens. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a sua prevalência média é de 80 em 100 000 pessoas na Europa. A etiologia exacta da doença ainda é desconhecida, embora os dados epidemiológicos indiquem que fatores genéticos e ambientais são importantes (Ramagopalan e col., 2010). Apesar dos dados ainda serem escassos, alguns estudos apontam para um aumento do risco cardiovascular (RCV) em doentes com EM, quando comparados com indivíduos de idade semelhante (Acevedo e col., 2000; Christiansen e col., 2010; Ranadive e col., 2012). Pacientes com EM apresentam disfunção autonómica (Merkelbach e col., 2006), aumento da pressão arterial e taquicardia (Sanya e col., 2005), distúrbios ventriculares (Olindo e col., 2002) e desequilíbrios entre vasoconstritores e vasodilatadores, tais como prostaglandinas e monóxido de azoto (NO) (Kanabrocki e col., 2004; Mirshafiey e col., 2010). No entanto, ainda não existe uma explicação clara e abrangente para todos os aspectos descritos.

O conteúdo e/ou a funcionalidade das lipoproteínas, para além de se relacionar directamente com o risco aterosclerótico, pode desempenhar ainda um papel importante no desenvolvimento e progressão da EM (Weinstock-Guttman e col., 2011). A paraoxonase 1 (PON1) é uma enzima que está ligada às lipoproteínas de alta densidade (HDL) e pensa-se que possa ser responsável pelas propriedades anti-aterogénicas e antioxidantes atribuídas a essas lipoproteínas, conferindo também protecção contra a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-ox) (Mackness e col., 2004). Vários estudos têm mostrado uma forte relação entre a sua actividade e o desenvolvimento da aterosclerose. No entanto, o seu potencial envolvimento na doença aterosclerótica prematura em pacientes com EM continua por esclarecer.

Sabe-se que a EM é, pelo menos nas suas fases mais precoces, uma doença predominantemente inflamatória. A inflamação crónica é um factor importante a ser considerado no desenvolvimento da aterosclerose, também contribuindo para aumentar o RCV global. Para além disso, os desequilíbrios inflamatórios, objectivados pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e/ou pela redução de moléculas anti-

inflamatórias e anti-aterogénicas, incluindo a adiponectina, têm sido considerados factores chave para o RCV em outras patologias (Mangge e col., 2010; Huang e col., 2010) e merecem também atenção na EM. Um efeito similar tem sido atribuído ao fenómeno da angiogénese, considerando-se o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) um novo biomarcador de importância crescente (Girardi e col., 2010; Iacobaeus e col., 2011).

Neste contexto, e considerando a limitada informação disponível sobre o papel dos novos biomarcadores para a avaliação do risco cardiometabólico em doentes com EM, procurámos com este estudo caracterizar uma população de doentes (não só em termos de factores de RCV clássicos, mas acima de tudo usando novos biomarcadores) e, em comparação com controlos, identificar os marcadores potencialmente mais relevantes e estudar a sua possível correlação com a atividade clínica da doença (avaliada pela *Kurtzke's Expanded Disability Status Scale* [EDSS]) (Kurtzke e col., 1983).

6.2– População e métodos

6.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas

Trinta doentes com EM (com idades compreendidas entre os 18 e os 51 anos) e 66 voluntários saudáveis (com idades compreendidas entre os 16 e os 55 anos) sem qualquer doença neurológica ou cardiovascular conhecida (e funcionando como um grupo de controlo), foram incluídos no estudo. Os 66 indivíduos controlo foram recrutados durante a realização de testes laboratoriais de rotina num laboratório de análises clínicas (Laboratório de Análises Clínicas Soares & Figueiredo, de Viseu). Os voluntários não estavam a tomar qualquer medicação e não declararam nenhuma doença diagnosticada.

Relativamente ao grupo de doentes foram incluídos 30 indivíduos com EM surto-remissão, em seguimento regular na Consulta de Doenças Desmielinizantes do Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E. (dos Covões), e satisfazendo os seguintes critérios de inclusão: 1) terem idade compreendida entre 18 e 55 anos; 2) terem diagnóstico de EM surto-remissão há pelo menos 6 meses, de acordo com a revisão de 2005 dos critérios de

McDonald (Polman e col., 2011); 3) estarem sob tratamento estável com fármacos imunomoduladores de primeira linha (acetato de glatirâmero ou interferão beta) ou natalizumab há pelo menos 3 meses. Consideraram-se como critérios de exclusão: 1) história de surto de EM nos últimos 3 meses; 2) tratamento com corticosteróides nos últimos 3 meses; 3) história de doenças auto-imunes e inflamatórias concomitantes, para além da EM e 4) evidência clínica e laboratorial de infeção nos últimos 3 meses.

Para além da esclerose múltipla, relativamente à existência de patologias do foro cardiovascular, apenas um doente tinha hipercolesterolemia e hipertensão e outro tinha diabetes tipo 1. Os doentes estavam sob os seguintes tratamentos: interferão beta-1a (n=10), interferão beta-1b (n=8), acetato de glatirâmero (n=7), natalizumab (n=5), inibidores seletivos da recaptção da serotonina (n=8), anti-depressivos tricíclicos (n=4), benzodiazepinas (n=4), inibidores dos canais de cálcio dependentes de voltagem (n=1), inibidores da enzima de conversão da angiotensina (n=1) e estatinas (n=1).

O estudo foi realizado de acordo com o código de ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsínquia) para estudos em humanos e recebeu autorização dos comités de ética locais, bem como de todos os participantes, que leram e assinaram por escrito um termo de consentimento informado.

6.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue

A recolha de dados e colheita de sangue foram realizadas de acordo com o descrito na sessão 4.2.2.

6.2.3 – Determinações analíticas

Foram doseados os parâmetros segundo os métodos descritos na sessão 4.2.3.

6.2.4 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows, versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, EUA). A distribuição das variáveis contínuas foi analisada utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov, para avaliar desvios significativos da normalidade. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o t-teste de amostras independentes e o teste

de Mann-Whitney, consoante as variáveis seguiam distribuição normal ou não, respectivamente, para cada população em análise. A associação entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste de Pearson. Foi considerado estatisticamente significativo um *P* menor que 0,05.

6.3– Resultados

6.3.1 – Caracterização geral da população

Os dados demográficos e antropométricos dos doentes e controlos estão resumidos na Tabela 6.1. Trinta doentes com EM foram recrutados, 7 homens e 23 mulheres, e foram comparados com 66 controlos de género e idade equiparáveis, 16 homens e 50 mulheres.

Tabela 6.1 – Dados demográficos, antropométricos e estadio clínico dos doentes com Esclerose Múltipla (EM) e dos seus controlos emparelhados para a idade e género

Parâmetros	Controlos (n = 66)	Doentes com EM (n = 30)	<i>P</i>
EDSS (0 to 10)	—	2,30 ± 0,26	—
Género (M/F) [n(%)]	16/50 (24%/76%)	7/23 (23%/77%)	—
Idade (anos)	35,62 ± 1,25	34,53 ± 1,60	0,613
IMC (Kg/m ²)	25,15 ± 0,54	25,07 ± 0,76	0,931
Perímetro abdominal (cm)	89,31 ± 1,35	87,41 ± 2,04	0,436
PAS (mmHg)	125,58 ± 2,15	116,00 ± 1,77	0,011
PAD (mmHg)	80,26 ± 1,42	72,27 ± 1,60	0,001
Glicemia (mmol/L)	4,86 ± 0,06	5,36 ± 0,31	0,739

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. EDSS, *Expanded Disability Status Scale*; IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica.

Todos os doentes foram clinicamente avaliados utilizando a EDSS à data do início do estudo, apresentando um valor médio de 2,30 ± 0,26 pontos, o que significa, de acordo com a escala, "incapacidade mínima em um sistema funcional" (a EDSS varia de 0 [sem incapacidade] a 10 [morte por EM]). O IMC e o perímetro abdominal foram

idênticos nos 2 grupos; os valores de PAS e de PAD dos doentes foram significativamente menores, em comparação com os do grupo controlo ($p = 0,001$ para ambos) (Tabela 6.1).

6.3.2 – Perfis glicídico e lipídico clássicos

Não se verificam diferenças de glicemia entre os grupos (Tabela 6.1).

Em termos de perfil lipídico clássico, foi observada uma diferença significativa entre doentes e controlos relativamente a: 1) teores séricos de TGs, que foram maiores nos pacientes com EM ($p = 0,000$) (Tabela 6.2) e 2) concentrações séricas de c-LDL, menores no grupo de doentes ($p = 0,016$) [Tabela 6.2 e Figura 6.1 (a)]. Apesar destas diferenças, particularmente em relação aos valores dos TGs nos doentes com EM, deve ressaltar-se que os valores encontrados estão dentro do intervalo considerado normal ($< 3,9$ mmol/L). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de c-Total e c-HDL [Tabela 6.2 e Figura 6.2 (a)] entre ambos os grupos ($p = 0,403$ e $p = 0,854$, respectivamente). É de salientar que apenas um doente se encontrava sob tratamento com uma estatina (rosuvastatina, 5 mg por dia).

Tabela 6.2 – Perfil lipídico dos doentes com Esclerose Múltipla (EM) e controlos emparelhados para a idade e género

Parâmetros	Controlos (n=66)	Doentes com EM (n=30)	P
c-Total (mmol/L)	4,98 ± 0,09	4,85 ± 0,14	0,403
TGs (mmol/L)	0,99 ± 0,06	1,60 ± 0,18	0,000
c-LDL (mmol/L)	3,01 ± 0,08	2,64 ± 0,14	0,016
LDL-ox (U/L)	30,15 ± 1,37	98,56 ± 5,79	0,000
LDL-ox/c-LDL	9,98 ± 0,35	37,41 ± 1,53	0,000
c-HDL (mmol/L)	1,51 ± 0,05	1,53 ± 0,06	0,854
HDL grandes (%)	40,38 ± 2,25	33,92 ± 1,68	0,024
HDL intermédias (%)	43,88 ± 1,29	47,23 ± 0,84	0,032
HDL pequenas (%)	15,69 ± 1,15	18,85 ± 1,14	0,044
c-nHDL (mmol/L)	3,47 ± 0,09	3,32 ± 0,15	0,611
c-Total/c-HDL	3,56 ± 0,15	3,33 ± 0,16	0,401
c-LDL/c-HDL	2,21 ± 0,12	1,80 ± 0,13	0,041
PON1 (U/mL/min)	458,16 ± 18,04	482,62 ± 31,11	0,484

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. c-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade; c-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; LDL-ox, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas; PON1, paraoxonase 1; TGs, triglicéridos; c-Total, colesterol total; c-nHDL, colesterol não HDL.

6.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1

Quando se avaliaram novos marcadores bioquímicos de RCV, o perfil lipídico (aparentemente protector) descrito para os doentes com EM mudou notoriamente: as LDL-ox estavam significativamente mais elevadas nos doentes ($p = 0,000$) [Tabela 6.2 e Figura 6.1 (b)], associado a uma maior razão LDL-ox/c-LDL ($p = 0,000$) [Tabela 6.2 e Figura 6.1 (c)]. Uma diferença no mesmo sentido, foi obtida para as partículas menos protectoras de HDL (HDL pequenas), acompanhadas de uma redução das HDL grandes ($p = 0,044$ e $p = 0,024$, respectivamente) [Tabela 6.2 e Figura 6.2 (b) e (c)]. A actividade da PON1 foi semelhante entre os grupos ($p = 0,484$).

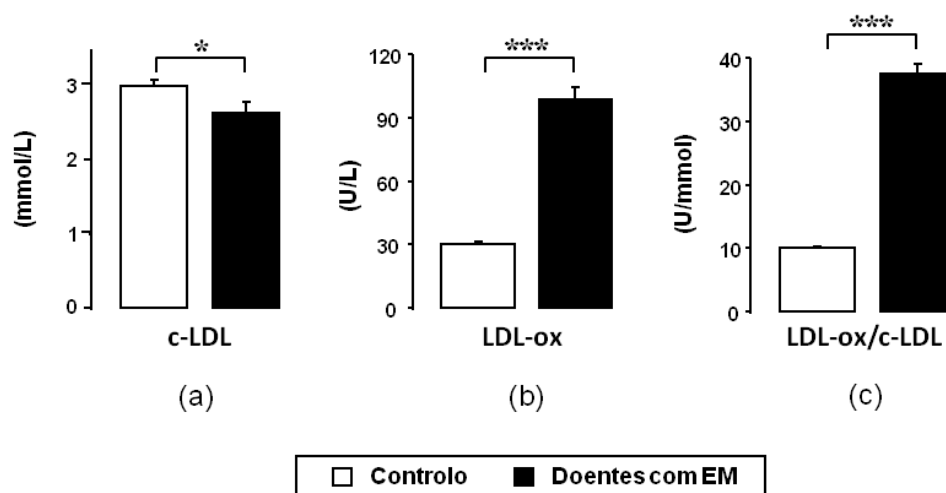


Figura 6.1 – Concentração sérica de c-LDL (a) LDL-ox (b) e LDLox/c-LDL (c) na população controlo e nos doentes com EM. Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. *= $P < 0,05$; ***= $P < 0,001$.

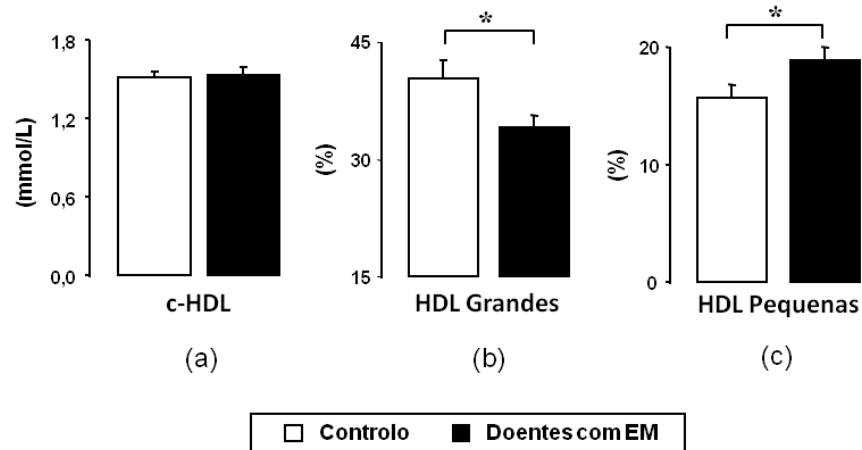


Figura 6.2 – Concentração sérica de c-HDL (a) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (b) e HDL pequenas (c) na população controlo e nos doentes com esclerose múltipla. Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. *= P<0,05.

6.3.4 - Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial

A concentração sérica de PCRhs foi mais elevada nos doentes com EM ($p = 0,000$), o que parece ser contrabalançado por uma maior concentração de adiponectina, uma molécula anti-inflamatória ($p = 0,030$) [Tabela 6.3 e Figura 6.3]. Apesar de não atingir uma significância estatística, os níveis de VEGF foram tendencialmente mais elevados nos pacientes com EM, relativamente à população controlo. Os valores de TNF- α não foram diferentes entre os grupos ($p = 0,530$) (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 – Marcadores inflamatórios, angiogénicos e de lesão endotelial dos doentes com Esclerose Múltipla (EM) e controlos emparelhados para a idade e género

Parâmetros	Controlos (n=66)	Doentes com EM (n=30)	P
PCRhs ($\mu\text{g/mL}$)	0,32 ± 0,08	0,63 ± 0,07	0,000
VEGF (pg/mL)	307,33 ± 34,86	326,10 ± 33,39	0,358
TNF- α (pg/mL)	1,69 ± 0,31	1,39 ± 0,12	0,530
Adiponectina ($\mu\text{g/mL}$)	9,77 ± 0,94	13,23 ± 1,31	0,030
ICAM-1 (ng/mL)	543,71 ± 101,90	559,84 ± 59,92	0,721

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. PCRhs, protein C reactiva de alta sensibilidade; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; TNF- α , factor de necrose tumoral alfa; VEGF, factor de crescimento vascular endotelial.

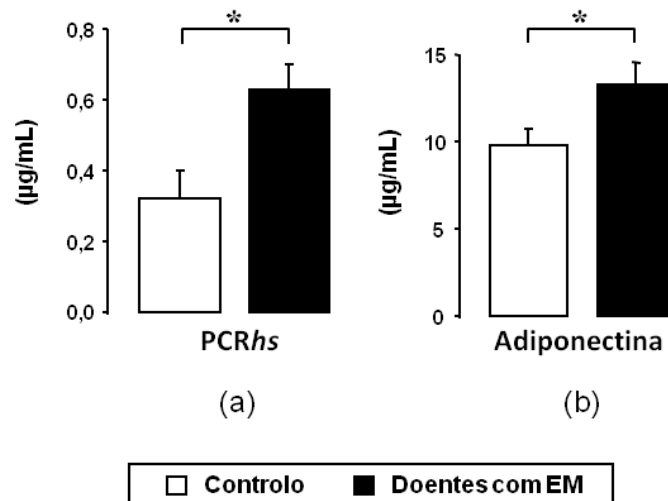


Figura 6.3 – Concentração sérica de PCRhs (a) e adiponectina (b) na população controlo e nos doentes com esclerose múltipla. Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. *= $P < 0,05$.

6.3.5 – Análise de correlação entre marcadores nos doentes com EM

Em estudos de correlação, tentando estabelecer-se uma ponte entre as determinações laboratoriais e a actividade clínica da doença, avaliada pela pontuação na EDSS, foi encontrada uma positiva e significativa correlação entre a EDSS e as LDL-ox ($r=0,458$; $p=0,011$), bem como entre a EDSS e os níveis séricos de c-LDL ($r=0,366$; $p=0,050$) [Figura 6.4 (a)]. Uma correlação semelhante também foi encontrada entre o c-LDL e o conteúdo de LDL-ox ($r=0,742$; $p=0,001$) [Figura 6.4 (b)]. Os níveis séricos de VEGF também foram positiva e significativamente correlacionados com o teor em LDL-ox ($r=0,453$; $p=0,014$) e com o conteúdo de c-LDL ($r=0,459$; $p=0,014$) [Figura 6.5 (a)]. Uma relação semelhante foi encontrada entre a razão c-LDL/c-HDL e as LDL-ox ($r=0,582$; $p=0,001$), mas de forma inversa com os níveis séricos de adiponectina ($r=-0,468$; $p=0,011$) [Figura 6.5 (b)]. Também a razão c-LDL/c-HDL se correlacionou de forma significativa com as subpopulações de HDL: directa com as HDL pequenas ($r=0,388$; $p=0,037$) e inversa com as HDL grandes ($r=-0,424$; $p=0,022$) [Figura 6.6 (b)]; outra correlação interessante e significativa foi a encontrada entre a adiponectina e as subpopulações de HDL: de forma directa com as HDL grandes ($r=0,402$; $p=0,028$) e inversa com as HDL pequenas ($r=-0,359$; $p=0,050$) [Figura 6.6 (a)].

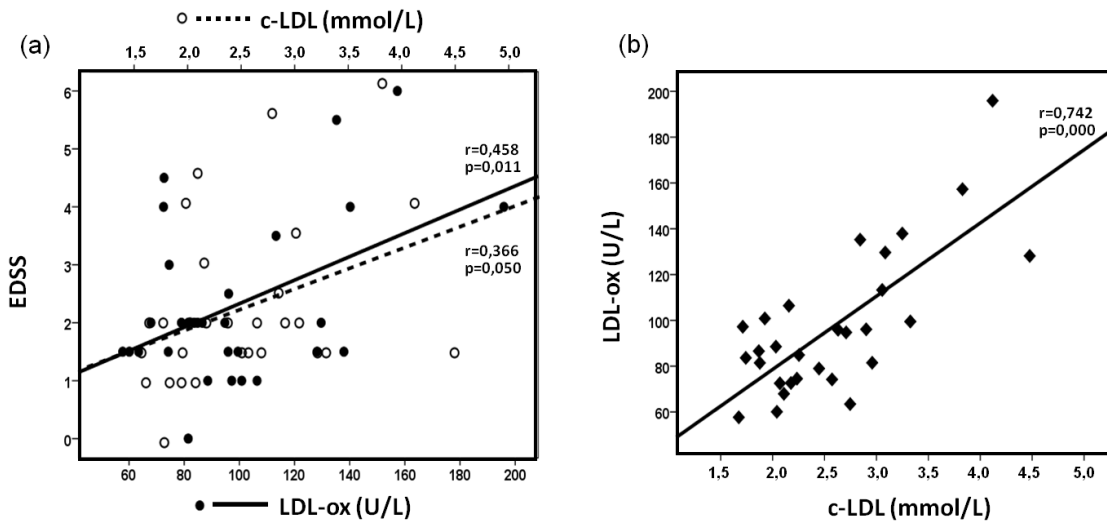


Figura 6.4 – Correlações entre o EDSS com as LDL-ox e o c-LDL (a) e entre as LDL-ox com o c-LDL (b) nos doentes com esclerose múltipla.

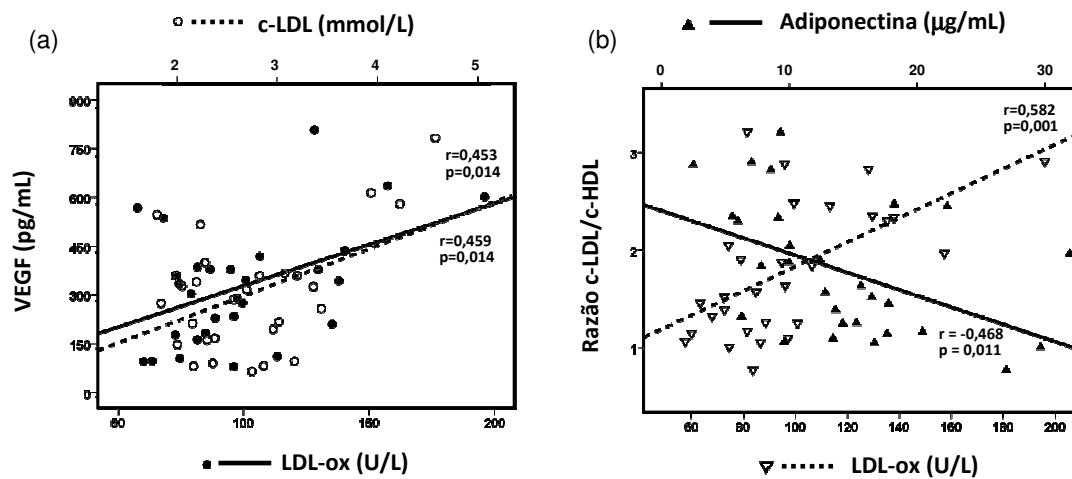


Figura 6.5 – Correlações entre o VEGF com as LDL-ox e o c-LDL (a) e entre a razão c-LDL/c-HDL com as LDL-ox e as subpopulações de HDL pequenas (b) nos doentes com esclerose múltipla.

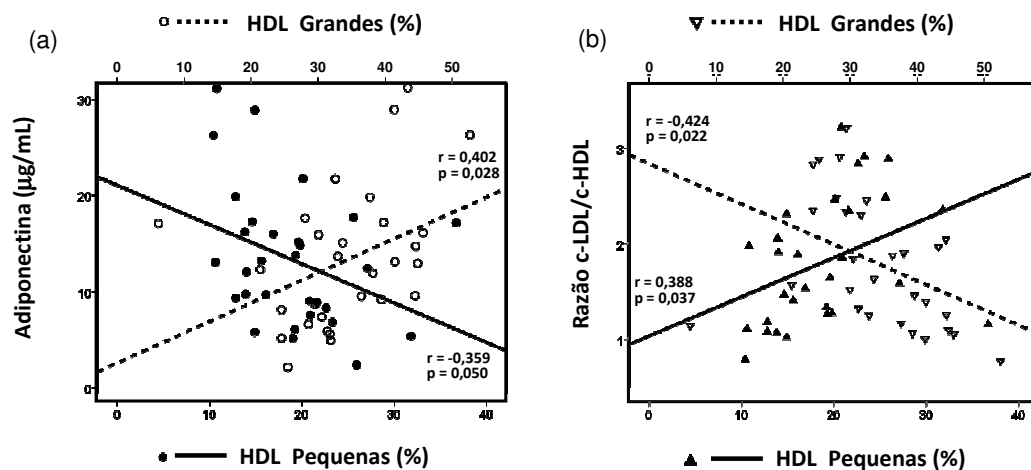


Figura 6.6 – Correlações entre a adiponectina e as subpopulações de HDL grandes e pequenas (a) e entre a razão c-LDL/c-HDL com as subpopulações de HDL grandes e pequenas (b) nos doentes com esclerose múltipla.

Outras correlações de salientar estabelecidas no grupo dos doentes com EM foram as seguintes: 1) LDL-ox e TGs ($r=0,456$; $p=0,011$); 2) EDSS e c-Total ($r=0,404$; $p=0,027$) e 3) c-LDL e glicemia ($r=0,453$; $p=0,014$).

6.4 – Discussão e conclusão

Neste trabalho foram apresentados resultados que indicam que os doentes com EM podem ter um perfil cardiometabólico mais nefasto, com base na elevação do conteúdo sérico de algumas moléculas agressivas e aterogénicas, particularmente as LDL-ox e as HDL pequenas e na diminuição das HDL ateroprotectoras (HDL grandes). No entanto, este perfil está camuflado num painel lipídico clássico aparentemente normal (apesar da diferença significativa observada em relação ao conteúdo de TGs, embora os valores encontrados se encontrem perfeitamente dentro do intervalo considerado normal), reforçando a importância de analisar outros marcadores bioquímicos de RCV não tradicionais/clássicos, em pacientes com EM. Na população estudada, foi também possível correlacionar estes novos marcadores lipídicos com o estadió clínico da doença, avaliado pela pontuação na EDSS, o que levanta a possibilidade destes biomarcadores estarem envolvidos no processo de progressão da doença.

É sabido que o colesterol é um importante componente da mielina. Lípidos, especialmente lipoproteínas, estão envolvidos na regulação das funções neuronais do SNC através de mecanismos locais que estão ligados ao metabolismo lipídico sistémico (Gotthardt e col., 2000; Stockinger e col., 2000). Em condições normais e fisiológicas, podem encontrar-se concentrações elevadas de c-HDL e c-LDL no SNC, como resultado do transporte através da barreira hemato-encefálica (BHE) (Borghini e col., 1995). No entanto, a dislipidemia pode potenciar processos inflamatórios no endotélio vascular, que levam à produção de moléculas de adesão e ao recrutamento de leucócitos (Cybulsky e col., 1991; Stokes e col., 2009). O recrutamento e extravasamento de células do sistema imunitário em todo o endotélio activado da BHE são considerados um passo crítico na patogénese da EM. Foi ainda reportada uma significativa disfunção endotelial vascular cerebral nesta doença (Minagar e col., 2006), acompanhada por algum grau de hipoperfusão (De Keyser e col., 2008). Weinstock-Guttman e col. (2011), ao estudarem uma população de 492 doentes com EM, concluíram que o perfil lipídico teve efeitos modestos sobre a progressão da doença. Ainda assim, o agravamento da incapacidade neurológica foi associado com níveis mais elevados de c-LDL, c-Total e TGs, enquanto níveis mais elevados de c-HDL foram associados a menores índices de actividade inflamatória aguda, avaliada por ressonância magnética nuclear (RMN) (Weinstock-Guttman e col., 2011). No entanto (e mesmo tendo em conta que o nosso estudo não se centrou em dados imagiológicos), os resultados obtidos remetem-nos para a importância da medição de novos marcadores de dislipidemia (particularmente as LDL-ox e as subpopulações de HDL), verdadeiramente mais relacionados com a doença e sua progressão, continuando a apoiar a hipótese de que os mecanismos pró-inflamatórios e trombogénicos associados a um perfil lipídico anormal poderão contribuir para a progressão da EM, através de diversos mecanismos de dano no endotélio vascular da BHE. A importância de marcadores de RCV "não-clássicos", como as LDL oxidadas, tem sido também enfatizada quer em indivíduos jovens quer em adultos com doença coronária (Huang e col., 2012; Huang e col., 2011).

Este trabalho mostra uma forte correlação entre a pontuação na EDSS e as LDL-ox e o c-LDL, sugerindo um impacto negativo do c-LDL, em particular das LDL-ox, na EDSS. Estes marcadores de RCV alertam para a necessidade de uma intervenção precoce, a fim de evitar doença cardiovascular em doentes com EM. Mudanças de estilo de vida,

incluindo adopção de uma dieta saudável e exercício físico regular, proporcionando uma melhoria no perfil lipídico, podem ser benéficas para pacientes com EM e ter inclusivamente impacto no seu estado neurológico. A introdução precoce de um fármaco antilipidémico (tal como uma estatina) pode ser testada no futuro, com o objectivo de avaliar o impacto sobre os novos marcadores de risco cardiometabólico aqui apresentados.

Salienta-se ainda que estes são doentes jovens e que o perfil apresentado em nada se assemelha ao típico perfil dos indivíduos ateroscleróticos observados na prática clínica – os doentes com EM não são obesos, não sofrem de hipertensão ou diabetes e, se considerarmos apenas o painel lipídico clássico, apresentam valores dentro dos intervalos considerados normais. Quando comparados com o grupo controlo (e note-se que foi conseguido um emparelhamento muito bom, em termos de idade e sexo), os pacientes com EM apresentam um perfil cardiometabólico desfavorável mais cedo, traduzido pela presença no sangue de partículas mais agressivas e aterogénicas, como as LDL-ox e as HDL pequenas e uma diminuição das HDL mais funcionais/ateroprotectoras (HDL grandes). A função angiogénica dos doentes também contribui para o incremento do RCV. O VEGF pode estimular a formação de microvasos no interior da placa aterosclerótica (que podem ser rompidos e causar hemorragia intraplaca), e tem um papel na formação de trombos e contribui significativamente para o risco cardiometabólico global. Foi detectada uma ligeira elevação dos níveis de VEGF nos doentes, em comparação com os controlos. Este resultado não foi estatisticamente significativo, mas ainda assim pode contribuir para aumentar o interesse nesta molécula, em estudos futuros e com um número mais alargado de doentes. A inflamação crónica é também um importante factor para aumento do risco vascular. Num outro estudo, Soilu-Hänninen e col. (2005) verificaram que os níveis de PCR_{hs} foram similares em pacientes com EM e controlos saudáveis, mas mais elevados durante os surtos de EM do que no período de remissão ($p = 0,010$). Verificaram ainda que pacientes em tratamento com interferão beta-1a tinham menores níveis séricos de PCR, comparando com os tratados com placebo no estudo PRISMS (*Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis*) ($p = 0,035$). Todos os doentes incluídos no nosso estudo estavam sob tratamento com fármacos modificadores da doença (terapêutica de 1ª linha) ou natalizumab. Os níveis séricos de PCR_{hs} estavam dentro do intervalo normal para todos

eles, embora os valores tenham sido maiores do que os encontrados nos voluntários saudáveis (alcançando significância estatística), o que reforça o conceito de que a inflamação crónica deverá estar presente nesta situação clínica. Estes resultados poderão estar a ser equilibrados por uma variação semelhante, mas no sentido contrário, dos níveis de adiponectina, a qual normalmente desempenha um papel anti-inflamatório, tal como referido anteriormente. Mas esta relação dinâmica merece uma investigação mais aprofundada, com o objectivo de entender como estas moléculas interagem e contribuem para o RCV global na EM.

Em conclusão, os doentes com EM parecem apresentar um perfil cardiometabólico mais nefasto quando comparados com indivíduos saudáveis com idade e sexo semelhantes. A incapacidade gerada pela doença (dada pela pontuação na EDSS) foi directa e significativamente correlacionada com alguns marcadores de RCV, especialmente com o conteúdo em LDL-ox, entre outras moléculas testadas que parecem poder vir a ser bons biomarcadores (subpopulações de HDL e VEGF). O risco aterogénico precoce encontrado nesta população de doentes deve merecer atenção especial e, no futuro, compreendendo melhor os mecanismos envolvidos e caracterizando os fatores moleculares implicados, este problema pode ser motivo para recomendar uma intervenção farmacoterapêutica precoce, prevenindo o desenvolvimento prematuro de doença cardiovascular nestes pacientes.

6.5 – Referências

- Acevedo AR, Nava C, Arriada N, et al. Cardiovascular dysfunction in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2000; 101(2):85-8.
- Borghini I, Barja F, Pometta D, et al. Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1255(2):192-200.
- Christiansen CF, Christensen S, Farkas DK, et al. Risk of arterial cardiovascular diseases in patients with multiple sclerosis: A population-based cohort study. *Neuroepidemiology* 2010; 35(4):267-74.
- Cybulsky MI, Jr. Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251(4995):788-91.
- De Keyser J, Steen C, Mostert JP, et al. Hypoperfusion of the cerebral white matter in multiple sclerosis: Possible mechanisms and pathophysiological significance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28(10):1645-51.
- Girardi F, Franceschi E, Brandes AA. Cardiovascular safety of VEGF-targeting therapies: current evidence and handling strategies. *Oncologist* 2010; 15(7):683-94.
- Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, et al. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem* 2000; 275(33):25616-24.
- Huang H, Ma R, Liu D, et al. Oxidized low-density lipoprotein cholesterol and the ratio in the diagnosis and evaluation of therapeutic effect in patients with coronary artery disease. *Dis Markers* 2012; 33(6):295-302.
- Huang SS, Huang PH, Chen YH, et al. Association of adiponectin with future cardiovascular events in patients after acute myocardial infarction. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17(3):295-303.
- Huang Y, Hu Y, Mai W, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein is an independent risk factor in young patients with coronary artery disease. *Dis Markers* 2011; 31(5):295-301.
- Iacobaeus E, Amoudruz P, Ström M, et al. The expression of VEGF-A is down regulated in peripheral blood mononuclear cells of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 2011; 6(5):e19138.
- Kanabrocki EL, Ryan MD, Hermida RC, et al. Altered circadian relationship between serum nitric oxide, carbon dioxide, and uric acid in multiple sclerosis. *Chronobiol Int* 2004; 21(4-5):739-58.
- Kurtzke JF. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33(11):1444-52.
- Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: Potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 2004; 4(4):211-7.
- Mangge H, Almer G, Truschnig-Wilders M, et al. Inflammation, adiponectin, obesity and cardiovascular risk. *Curr Med Chem* 2010; 17(36):4511-20.
- Merkelbach S, Haensch CA, Hemmer B, et al. Multiple sclerosis and the autonomic nervous system. *J Neurol* 2006; 253 Suppl 1:I21-5.
- Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, et al. Multiple sclerosis as a vascular disease. *Neurol Res* 2006; 28(3):230-5.
- Mirshafiey A, Jadidi-Niaragh F. Prostaglandins in pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010; 32(4):543-54.
- Olindo S, Guillon B, Helias J, et al. Decrease in heart ventricular ejection fraction during multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2002; 9(3):287-91.

- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69(2):292-302.
- Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, et al. Multiple sclerosis: Risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 2010; 9(7):727-39.
- Ranadive SM, Yan H, Weikert M, et al. Vascular dysfunction and physical activity in multiple sclerosis. *Med Sci Sports Exerc* 2012; 44(2):238-43.
- Sanya EO, Tutaj M, Brown CM, et al. Abnormal heart rate and blood pressure responses to baroreflex stimulation in multiple sclerosis patients. *Clin Auton Res* 2005; 15(3):213-8.
- Soilu-Hänninen M, Koskinen JO, Laaksonen M, et al. High sensitivity measurement of CRP and disease progression in multiple sclerosis. *Neurology* 2005; 65(1):153-5.
- Stockinger W, Brandes C, Fasching D, et al. The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. *J Biol Chem* 2000; 275(33):25625-32.
- Stokes KY, Calahan L, Hamric CM, et al. CD40/CD40L contributes to hypercholesterolemia-induced microvascular inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296(3):H689-97.
- Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Mahfooz N, et al. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2011; 8:127.
- World Health Organization: Atlas Multiple Sclerosis Resources in the World. Geneva,WHO 2008, http://www.who.int/mental_health/neurology/Atlas_MS_WEB.pdf (accessed on 20 July 2012).

Capítulo 7

Marcadores emergentes de risco cardiovascular residual em doentes dislipidémicos com níveis de c-LDL normalizados

Publicado sob o formato:

Mascarenhas-Melo F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Marado D, Palavra F, Pinto R, Rocha-Pereira P, Teixeira F, Reis F. Implication of low HDL-c levels in patients with LDL-c average levels – focus on oxidized LDL, large HDL subpopulation and adiponectin. *Mediators of Inflammation* 2013; 2013:612038.

Mascarenhas-Melo F, Palavra F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Freitas I, Mendonça MI, Pinto R, Teixeira F, Reis F. Emergent biomarkers of residual cardiovascular risk in patients with low HDL-c and/or high triglycerides and average LDL-c concentrations - focus on HDL subpopulations, oxidized LDL, adiponectin and uric acid. *The Scientific World Journal* 2013; 387849.

7.1 – Perfil cardiometabólico em doentes dislipidémicos com baixos valores de c-HDL – importância das HDL grandes, LDL oxidadas e adiponectina

7.1.1 – Introdução

A dislipidemia é reconhecida como um dos principais factores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV), que continua a ser a principal causa de morte em toda a Europa (Nichols e col., 2012). Grandes estudos prospectivos de coorte, como o *Framingham Heart Study* e o *Seven Countries Study*, reconheceram a importância de reduzir os principais factores de risco, incluindo os níveis de colesterol, em particular o colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (c-LDL), como uma estratégia essencial para impedir o desenvolvimento/evolução da doença cardiovascular e eventos relacionados (Keys e col., 1980; Wilson e col., 1998; NCEP III, 2002). No entanto, é agora aceite que as terapêuticas hipolipidémicas actuais, em particular as dirigidas para reduzir os níveis de c-LDL, tal como as estatinas, são insuficientes para impedir parte dos eventos cardiovasculares; na verdade, o risco cardiovascular residual permanece elevado, mesmo em ensaios clínicos em que os níveis de c-LDL foram agressivamente reduzidos (Cannon e col., 2004; LaRosa e col., 2005; Pedersen e col., 2005). Na verdade, tem sido reconhecido que uma proporção considerável de eventos cardiovasculares ocorre em indivíduos que apresentam níveis normais de c-LDL, havendo um risco cardiovascular residual que tem sido alvo de um grande interesse (De Bacquer e col., 2012; Mehra e col., 2012; Stone e col., 2012; Fácila e col., 2013). Além disso, este facto reforça a ideia de que os factores de risco tradicionais, incluindo o perfil lipídico, podem “não contar a história toda” sobre a DCV e a prevenção da progressão de eventos CV, e, assim, tem havido um interesse crescente em identificar novos biomarcadores que possam melhorar a previsão global de risco de doença cardiovascular (Hackam e col., 2003; Assmann e col., 2005). Além do papel crítico que o c-LDL tem, várias evidências têm mostrado a contribuição de outras fracções e/ou componentes lipídicos, tais como as LDL oxidadas (LDL-ox) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL), para a saúde cardiovascular em geral (NCEP III, 2002; Ishigaki e col., 2009; Holvoet e col., 2004; Cziraky e col., 2008).

A oxidação das LDL está associada com a doença arterial coronária (DAC), bem como com outros distúrbios, como recentemente se verificou a partir de estudos experimentais e clínicos (Tekin e col., 2009; Kulah e col., 2007; Tekin e col., 2007; Bieghs e col., 2012a; Bieghs e col., 2012b). No que respeita à DAC, a oxidação das LDL é promotora de algumas etapas chave do aparecimento e evolução da aterosclerose, incluindo a estimulação da infiltração de monócitos e da migração e proliferação de células do músculo liso enquanto que, inversamente, os níveis elevados de c-HDL impedem o desenvolvimento da aterosclerose e da DAC, em particular devido ao transporte reservado do colesterol e à inibição da oxidação das LDL (Mertens e col., 2001). A remoção e/ou inactivação das LDL-ox em circulação é cada vez mais considerada uma estratégia terapêutica promissora contra a progressão da aterosclerose; no entanto, mais investigação é necessária para esclarecer alguns dados discrepantes (Nilsson e col., 2007; Hulthe e col., 2004). Relativamente aos conteúdos de c-HDL, dados clínicos e epidemiológicos mostram a necessidade de ampliar o arsenal terapêutico para reduzir o risco cardiovascular residual associado aos baixos níveis de c-HDL, mesmo quando o c-LDL é “manipulado” com sucesso (Brewer e col., 2007; Grover e col., 2009; Nichols e col., 2009). De facto, os baixos valores séricos de c-HDL têm sido largamente reconhecidos como um factor de risco para a doença cardíaca coronária (DCC) (Asztalos e col., 2003; Hayden e col., 2005).

Cada vez mais tem sido evidenciado que a determinação do risco cardiovascular será mais correcta e fiável recorrendo à quantificação das subpopulações de HDL (que se diferenciam em grandes, intermédias e pequenas, tendo por base o seu tamanho e densidade, devido à sua diferente composição lipídica e proteica) que têm uma funcionalidade diferente quer no transporte reverso do colesterol como nas restantes funções associadas ao desenvolvimento e progressão da doença e das lesões coronárias (Asztalos e col., 2000) parecendo as HDL grandes estarem inversamente relacionadas com a prevalência destas situações patológicas (Pirillo e col., 2003). Não obstante o mecanismo mais conhecido subjacente à função antiaterogénica do c-HDL seja o TRC, outras propriedades importantes de protecção têm sido descritas, incluindo as anti-inflamatórias, antioxidantes, anti-trombóticas e vasorelaxantes (Assmann e col., 2003; Barter e col., 2004; Nofer e col., 2010; Rodríguez e col., 2009). Embora o benefício

dos teores elevados de c-HDL pareça ser óbvio, a maioria dos ensaios clínicos com o objectivo de aumentar as concentrações de c-HDL não conseguiu gerar resultados convincentes. Portanto, a questão emergente é a de saber se a quantificação da funcionalidade das HDL (nomeadamente subpopulações) não será mais importante do que a determinação isolada da concentração total de c-HDL (Schaefer e col., 2012). Na verdade, variações nos níveis/percentagens das subpopulações de HDL, e consequentemente na sua funcionalidade, têm sido observadas em populações com DCV, sugerindo que as partículas de HDL grandes estão inversamente associadas ao desenvolvimento da aterosclerose, enquanto as partículas de HDL pequenas estão positivamente relacionadas com a DCV, o que também se observa para os teores de LDL-ox (Camont e col., 2011; Mascarenhas-Melo e col., 2013a; Mascarenhas-Melo e col., 2013b; Palavra e col., 2013). Estas considerações indicam que, para além da medição do perfil lipídico tradicional (como as concentrações séricas de c-HDL e de c-LDL), a medição das subpopulações específicas de HDL e dos níveis de LDL-ox podem ajudar a avaliar de forma mais fiável o risco de eventos cardiovasculares em populações com características particulares.

Este conhecimento poderá ser igualmente importante para o desenvolvimento de estratégias mais bem direccionadas para reduzir o risco cardiovascular associado à dislipidemia. Neste contexto, esta parte do estudo teve como objetivo avaliar a influência de baixos níveis de c-HDL no perfil cardiometabólico de doentes com factores de risco cardiovascular, mas com conteúdos normalizados de c-LDL, utilizando marcadores tradicionais e não-tradicionais, incluindo as LDL-ox, as subpopulações de HDL e mediadores inflamatórios e de angiogénese.

7.1.2 – População e métodos

7.1.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas

Duzentos e quarenta e dois indivíduos foram incluídos no estudo, com idades compreendidas entre os 33 e os 75 anos, divididos em duas populações principais: - voluntários controlo e - doentes com factores de risco cardiovascular (designadas de forma abreviada ao longo do texto como população controlo e população de doentes,

respectivamente). Os controlos foram recrutados aleatoriamente durante a realização de testes laboratoriais de rotina num laboratório de análises clínicas (Laboratório de Análises Clínicas Soares & Figueiredo, de Viseu), e foram seleccionados após declararem a não existência de qualquer diagnóstico ou a toma de qualquer medicamento para doença cardiovascular, nem história familiar de doenças cardiovasculares. O grupo controlo incluiu 73 indivíduos, 39 do sexo masculino e 34 do sexo feminino. O grupo de doentes envolveu 169 indivíduos, 88 do sexo masculino e 81 do sexo feminino, considerados como tendo fatores de risco cardiovascular por existência de diagnóstico anterior e/ou tratamento farmacológico para hipertensão e/ou diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e/ou dislipidemia. A DMT2 foi diagnosticada na Unidade de Diabetes e Doenças Metabólicas do Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E. (dos Covões), de acordo com as recomendações actualizadas da ADA (Associação Americana de Diabetes) e da AEED (Associação Europeia para o Estudo da Diabetes). Os doentes com diagnóstico prévio e/ou tratamento para hipertensão e dislipidemia foram recrutados durante a realização de análises laboratoriais de rotina, no Laboratório de Análises Clínicas da Covilhã, onde expressaram fazer terapêutica anti-hipertensiva e/ou antidislipidémica após diagnóstico clínico e laboratorial adequado, de acordo com a *“International Society of Hypertension/World Health Organization”* e o *“Seventh Joint National Committee on Hypertension”* e o *“National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III”* (NCEP ATP III) para hipertensão e dislipidemia, respectivamente. Para além da hipertensão, dislipidemia e diabetes descritas, alguns doentes manifestaram a existência de outras patologias do foro cardiovascular, nomeadamente: enfarte agudo do miocárdio, AVC, angina de peito, fibrilhação auricular, arritmia, insuficiência cardíaca, doença coronária e arterial, valvulopatia cardíaca e doença vascular periférica. O grupo de doentes estava sob a seguinte medicação: 21,30% com insulina; 53,85% com antidiabéticos orais, entre os quais: sulfonilureias, metformina, moduladores de incretinas, inibidores da alfa-glucosidase intestinal, rosiglitazona e pioglitazona; 63,91% com fármacos antidislipidémicos, entre os quais estatinas, fibratos, ezetimiba e ácidos ómega-3; 70,41% com fármacos anti-hipertensores, nomeadamente diuréticos, inibidores da enzima de conversão da angiotensina, antagonistas dos receptores da angiotensina, bloqueadores

dos canais de cálcio, e depressores da actividade adrenérgica. É de salientar que vários doentes estavam sujeitos a terapêuticas combinadas de vários fármacos.

O grupo controlo não tomava qualquer fármaco para qualquer doença do foro cardiovascular. As mulheres grávidas e a amamentar foram excluídas do estudo, bem como indivíduos com idade superior a 75 anos e inferior a 16. Cada população foi dividida em dois subgrupos consoante os níveis séricos de c-HDL: c-HDL normal e c-HDL baixo, utilizando os valores de corte de 1,03 mmol/L para os homens e de 1,29 mmol/L para as mulheres, de acordo com as directrizes do NCEP ATP III de 2002. Dos 73 controlos, 51 foram incluídos no subgrupo de c-HDL normal e 22 no subgrupo de c-HDL baixo, enquanto dos 169 doentes, 119 foram incluídos no subgrupo de c-HDL normal e 50 no subgrupo de c-HDL baixo. O estudo foi realizado de acordo com o código de ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsínquia) para estudos em humanos e recebeu autorização dos comités de ética locais, bem como de todos os participantes, que leram e assinaram por escrito um termo de consentimento informado.

7.1.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue

A recolha de dados e colheita de sangue foram realizadas de acordo com o descrito na sessão 4.2.2.

7.1.2.3 – Determinações analíticas

Foram doseados os parâmetros segundo os métodos descritos na sessão 4.2.3. A HbA1c foi medida utilizando um teste de imunoaglutinação em látex através do aparelho DCA 2000+ (Bayer Diagnostics, Barcelona, Espanha).

7.1.2.4 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows, versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, EUA). A distribuição das variáveis contínuas foi analisada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov, para avaliar desvios significativos da normalidade. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o t-teste de amostras independentes e o teste

de Mann-Whitney, consoante as variáveis seguiam distribuição normal ou não, respectivamente, para cada população em análise. A associação entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste de Pearson. Foi considerado estatisticamente significativo um *P* menor que 0,05.

7.1.3 – Resultados

7.1.3.1 – Caracterização geral das populações

Os dados demográficos e antropométricos do grupo controlo e do grupo dos doentes estão resumidos na Tabela 7.1.1. Ambas as populações foram divididas em dois subgrupos de acordo com a concentração de c-HDL: [c-HDL] normal (homens > 1,03 mmol/L e mulheres > 1,29 mmol/L) e [c-HDL] baixa (homens ≤ 1,03 mmol/L e mulheres ≤ 1,29 mmol/L), tendo sido depois comparados ([c-HDL] normal vs [c-HDL] baixa) dentro de cada população em estudo (controlos e doentes). Setenta e três controlos foram incluídos: 51 com níveis normais de c-HDL (69,86%) e 22 com níveis baixos de c-HDL (30,14%). A população de doentes era constituída por cento e sessenta e nove indivíduos: 119 com níveis normais de c-HDL (70,41%) e 50 com níveis baixos de c-HDL (29,59%). Não se encontraram diferenças em relação à idade e à obesidade (IMC e perímetro abdominal) entre os grupos de c-HDL, para ambas as populações em estudo (Tabela 7.1.1). A pressão arterial (sistólica e diastólica) foi significativamente mais alta no grupo de c-HDL baixo, quando comparado com o grupo de c-HDL normal na população controlo, não tendo havido diferenças entre estes subgrupos na população de doentes (Tabela 7.1.1).

Tabela 7.1.1 – Dados demográficos e antropométricos dos grupos de estudo

Parâmetros	Grupo Controlo			Grupo de Doentes		
	[c-HDL] Normal (n = 51)	[c-HDL] Baixa (n = 22)	P	[c-HDL] Normal (n = 119)	[c-HDL] Baixa (n = 50)	P
Idade (anos)	57,57 ± 1,16	57,86 ± 1,98	0,893	59,69 ± 0,91	60,92 ± 1,29	0,629
BMI (Kg/m²)	27,01 ± 0,51	28,75 ± 1,21	0,195	29,19 ± 0,44	29,87 ± 0,63	0,391
P. Abdom. (cm)	96,47 ± 1,66	98,73 ± 2,75	0,468	103,46 ± 1,25	102,37 ± 2,05	0,644
PAS (mmHg)	140,44 ± 2,80	154,77 ± 4,46	0,007	140,19 ± 2,08	134,94 ± 3,05	0,164
PAD (mmHg)	84,94 ± 1,45	93,00 ± 2,19	0,003	78,02 ± 1,18	75,38 ± 1,92	0,234
Glicemia (mmol/L)	5,42 ± 0,09	5,31 ± 0,10	0,494	8,20 ± 0,35	9,19 ± 0,59	0,228
HbA1c (%)	6,04 ± 0,18	6,30 ± 0,00	0,641	8,12 ± 1,92	9,38 ± 0,39	0,004

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. IMC, índice de massa corporal; HbA1c, hemoglobina glicada; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; P. Abdom., perímetro abdominal.

7.1.3.2 – Perfis glicídico e lipídico clássicos

Quanto ao perfil glicídico, não foram encontradas diferenças de glicemia e HbA1c entre os subgrupos de c-HDL normal e baixo na população controlo, enquanto na população de doentes foi encontrado um aumento significativo do valor de HbA1c no subgrupo com baixo c-HDL quando comparado com o grupo de normal c-HDL (Tabela 7.1.1).

Os indivíduos que fazem parte do grupo controlo estavam sem qualquer terapêutica para a doença cardiovascular, enquanto que a maioria dos indivíduos da população de doentes estava sob terapêutica antidislipidémica, o que pode justificar alguns dos dados obtidos para o perfil lipídico clássico.

Tabela 7.1.2 – Perfil lipídico dos grupos de estudo

Parametros	Grupo Controlo			Grupo de Doentes		
	[c-HDL] Normal (n = 51)	[c-HDL] Baixa (n = 22)	P	[c-HDL] Normal (n = 119)	[c-HDL] Baixa (n = 50)	P
c-Total (mmol/L)	5,67 ± 0,13	5,17 ± 0,18	0,030	4,88 ± 0,10	5,13 ± 0,16	0,175
TGs (mmol/L)	1,07 ± 0,05	1,47 ± 0,11	0,000	1,50 ± 0,08	2,55 ± 0,19	0,000
c-LDL (mmol/L)	3,60 ± 0,13	3,40 ± 0,17	0,359	2,74 ± 0,09	3,02 ± 0,14	0,096
LDL-ox (U/L)	45,74 ± 2,67	39,16 ± 2,46	0,202	35,71 ± 1,26	40,07 ± 2,20	0,043
LDL-ox/c-LDL	12,64 ± 0,56	11,74 ± 0,65	0,344	13,13 ± 0,35	13,99 ± 0,65	0,300
c-HDL (mmol/L)	1,58 ± 0,04	1,10 ± 0,03	0,000	1,48 ± 0,03	1,01 ± 0,02	0,000
HDL grandes (%)	36,75 ± 2,02	33,74 ± 2,41	0,176	35,08 ± 1,08	27,46 ± 1,57	0,000
HDL intermédi. (%)	45,00 ± 1,07	47,67 ± 1,20	0,133	45,11 ± 0,58	47,94 ± 1,00	0,000
HDL pequenas (%)	45,11 ± 0,58	47,94 ± 1,00	0,886	19,80 ± 0,75	24,53 ± 1,68	0,001
c-nHDL (mmol/L)	4,10 ± 0,13	4,07 ± 0,18	0,915	3,40 ± 0,10	4,12 ± 0,16	0,000
c-Total/c-HDL	3,72 ± 0,13	4,81 ± 0,23	0,000	3,42 ± 0,09	5,18 ± 0,19	0,000
c-LDL/c-HDL	2,39 ± 0,11	3,17 ± 0,20	0,001	1,94 ± 0,07	3,04 ± 0,17	0,000
PON1 (U/mL/min)	505,23 ± 18,29	442,50 ± 23,33	0,042	493,85 ± 15,84	510,42 ± 33,78	0,774

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. c-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade; c-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; LDL-ox, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas; TGs, triglicerídeos; c-Total, colesterol total; c-nHDL, colesterol não HDL; PON1, paraoxonase 1; TGs, triglicerídeos.

Na população controlo, valores menores de c-Total foram encontrados no subgrupo de c-HDL baixo, quando comparado com o de c-HDL normal, acompanhados por um aumento significativo do conteúdo de triglicerídeos. Para além disso, apesar de nenhuma diferença significativa ter sido encontrada para o c-LDL e c-nHDL, foram obtidos valores significativamente mais elevados para as razões de c-Total/c-HDL e c-LDL/c-HDL (Tabela 7.1.2). No entanto, as diferenças entre os dois subgrupos de doentes (normal e baixo c-HDL) foram mais expressivas. De fato, o subgrupo de doentes com baixos níveis de c-HDL apresentou uma tendência para um aumento dos valores de c-Total e c-LDL, e ainda valores mais elevados e estatisticamente significativos de TGs e c-nHDL, bem como das razões c-Total/c-HDL e c-LDL/c-HDL (Tabela 7.1.2).

7.1.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1

No grupo controlo não se verificaram diferenças de LDL-ox entre os dois subgrupos; contudo, o subgrupo de doentes com c-HDL baixo apresentou valores superiores de LDL-ox em relação ao de c-HDL normal (Tabela 7.1.2).

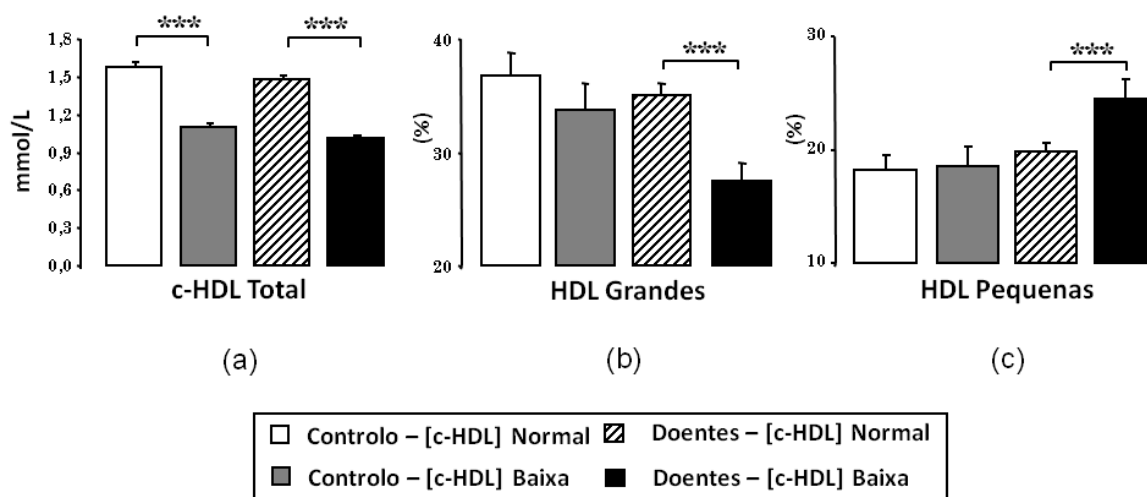


Figura 7.1.1 – Concentração sérica de c-HDL total (a) e percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (b) e pequenas (c) nas populações em estudo. Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. ***= $P < 0,001$.

Relativamente às subpopulações de HDL, apesar de níveis mais baixos de c-HDL total nos dois subgrupos de baixo c-HDL (o que é inerente pela própria definição dos subgrupos em estudo) [Tabela 7.1.2 e Figura 7.1.1 (a)], apenas na população de doentes houve uma diminuição significativa da percentagem de HDL grandes e aumento da de HDL pequenas; não foram encontradas diferenças percentuais nas subpopulações de HDL entre os dois subgrupos da população controlo (normal vs baixo c-HDL) [Tabela 7.1.2 e Figura 7.1.1 (b) e (c)]. Quanto à actividade da PON1, na população controlo foi encontrado um valor menor no subgrupo de c-HDL baixo, enquanto na população de doentes não se verificaram alterações significativas entre os dois subgrupos (Tabela 7.1.2).

7.1.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial

Relativamente a outros possíveis marcadores de doença cardiovascular, nos indivíduos controlo, os baixos valores de c-HDL foram associados apenas a uma concentração significativamente reduzida de adiponectina [Figura 7.1.2 (a)], quando comparado com os controlos com níveis normais de c-HDL; todos os outros parâmetros se mantiveram inalterados, incluindo PCRhs, TNF- α , ácido úrico, ICAM-1 e VEGF (Tabela 7.1.3 e Figura 7.1.2 (b) e (c)). No entanto, na população de doentes, o teor reduzido de c-HDL foi significativamente associado não só com menores valores de adiponectina [Figura 7.1.2 (a)], mas também com maiores concentrações de VEGF e PCRhs [Figura 7.1.2 (b) e (c)], quando comparado com o subgrupo de doentes com níveis normais de c-HDL (Tabela 7.1.3 e Figura 7.1.2).

Tabela 7.1.3 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial dos grupos em estudo

Parametros	Grupo Controlo			Grupo de Doentes		
	[c-HDL] Normal (n = 51)	[c-HDL] Baixa (n = 22)	P	[c-HDL] Normal (n = 119)	[c-HDL] Baixa (n = 50)	P
PCRhs ($\mu\text{g/mL}$)	0,25 \pm 0,06	0,37 \pm 0,12	0,103	0,40 \pm 0,07	0,60 \pm 0,10	0,034
TNF- α (pg/mL)	3,56 \pm 0,46	3,29 \pm 0,72	0,880	3,12 \pm 0,27	3,28 \pm 0,39	0,560
Adiponectina ($\mu\text{g/mL}$)	10,84 \pm 0,99	8,04 \pm 1,18	0,047	8,90 \pm 0,66	7,09 \pm 0,89	0,041
Ác. úrico (mmol/L)	0,32 \pm 0,01	0,29 \pm 0,02	0,283	0,55 \pm 0,04	0,54 \pm 0,07	0,539
VEGF (pg/mL)	385,49 \pm 55,43	407,83 \pm 70,12	0,531	404,73 \pm 29,63	520,37 \pm 49,53	0,019
ICAM-1 (ng/mL)	472,35 \pm 67,78	663,08 \pm 151,20	0,122	571,61 \pm 29,62	471,36 \pm 29,25	0,070

Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. PCRhs, protein C reactiva; iCAM-1, molécula de adesão intercelular 1; TNF- α , factor de necrose tumoral alfa; VEGF, factor de crescimento vascular endotelial; Ác. úrico, ácido úrico.

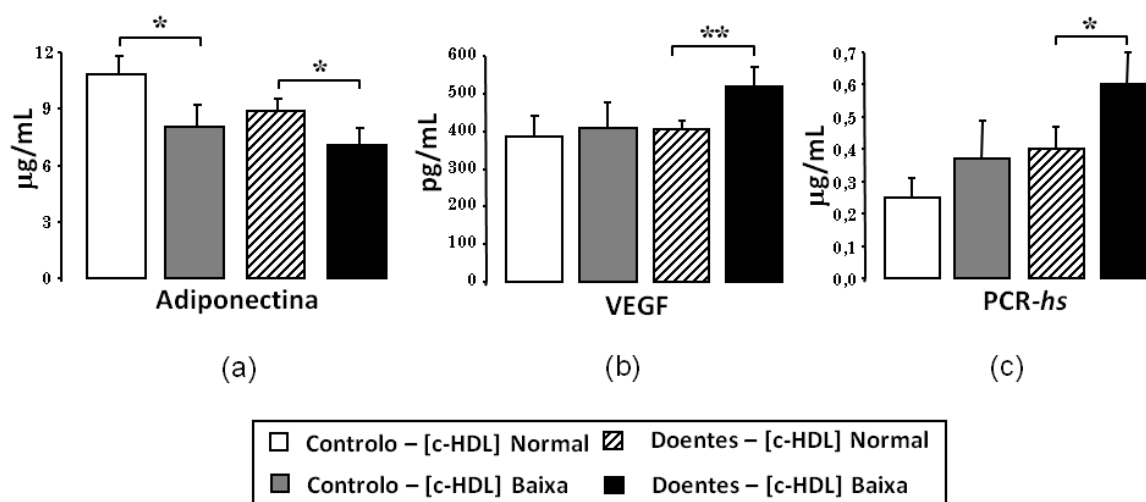


Figura 7.1.2 – Concentração sérica de adiponectina (a), VEGF (b) e PCRhs (c) nas populações em estudo. Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

7.1.3.5 – Análises de correlações entre marcadores na população de doentes

Os valores das HDL grandes no subgrupo dos doentes com níveis normais de c-HDL foram negativa e significativamente correlacionados com o conteúdo de LDL-ox ($r = -0,355$, $p = 0,000$) [Figura 7.1.3 (a)], c-LDL ($r = -0,696$, $p = 0,000$) [Figura 7.1.3 (b)], c-nHDL ($r = -0,348$, $p = 0,000$) [Figura 7.1.3 (c)], TNF- α ($r = -0,198$, $p = 0,049$) [Figura 7.1.3 (e)] e TGs ($r = -0,336$, $p = 0,000$) [Figura 7.1.3 (f)] e positiva e significativamente com os níveis de adiponectina ($r = 0,173$, $p = 0,046$) [Figura 7.1.3 (d)], mas não no subgrupo de doentes com c-HDL baixo (vs LDL-ox: $r = -0,215$, $p = 0,172$; vs c-LDL: $r = -0,175$, $p = 0,235$; vs c-nHDL: $r = -0,209$; $p = 0,149$; vs adiponectina: $r = 0,129$, $p = 0,429$; vs TNF- α : $r = 0,117$, $p = 0,460$; vs TGs: $r = -0,045$, $p = 0,758$;) [Figura 7.1.3 (a – f), respectivamente].

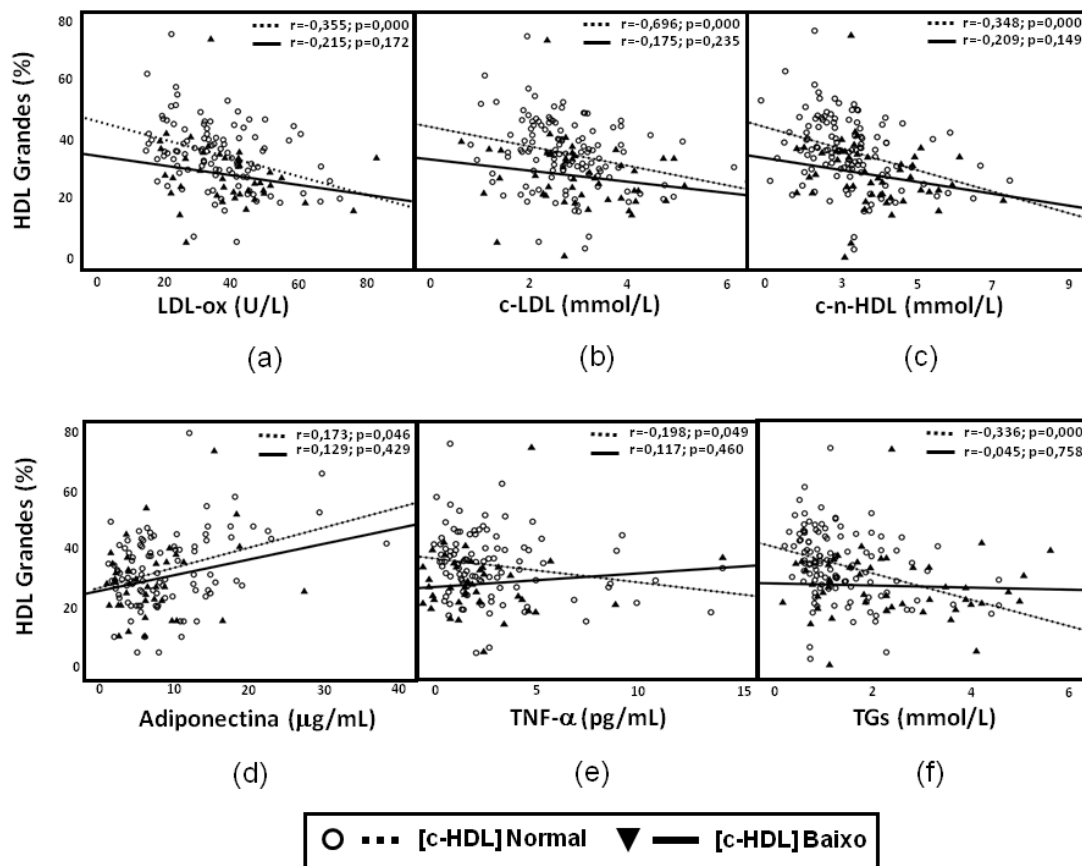


Figura 7.1.3 – Principais correlações nas populações de doentes com níveis normais e baixos de c-HDL. Correlações entre as HDL grandes com as LDL-ox (a), c-LDL (b), c-nHDL (c), adiponectina (d), TNF- α (e), e TGs (f).

Para além disso, no subgrupo de doentes com níveis normais de c-HDL, a concentração de LDL-ox apresentava-se negativa e significativamente correlacionada com as HDL grandes ($r = -0,355$, $p = 0,000$) [Figura 7.1.4 (a)] e positivamente com as HDL pequenas ($r = 0,437$, $p = 0,000$) [Figura 7.1.4 (b)], TNF- α ($r = 0,235$, $p = 0,019$) [Figura 7.1.4 (d)], PAD ($r = 0,314$, $p = 0,001$) [Figura 7.1.4 (e)] e TGs ($r = 0,307$, $p = 0,002$) [Figura 7.1.4 (f)], juntamente com uma tendência para uma correlação positiva com a actividade da PON1 ($r = 0,179$, $p = 0,072$) [Figura 7.1.4 (c)]. Estas correlações não foram estatisticamente significativas para o subgrupo de doentes com baixo c-HDL (vs HDL grandes: $r = -0,215$, $p = 0,172$; vs HDL pequenas: $r = 0,121$, $p = 0,444$; vs actividade da PON1: $r = 0,237$, $p = 0,131$; vs TNF- α : $r = -0,095$, $p = 0,551$; vs PAD: $r = 0,222$, $p = 0,157$; vs TGs: $r = 0,092$, $p = 0,569$) [Figura 7.1.4 (a - f), respectivamente].

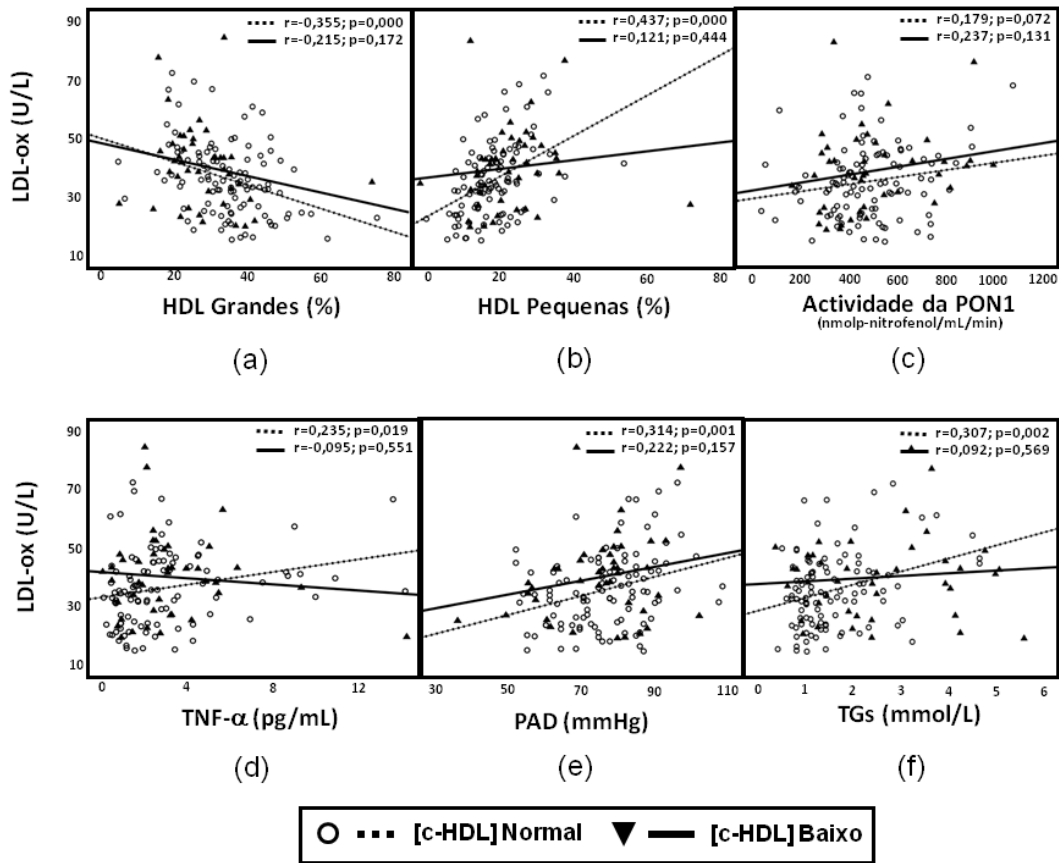


Figura 7.1.4 – Principais correlações nas populações de doentes com níveis normais e baixos de c-HDL. Correlações entre as LDL-ox e as HDL grandes (a), HDL pequenas (b), actividade da PON1 (c), TNF- α (d), PAD (e) e TGs (f).

Finalmente, também no subgrupo de doentes com c-HDL normal, a adiponectina estava positiva e significativamente correlacionada com as HDL grandes ($r = 0,363$, $p = 0,000$) e negativa e significativamente com os TGs ($r = -0,235$, $p = 0,019$), o perímetro abdominal ($r = -0,320$, $p = 0,002$), a PCRhs ($r = -0,268$, $p = 0,042$) e o ácido úrico ($r = -0,376$, $p = 0,002$) [Figura 7.1.5 (a), (c), (d), (e) e (f), respectivamente], mas não no subgrupo de doentes com baixos níveis de c-HDL (com a excepção dos TGs e ácido úrico) (vs HDL grandes: $r = 0,240$, $p = 0,136$; vs TGs: $r = -0,410$, $p = 0,010$; vs perímetro abdominal: $r = -0,232$, $p = 0,180$; vs PCR-hs: $r = 0,037$, $p = 0,852$; vs ácido úrico: $r = -0,423$, $p = 0,028$, respectivamente) [Figura 7.1.5 (a), (c), (d), (e) e (f), respectivamente]. Em oposição às HDL grandes, nenhuma correlação significativa foi encontrada entre a adiponectina e os níveis de HDL pequenas em ambos os subgrupos de normal ($r = -0,048$, $p = 0,637$) e baixo c-HDL ($r = -0,049$, $p = 0,763$) na população de doentes [Figura 7.1.5 (b)].

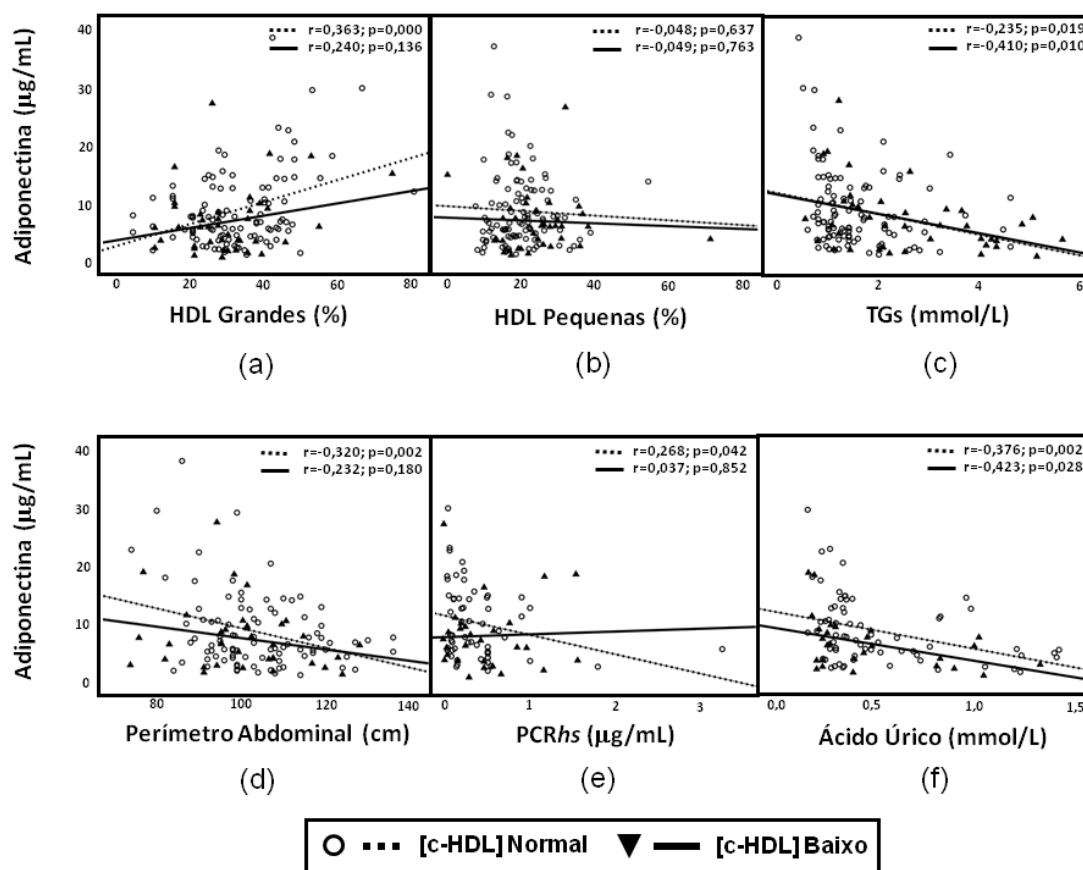


Figura 7.1.5 – Principais correlações nas populações de doentes com níveis normais e baixos de c-HDL. Correlações entre a adiponectina e as HDL grandes (a), HDL pequenas (b), TGs (c), perímetro abdominal (d), PCRhs (e) e ácido úrico (f).

7.1.4 – Discussão e conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que os baixos níveis de c-HDL estão associados a um perfil cardiometabólico menos favorável (ou mais nefasto) numa população de doentes com factores de risco cardiovascular, perfil esse que parece ser melhor diagnosticado/identificado quando analisado em termos de marcadores não-tradicionais, incluindo as subpopulações de HDL grandes, LDL-ox, adiponectina e VEGF. Embora numa menor extensão, indicadores negativos dos níveis baixos de c-HDL também se manifestam na população controlo, através do aumento da pressão arterial (PAS e PAD) e da concentração de TGs, e da diminuição da actividade da PON1 e dos níveis de adiponectina. No entanto, quando se analisa a população de doentes, o subgrupo com baixos níveis de c-HDL apresenta um perfil de risco cardiometabólico notoriamente pior

quando comparado com o subgrupo de doentes com c-HDL normal, sendo claramente as diferenças mais acentuadas do que as encontradas nos indivíduos controlo. O impacto dos baixos níveis de c-HDL é traduzido por alguns parâmetros clássicos, mas principalmente através de marcadores não-clássicos. De facto, os doentes com baixas concentrações de c-HDL apresentam conteúdos superiores de HbA1c, TGs, c-nHDL, LDL-ox, PCRhs, VEGF e HDL pequenas, bem como menores valores de adiponectina e percentagem inferior de HDL grandes.

Apesar do reconhecimento de uma associação entre baixos níveis de c-HDL e o aumento do risco para a DAC (Assmann e col., 1996; Goldbourt e col., 1997), tem sido sugerido que um melhor indicador da funcionalidade do HDL pode ser a sua qualidade (Eren e col., 2012; Soran e col., 2012), que depende do tipo das subpopulações (grandes vs pequenas) e constituintes, incluindo a actividade da PON1 (Mackness e col., 2004; Mackness e col., 2002). Os nossos resultados estão de acordo com esta sugestão; com efeito, o perfil benéfico do c-HDL encontrado nos subgrupos de c-HDL normal, em comparação com os de c-HDL baixo, foi reforçado por um aumento da percentagem em HDL grandes e diminuição em HDL pequenas (resultados significativos na população de doentes e tendenciais na população controlo). Assim, os valores baixos de c-HDL estão associados a uma tipologia das suas subpopulações aparentemente menos protectora. Genest e col. (1991) relataram que, embora 34% dos doentes com doença cardíaca prematura tenham níveis de c-LDL > 160 mg/dL, mais de metade dos doentes com doença cardíaca prematura (57%) tinha baixos valores de c-HDL. Para além disso, tem sido relatado que em doentes com DAC prematura o maior factor de risco é, na verdade, o baixo conteúdo de c-HDL, embora estes indivíduos muitas vezes possuam também altas concentrações de TGs (Genest e col., 1992). Estes estudos estão de acordo com os nossos resultados mostrando um perfil cardiometabólico mais nefasto nos subgrupos com baixos teores de c-HDL, acompanhado por um aumento da concentração sérica de triglicédeos.

No que respeita à pressão arterial, os valores da PAS e da PAD na população controlo são realmente mais elevados quando comparados com os da população de doentes, independentemente dos níveis de c-HDL normais ou baixos, o que pode ser justificado pelo efeito da terapêutica anti-hipertensiva a que esta última população está sujeita. Nesta população, a medicação é capaz de normalizar a pressão arterial em ambos

os subgrupos (c-HDL normal e baixo). No entanto, nos controlos, que não estão medicados, o subgrupo com baixos níveis de c-HDL apresentou valores superiores e estatisticamente significativos tanto de PAS como de PAD. Diversos aspectos relacionados com a funcionalidade das HDL podem contribuir para explicar as diferenças de pressão arterial entre os subgrupos de c-HDL normal e baixo. De facto, tal como já mencionado anteriormente, as HDL têm propriedades distintas que contribuem para uma vasculatura mais saudável, tais como uma acção antioxidante e anti-inflamatória, capacidade de inibição da expressão de moléculas de adesão celular em células endoteliais, bem como efeitos anti-trombóticos e vasorelaxantes, incluindo a libertação de monóxido de azoto e de prostaciclina por células vasculares (Assmann e col., 2003; Barter e col., 2004; Nofer e col., 2010; Rodríguez e col., 2009), o que deverá ter um impacto benéfico sobre a rigidez arterial e sobre a pressão arterial, de acordo com o sugerido por Woodman e col. (2006). Na presença de medicação anti-hipertensiva (como ocorre na população de doentes) estas diferenças estavam ausentes, mas os dados dos controlos não-medicados parecem ser importantes por si só. Na verdade, de acordo com o estudo *South West Seul* (SWS), realizado numa população coreana de idosos, a pré-hipertensão não é associada a um aumento do risco de mortalidade, mas os indivíduos com pressão arterial normal alta, quando combinada com baixo teor de c-HDL, apresentaram um risco significativamente aumentado de mortalidade (Kim e col., 2011). Estas observações reforçam a relevância dos nossos resultados nesta população de indivíduos com baixos níveis de c-HDL e pressão arterial normal alta, e que não foram ainda diagnosticados nem medicados para qualquer doença cardiovascular, incluindo hipertensão e/ou dislipidemia.

Em relação aos marcadores de inflamação, o nosso estudo está de acordo com o de Khan e col. (2013), que descreveram que um decréscimo nos níveis séricos de c-HDL e um aumento de PCR_{hs} predispõe fortemente os indivíduos para um maior risco de enfarte agudo do miocárdio (EAM); mais ainda, a redução do colesterol total não previne o risco de EAM. Para além disso, a inflamação parece ter um impacto prejudicial sobre as propriedades antiaterogénicas do c-HDL, sugerindo que a avaliação da funcionalidade das HDL é de particular importância para predizer o risco cardiovascular em doentes com doenças inflamatórias crónicas (Popa e col., 2012). No nosso estudo, os níveis de adiponectina também mostraram uma associação interessante com os valores de c-HDL.

A adiponectina é uma adipocitoquina libertada pelos adipócitos que quando em défice contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina e de aterosclerose (Lihn e col., 2005). Neste trabalho, em ambos os subgrupos de c-HDL baixo, os níveis de adiponectina foram mais baixos, o que está de acordo com Fernandez e col. (2010); estes autores relataram que os indivíduos com baixas concentrações de c-HDL apresentam um aumento do risco para desenvolvimento de diabetes, como mostra o aumento da resistência à insulina e os níveis mais baixos de adiponectina.

A inflamação e o stresse oxidativo são processos chave no desenvolvimento e/ou progressão da aterosclerose, sendo as LDL oxidadas um dos principais intervenientes neste processo, juntamente com vários mediadores de inflamação (Ishigaki e col., 2009; Holvoet e col., 2004; Wang e col., 2010). A oxidação das LDL induz a aterosclerose por estimulação da infiltração de monócitos e da migração e proliferação de células do músculo liso o que contribui para a aterotrombose devido à indução da apoptose das células endoteliais; este processo leva à erosão da placa de ateroma, ao alterar o equilíbrio anticoagulante do endotélio, por estimular a produção do factor tecidual pelas células musculares lisas, e induzindo a apoptose em macrófagos (Matsuura e col., 2008). Os níveis de c-HDL estão inversamente relacionados com o risco de DAC, prevenindo a progressão da aterosclerose, através da inversão do efeito estimulante das LDL oxidadas sobre a infiltração de monócitos (Mertens e col., 2001; Badimon e col., 2012). A PON1, uma enzima associada às partículas de HDL, inibe a oxidação das LDL e os seus consequentes efeitos (Mackness e col., 2004; Mackness e col., 2002; García-Heredia e col., 2013). No nosso estudo, os níveis de LDL-ox estão aumentados no subgrupo de doentes com baixos níveis de c-HDL, embora não haja alterações nos valores da actividade da PON1. Pelo contrário, na população controlo, foi encontrada uma menor actividade da PON1 no subgrupo com baixo teor de c-HDL, sem alterações no conteúdo de LDL-ox. A suspeita de uma correlação entre estes três parâmetros, no nosso estudo parece deixar de ter significado pois não parece ser a actividade da PON1 a responsável pela funcionalidade das HDL nem, consequentemente, da diminuição da oxidação das LDL. Pensa-se que a disfunção endotelial pode desempenhar um papel crítico no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e vários estudos recentes têm sugerido que o c-HDL exerce efeitos protectores directos sobre o endotélio, incluindo a

estimulação da produção endotelial de monóxido de azoto, que possui propriedades vasodilatadoras, assim como outros efeitos do tipo antioxidante, anti-inflamatório e anti-trombótico (Assmann e col., 2003; Barter e col., 2004; Nofer e col., 2010; Rodríguez e col., 2009). Para além disso, tem sido observado que o c-HDL pode estimular processos de reparação endotelial, que envolvem a mobilização e promoção da capacidade de reparação de células progenitoras endoteliais (Besler e col., 2010). O VEGF tem sido visto como um factor estimulante para o aumento do número de células progenitoras e para a resposta de migração celular (Hill e col., 2003); no nosso estudo, embora não havendo alterações significativas nos níveis séricos de ICAM-1, os níveis de VEGF encontravam-se significativamente mais elevados no subgrupo de doentes com c-HDL baixo, que pode ser visto como um processo compensatório do VEGF (dados os baixos níveis de c-HDL) na promoção da reparação endotelial através das células progenitoras, não se reflectindo por isso já nos valores de ICAM-1. Mais estudos serão necessários para entender melhor a interacção destes biomarcadores no processo de aterosclerose.

De entre os factores em estudo, alguns parecem ter particular relevância, tal como indica a análise de correlações. Na verdade, na população de doentes, em particular no subgrupo com níveis normais de c-HDL, foram encontradas correlações interessantes entre as HDL grandes, as LDL-ox e a adiponectina e vários marcadores/factores de risco clássicos e não-clássicos. O conteúdo de HDL grandes apresentou uma correlação inversa e significativa com os níveis de LDL-ox, LDL-c, TGs, c-nHDL e TNF- α , e directa com a adiponectina. Os valores de LDL-ox mostraram uma correlação inversa e significativa com as HDL grandes e directa e significativa com as HDL pequenas, TGs, TNF- α e PAD. Para além disso, as concentrações de adiponectina apresentaram uma correlação directa e estatisticamente significativa com as HDL grandes e inversa com os valores de perímetro abdominal, PCRhs, ácido úrico e TGs. Estas importantes associações foram mais evidentes para o subgrupo de doentes com valores de c-HDL normais, e aparecem menos correlacionadas no subgrupo com baixos níveis de c-HDL, o que parece indicar que quando os níveis de c-HDL são inferiores aos valores de referência existe uma desregulação dos vários factores envolvidos (lipídicos, oxidativos, inflamatórios e angiogénicos), com um impacto possivelmente importante sobre a evolução da doença vascular.

Considerando a importância cardiometabólica dos níveis baixos de c-HDL neste tipo de doentes com factores de risco cardiovasculares prévios, mesmo quando já estão medicados para as suas patologias e até com as concentrações de c-LDL normalizadas, medidas terapêuticas capazes de melhorar os níveis de c-HDL e a qualidade/funcionalidade das HDL, assim como inibir a oxidação das LDL, podem ser fundamentais para reduzir o risco residual previamente identificado neste tipo de populações, nomeadamente reduzindo os mecanismos oxidativos, inflamatórios e angiogénicos subjacentes à evolução da doença. Uma vez que o arsenal terapêutico actual tem um impacto limitado sobre os níveis de c-HDL, nomeadamente a medicação mais habitual, como as estatinas, as medidas não-farmacológicas devem merecer mais atenção, bem como novos agentes, que possam mostrar mais eficácia no aumento dos níveis de c-HDL e sobretudo da sua qualidade/funcionalidade, e conseqüentemente dos seus efeitos benéficos, incluindo a redução da oxidação das LDL, bem como de mediadores inflamatórios deletérios. Na verdade, os dados actuais recomendam cada vez mais medidas agressivas para aumentar os níveis de c-HDL e a funcionalidade das HDL como parte da prevenção e tratamento da DCC (doença cardíaca coronária), enquanto novas estratégias farmacoterapêuticas dirigidas ao equilíbrio c-HDL/LDL-ox continuam sob investigação e avaliação (Degoma e col., 2011; Mahdy e col., 2012; Kypreos e col., 2013; Nilsson e col., 2007; Hulthe e col., 2004).

Em conclusão, com esta parte do trabalho, podemos dizer que numa população de doentes com factores de risco cardiovascular diagnosticados, os baixos níveis de c-HDL estão associados a um perfil cardiometabólico menos favorável, apesar dos valores normalizados de c-LDL. Esta condição fica mais evidente analisando marcadores lipídicos não-tradicionais, incluindo as subpopulações de HDL (HDL grandes e pequenas), as LDL-ox, bem como marcadores de inflamação e angiogénese, como a PCRhs, a adiponectina e o VEGF. A existência de níveis normais de c-HDL, e mais ainda a melhoria da funcionalidade/qualidade das HDL, a redução das LDL-ox e da PCRhs, e os valores mais elevados de adiponectina, podem prevenir a evolução da doença cardiovascular neste tipo de populações, muitas vezes identificadas como sendo de risco cardiovascular "residual", mas que regularmente são aquelas que são atingidas por eventos cardio e cerebrovasculares, muitas vezes fatais. Portanto, intervenções terapêuticas

farmacológicas e não-farmacológicas mais adequadas e direccionadas para elevar os níveis de c-HDL e sobretudo a funcionalidade das HDL, e diminuir o conteúdo de LDL-ox são medidas preventivas recomendadas neste tipo de populações de risco CV.

7.1.5 – Referências

- Assmann G, Cullen P, Fruchart JC, et al. Implications of emerging risk factors for therapeutic intervention. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2005; 15(5):373-81.
- Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annual Review of Medicine* 2003; 54:321-41.
- Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, et al. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124 Suppl:S11-20.
- Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, et al. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20(12):2670-6.
- Asztalos BF, Schaefer EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atherosclerosis* 2003; 4(1):21-9.
- Badimon L, Vilahur G. LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012; 1254:18-32.
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, et al. Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation Research* 2004; 95(8):764-72.
- Besler C, Heinrich K, Riwanto M, et al. High-density lipoprotein-mediated anti-atherosclerotic and endothelial-protective effects: a potential novel therapeutic target in cardiovascular disease. *Current Pharmaceutical Design* 2010; 16(13):1480-93.
- Bieghs V, van Gorp PJ, Walenbergh SM, et al. Specific immunization strategies against oxidized low-density lipoprotein: a novel way to reduce nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2012; 56(3):894-903.
- Bieghs V, Van Gorp PJ, Wouters K, et al. LDL receptor knock-out mice are a physiological model particularly vulnerable to study the onset of inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 2012; 7(1):e30668.
- Brewer HB Jr. HDL Metabolism and the Role of HDL in the Treatment of High-risk Patients with Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reports* 2007; 9(6):486-92.
- Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine* 2011; 17(10):594-603.
- Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *New England Journal of Medicine* 2004; 350(15):1495-504.
- Cziraky MJ, Watson KE, Talbert RL. Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting. *Journal of Managed Care Pharmacy* 2008; 14(8 Suppl):S3-S28.
- De Bacquer D, Dallongeville J, Kotseva K, et al. Residual risk of cardiovascular mortality in patients with coronary heart disease: The EUROASPIRE Risk Categories. *International Journal of Cardiology* 2012; 168(2):910-914.
- Degoma EM, Rader DJ. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. *Nature Reviews Cardiology* 2011; 8(5):266-77.
- Eren E, Yilmaz N, Aydin O. High density lipoprotein and it's dysfunction. *Open Biochemistry Journal* 2012; 6:78-93.
- Fácil L, Núñez J, Sanchis J, et al. High density lipoproteins after acute coronary syndromes: evaluation of residual risk. *Revista Española de Cardiología (Engl. Ed.)* 2013; 66(1):65-6.

Fernandez ML, Jones JJ, Ackerman D, et al. Low HDL cholesterol is associated with increased atherogenic lipoproteins and insulin resistance in women classified with metabolic syndrome. *Nutrition Research and Practice* 2010; 4(6):492-8.

García-Heredia A, Marsillach J, Rull A, et al. Paraoxonase-1 inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced metabolic alterations and apoptosis in endothelial cells: a non directed metabolomic study. *Mediators of Inflammation* 2013; 2013:156053.

Genest JJ, Martin-Munley SS, McNamara JR, et al. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992; 85(6):2025-33.

Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, et al. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *American Journal of Cardiology* 1991; 67(15):1185-9.

Goldbourt U, Yaari S, Medalie JH. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. A 21-year follow-up of 8000 men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 17(1):107-13.

Grover SA, Kaouache M, Joseph L, et al. Evaluating the incremental benefits of raising high-density lipoprotein cholesterol levels during lipid therapy after adjustment for the reductions in other blood lipid levels. *Archives of Internal Medicine* 2009; 169(19):1775-80.

Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *Journal of the American Medical Association* 2003; 290(7):932-40.

Hayden MR, Tyagi SC. Isolated low high density lipoprotein-cholesterol (HDLC): implications of global risk reduction. Case report and systematic scientific review. *Cardiovascular Diabetology* 2005; 4(1):1.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular Risk. *New England Journal of Medicine* 2003; 348(7):593-600.

Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiologica* 2004; 59(5):479-84.

Hulthe J. Antibodies to oxidized LDL in atherosclerosis development-clinical and animal studies. *Clinica Chimica Acta* 2004; 348(1-2):1-8.

Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. *Current Opinion in Lipidology* 2009; 20(5):363-9.

Keys A. Seven Countries: A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease. *Annals of Internal Medicine* 1980; 93(5):786-787.

Khan HA, Alhomida AS, Sobki SH. Lipid profile of patients with acute myocardial infarction and its correlation with systemic inflammation. *Biomark Insights* 2013; 8:1-7.

Kim NH, Cho HJ, Kim YJ, et al. Combined effect of high-normal blood pressure and low HDL cholesterol on mortality in an elderly Korean population: the South-West Seoul (SWS) study. *American Journal of Hypertension* 2011; 24(8):918-23.

Kulah E, Tascilar O, Acikgoz S, et al. Oxidized LDL accumulation in experimental renal ischemia reperfusion injury model. *Renal Failure* 2007; 29(4):409-15.

Kural BV, Orem C, Uydu HA, et al. The effects of lipid-lowering therapy on paraoxonase activities and their relationships with the oxidant-antioxidant system in patients with dyslipidemia. *Coronary Artery Disease* 2004; 15(5):277-83.

LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *New England Journal of Medicine* 2005; 352(14):1425-35.

- Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity Reviews* 2005; 6(1):13-21.
- Mackness M, Durrington P, Mackness B. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 2004; 15(4):399-404.
- Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2002; 3(4):49-55.
- Mascarenhas-Melo F, Marado D, Palavra F, et al. Diabetes abrogates sex differences and aggravates cardiometabolic risk in postmenopausal women. *Cardiovascular Diabetology* 2013a; 12:61.
- Mascarenhas-Melo F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, et al. Markers of increased cardiovascular risk in postmenopausal women: focus on oxidized-LDL and HDL subpopulations. *Disease Markers* 2013b; 35(1):1-12.
- Matsuura E, Hughes GR, Khamashta MA. Oxidation of LDL and its clinical Implication. *Autoimmunity Reviews* 2008; 7(7):558-66.
- Mehra S, Movahed H, Movahed A. Emerging therapies for residual risk. *Reviews in Cardiovascular Medicine* 2012; 13(1):24-31.
- Mertens ANN, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in Atherothrombosis. *FASEB Journal* 2001; 15(12):2073-84.
- Nichols GA, Ambegaonkar BM, Sazonov V, et al. Frequency of obtaining National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III goals for all major serum lipoproteins after initiation of lipid altering therapy. *American Journal of Cardiology* 2009; 104(12):1689-94.
- Nichols M, Townsend N, Scarborough P, et al. European cardiovascular disease statistics, 2012 edition. British Heart Foundation Health Promotion Research Group and Health Economics Research Centre.
- Nilsson J, Nordin Fredrikson G, Schiopu A, et al. Oxidized LDL antibodies in treatment and risk assessment of atherosclerosis and associated cardiovascular disease. *Current Pharmaceutical Design* 2007; 13(10):1021-30.
- Nofer JR, Brodde MF, Kehrel BE. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2010; 37(7):726-35.
- Orem C, Orem A, Uydu HA, et al. The effects of lipid lowering therapy on low-density lipoprotein auto-antibodies: relationship with low density lipoprotein oxidation and plasma total antioxidant status. *Coronary Artery Disease* 2002; 13(1):65-71.
- Palavra F, Marado D, Mascarenhas-Melo F, et al. New markers of early cardiovascular risk in multiple sclerosis patients: Oxidized-LDL correlates with clinical staging. *Disease Markers* 2013; 34(5):341-8.
- Pedersen TR, Faergeman O, Kastelein JJ, et al. High-dose atorvastatin vs usual-dose simvastatin for secondary prevention after myocardial infarction: the IDEAL study: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 2005; 294(19):2437-45.
- Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. High-density lipoprotein subfractions - what the clinicians need to know. *Cardiology* 2013; 124(2):116-25.
- Popa CD, Arts E, Fransen J, et al. Atherogenic index and high-density lipoprotein cholesterol as cardiovascular risk determinants in rheumatoid arthritis: the impact of therapy with biological. *Mediators of Inflammation* 2012; 2012:785946.

Rodríguez C, González-Díez M, Badimon L, et al. Sphingosine-1-phosphate: A bioactive lipid that confers high-density lipoprotein with vasculoprotection mediated by nitric oxide and prostacyclin. *Thrombosis and Haemostasis* 2009; 101(4):665-73.

Schaefer JR. HDL level or HDL function as the primary target in preventive cardiology. *Herz* 2012; 37(1):51-5.

Soran H, Hama S, Yadav R, et al. HDL functionality. *Current Opinion in Lipidology* 2012; 23(4):353-66.

Stone NJ. Reducing residual risk in secondary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*

Tekin IO, Sipahi EY, Comert M, et al. Low-density lipoproteins oxidized after intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research* 2009; 157(1):e47-54.

Tekin NS, Tekin IO, Barut F, et al. Accumulation of oxidized low-density lipoprotein in psoriatic skin and changes of plasma lipid levels in psoriatic patients. *Mediators of Inflammation* 2007; 2007:78454.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106(25):3143-421.

Wang Z, Nakayama T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators of Inflammation* 2010; 2010:535918.

Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97:1837-1847.

Woodman RJ, Playford DA, Watts GF. Basal production of nitric oxide (NO) and non-NO vasodilators in the forearm microcirculation in Type 2 diabetes: associations with blood pressure and HDL cholesterol. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2006; 71(1):59-67.

7.2 – Perfil cardiometabólico em doentes dislipidémicos com baixos valores de c-HDL e/ou altos valores de TGs – importância das subpopulações de HDL, LDL oxidadas, adiponectina e ácido úrico

7.2.1 – Introdução

Os inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima (HMG-CoA) redutase, também conhecidos como estatinas, são os agentes de primeira linha para a redução dos teores lipídicos em doentes com DCV e revolucionaram o tratamento da dislipidemia. Um tratamento antidislipidémico eficaz reduz significativamente o risco cardiovascular, como tem sido evidenciado: a redução de 10% no colesterol total está associada a uma diminuição de 25% na incidência de doença arterial coronária (DAC) em cinco anos; mais ainda, a redução do c-LDL em 40 mg/dL (1 mmol/L) com estatinas origina uma redução de 20% no risco de eventos coronários (Baigent e col., 2005; Cannon e col., 2006); por cada redução de 1 mmol/L de c-LDL, o risco de mortalidade por doença arterial coronária (DAC) diminui em 19% e a mortalidade geral diminui em 12% (Baigent e col., 2005; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators e col., 2008). No entanto, um número significativo de doentes medicados com estatinas tem dislipidemia persistente, como demonstrado pelo estudo internacional de dislipidemia (DYSIS) que relatou os dados de vários países europeus, incluindo de Portugal (da Silva e col., 2008; Horgan e col., 2011; Drexel e col., 2011; Gitt e col., 2010).

Recentemente, vários autores têm vindo a concentrar a atenção sobre o conceito de risco cardiovascular residual (RCVR) (Vanuzzo, 2011; Hermans e Fruchart, 2010). De acordo com Hermans e Fruchart (2010), o RCVR poderá ser definido como o "risco residual de eventos vasculares ou progressão de lesão vascular que persistem em doentes tratados com as terapêuticas actualmente recomendadas com base nas melhores evidências científicas, incluindo o risco associado aos factores de risco estabelecidos, como a dislipidemia, a hiperglicemia, a inflamação e de estilos de vida menos saudáveis, ou risco relacionado com factores emergentes". Parece hoje evidente que um número significativo de eventos cardiovasculares ocorre em doentes sob terapêutica com estatinas; ou seja, o RCVR continua elevado mesmo em ensaios clínicos em que os níveis

de c-LDL foram agressivamente reduzidos (Cannon e col., 2004; LaRosa e col., 2005; Pedersen e col., 2005). Como resultado, tem havido maior atenção para os níveis elevados TGs e reduzidos de c-HDL e das suas contribuições significativas para o RCVR, mesmo quando os níveis de c-LDL estão bem controlados (Cziraky e col., 2008; Alagona, 2009).

Os baixos níveis de c-HDL foram amplamente reconhecidos como um fator de risco para doença coronária e níveis elevados como um factor de protecção, de acordo com estudos epidemiológicos realizados em indivíduos e/ou doentes que não responderam eficazmente ao tratamento com estatinas (Asztalos e Schaefer, 2003; Hayden e Tyagi, 2005; Gordon e col., 1977). Embora o c-HDL tenha sido tradicionalmente associado à ateroprotecção, o conceito de "qualidade das HDL" como um parâmetro importante na redução da mortalidade cardiovascular tem vindo a ganhar terreno e a funcionalidade das HDL tem sido reconhecida como um possível alvo farmacológico para terapêuticas baseadas na modulação do c-HDL (Kypreos e col., 2013; Tsompanidi e col., 2009; Camont e col., 2011; Schaefer, 2012). A qualidade do HDL refere-se à composição e funções das partículas das subpopulações de HDL presentes num dado indivíduo, que poderão determinar quando o HDL é mais ou menos ateroprotector, ou mesmo pró-aterogénico (Kypreos e col., 2013; Tsompanidi e col., 2009). No entanto, a definição de qualidade das HDL permanece um conceito vago e mais estudos são necessários para esclarecer as verdadeiras diferenças entre as partículas de HDL e as suas diferentes funcionalidades. No entanto, variações nos níveis das subfracções e nas funções de HDL têm sido observadas em distintas populações com DCV, que sugerem que as partículas grandes de HDL estão inversamente associadas com o desenvolvimento da aterosclerose, enquanto as pequenas subpopulações de HDL estão positivamente ligadas com a DCV (Tsompanidi e col., 2009; Camont e col., 2011; Schaefer, 2012; Asztalos e col., 2000; Pirillo e col., 2013; Mascarenhas-Melo e col., 2013a; Mascarenhas-Melo e col., 2013b; Palavra e col., 2013).

Por outro lado, alguns dados sugerem que a dificuldade/incapacidade em atingir os objectivos terapêuticos na hipertrigliceridemia, pode estar relacionada com situações de sobreprodução de lipoproteínas ricas em TGs e/ou da diminuição do seu catabolismo, (Querton e col., 2012). Níveis de TGs elevados são considerados um factor de risco independente para doenças cardiovasculares, mesmo quando outros factores estão

controlados (Sarwar e col., 2007; Hopkins e col., 2005; McBride, 2008), e o tratamento da hipertrigliceridemia em vários ensaios clínicos tem mostrado reduzir os eventos cardiovasculares, a mortalidade de causa cardíaca e a mortalidade total (McBride, 2008; Miller e col., 2008; Keech e col., 2005). Os doentes com TGs elevados estão em risco particularmente elevado de DCV, nomeadamente quando coexistem com baixos níveis de c-HDL (Genest e col., 1992; Ginsberg, 2002). Devido à importância que os níveis de c-HDL e de TGs têm vindo a ganhar, a razão TGs/c-HDL tem sido sugerida como um possível marcador para a determinação do risco cardiovascular. Em adultos, o índice TGs/c-HDL foi usado para identificar doentes com dislipidemia e resistência à insulina (Quijada e col., 2008; McLaughlin e col., 2005); em adultos com excesso de peso, Barter e col. (2007) demonstraram recentemente que apenas os indivíduos com um aumento dos TGs e diminuição nos níveis de c-HDL apresentavam hipertensão, níveis elevados de PCR, e resistência à insulina. Para além disso, estes estudos reforçam a ideia de que os factores de risco clássicos explicam apenas cerca de 50-60% das doenças cardiovasculares (Wilson e col., 1998); assim, tem havido um crescente interesse em identificar novos biomarcadores que possam melhorar a previsão global do risco de doenças cardiovasculares (Hackam e Anand, 2003; Assmann e col., 2005).

Este estudo teve como objectivo avaliar a influência de níveis baixos de c-HDL e/ou elevados de TGs sobre o perfil cardiometabólico de doentes com factores de risco cardiovascular, mas apresentando valores normalizados de c-LDL, utilizando tanto marcadores tradicionais como novos não-tradicionais (também designados como emergentes), incluindo as subpopulações de HDL, as LDL oxidadas (LDL-ox) e mediadores inflamatórios e de angiogénese.

7.2.2 – População e métodos

7.2.2.1 – População, critérios de inclusão e considerações éticas

Cento e sessenta e nove doentes com factores de risco cardiovasculares foram incluídos no estudo, com idades compreendidas entre os 33 e os 75 anos. Foram divididos em dois grandes grupos com base nos níveis de c-HDL: um grupo de 119 doentes com

concentrações séricas normais de c-HDL (71 do sexo masculino e 48 do sexo feminino) e outro de 50 indivíduos com baixas concentrações de c-HDL (17 homens e 33 mulheres), usando o *cut-off* de 1,03 mmol/L para os homens e 1,29 mmol/L para as mulheres. Cada um destes grupos foi subdividido em dois subgrupos, com base nas concentrações séricas de TGs: um subgrupo de doentes com valores normais de TGs e outro com valores altos de TGs, usando o *cut-off* de 1,69 mmol/L. Assim, no total foram analisados quatro subgrupos de doentes: A) níveis normais de c-HDL e de TGs (n = 83), B) níveis de c-HDL normais e elevados de TGs (n = 36), C) níveis de c-HDL baixos e normais de TGs (n = 17) e D) níveis de c-HDL baixos e elevados de TGs (n = 33). Os *cut-off* para os níveis de c-HDL e de TGs foram escolhidos de acordo com as directrizes do NCEP ATP III. Todos os grupos foram definidos como tendo factores de risco cardiovascular por terem um diagnóstico prévio e/ou tratamento farmacológico para hipertensão e/ou diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e/ou dislipidemia. A DMT2 foi diagnosticada na Unidade de Diabetes e Doenças Metabólicas do Centro Hospitalar de Coimbra, E.P.E. (dos Covões), de acordo com as recomendações actualizadas da ADA (Associação Americana de Diabetes) e da AEED (Associação Europeia para o Estudo da Diabetes). Os doentes com diagnóstico prévio e/ou tratamento para a hipertensão e dislipidemia foram recrutados durante a realização de análises laboratoriais de rotina, no Laboratório de Análises Clínicas da Covilhã, onde expressaram estar a fazer terapêutica anti-hipertensiva e/ou antidislipidémica após um diagnóstico clínico e laboratorial adequado, de acordo com a “*International Society of Hypertension/World Health Organization*” e o “*Seventh Joint National Committee on Hypertension*” e o “*National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III*” (NCEP ATP III) para hipertensão e dislipidemia, respectivamente. Para além da hipertensão, dislipidemia e diabetes descritas, alguns doentes manifestaram a existência de outras patologias do foro cardiovascular, nomeadamente: enfarte agudo do miocárdio, AVC, angina de peito, fibrilhação auricular, arritmia, insuficiência cardíaca, doença coronária e arterial, valvulopatia cardíaca e doença vascular periférica. Os doentes do subgrupo com níveis de c-HDL normais estavam sob a seguinte medicação: 19,33% com insulina, 52,94% com antidiabéticos orais (ADO) dos quais sulfonilureias, metformina, moduladores de incretinas, inibidores da glucosidase intestinal α e rosiglitazona; 65,55% com antidislipidémicos, distribuídos por estatinas e fibratos; 68,07% sob acção de anti-hipertensores dos quais inibidores da enzima de conversão da

angiotensina, diuréticos, antagonistas dos receptores da angiotensina, bloqueadores da entrada de Ca^{2+} e depressores da actividade adrenérgica; os doentes do subgrupo com níveis de c-HDL baixos estavam sob a seguinte medicação: 10,92% com insulina, 56,00% com antidiabéticos orais (ADO) dos quais sulfonilureias, metformina, moduladores de incretinas, inibidores da glucosidase intestinal- α , rosiglitazona e pioglitazona; 60,00% com antidislipidémicos, distribuídos por estatinas, fibratos, ezetemiba e omega-3; 76,00% sob a acção de anti-hipertensores dos quais inibidores da enzima de conversão da angiotensina, diuréticos, antagonistas dos receptores da angiotensina, bloqueadores da entrada de Ca^{2+} e depressores da actividade adrenérgica. É de salientar que vários doentes estavam sujeitos a terapêuticas combinadas de vários fármacos.

As mulheres grávidas e a amamentar, bem como os indivíduos com idade inferior a 16 anos e superior a 75 anos foram excluídas do estudo. O estudo foi realizado de acordo com o código de ética da Associação Médica Mundial (Declaração de Helsínquia) para estudos em humanos e recebeu autorização dos comités de ética locais, bem como de todos os participantes, que leram e assinaram por escrito um termo de consentimento informado.

7.2.2.2 – Recolha de dados e colheita de sangue

A recolha de dados e colheita de sangue foram realizadas de acordo com o descrito na sessão 4.2.2.

7.2.2.3 – Determinações analíticas

Foram doseados os parâmetros segundo os métodos descritos na sessão 4.2.3. A HbA1c foi medida utilizando um teste de imunoaglutinação em látex através do aparelho DCA 2000+ (Bayer Diagnostics, Barcelona, Espanha).

7.2.2.4 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico IBM para ciências sociais SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows, versão 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA). A distribuição das variáveis contínuas foi analisada

utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov, para avaliar desvios significativos da normalidade. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste t de amostras independentes e o teste de Mann-Whitney, consoante as variáveis seguiam distribuição normal ou não, respectivamente, para cada população em análise. A associação entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste de Pearson. Foi considerado estatisticamente significativo um P menor que 0,05.

7.2.3 – Resultados

7.2.3.1 – Caracterização geral das populações

Cento e sessenta e nove pacientes foram incluídos no estudo: 119 com níveis normais de c-HDL e 50 com níveis baixos de c-HDL. O grupo com níveis normais de c-HDL, foi subdividido em 2 subgrupos: um com níveis normais TGs (população A), que incluiu 83 indivíduos, e outro com valores elevados de TGs (população B), que incluiu 36 indivíduos. Em relação ao grupo com baixos níveis de c-HDL, 17 indivíduos foram incluídos no subgrupo com conteúdos normais de TGs (população C) e 33 no subgrupo com altos níveis de TGs (população D). Ao longo do texto, três comparações principais serão analisadas de modo a uma melhor apreciação das diferenças e análise dos efeitos das variações nos níveis de c-HDL e de TGs em circunstâncias distintas (tal como indicado nas tabelas): Comparação 1 - efeitos de níveis de TGs (normais vs altos) em condições de níveis normais e baixos de c-HDL, comparando a população A com a B e a C com a D; comparação 2 - efeitos dos níveis de c-HDL (normais vs baixos) em condições de TGs normais e altos, comparando a população A com a C e a B com a D; comparação 3 - efeitos de variações simultâneas dos níveis de c-HDL e de TGs, por comparação da população A com a D e da B com a C.

Os dados demográficos e antropométricos das quatro populações estão resumidos na Tabela 7.2.1. Os grupos de c-HDL normal e baixo estão emparelhados para a idade, não havendo alterações entre as quatro populações, enquanto maiores valores de IMC e de perímetro abdominal se verificaram nos subgrupos com alto teor de TGs, independentemente dos níveis de c-HDL (populações B e D). As mesmas populações

também demonstraram uma tendência para conteúdos mais elevados de glicemia, apesar de não estatisticamente significativos. Em relação à pressão arterial, não foram encontradas diferenças entre os subgrupos para todas as comparações (Tabela 7.2.1).

7.2.3.2 – Perfis glicídico e lipídico clássicos

A maioria dos doentes estavam sob terapêutica antidislipidémica, o que pode justificar alguns dos dados obtidos para o perfil lipídico clássico. Em relação à primeira comparação (efeitos dos níveis de TGs), a população B (com alto teor de TGs e níveis normais de c-HDL) apresentou, em comparação com a população A (com níveis normais de c-HDL e de TGs), valores significativamente mais elevados de todos os parâmetros lipídicos, incluindo c-total, TGs (como seria de esperar, pela definição do próprio grupo), c-LDL, c-nHDL, c-Total/c-HDL, c-LDL/c-HDL e TGs/c-HDL (Tabela 7.2.2). Sob condições de baixo c-HDL, o subgrupo com níveis altos de TGs (população D) também apresentou valores significativamente superiores de c-Total, TGs, c-nHDL, c-Total/c-HDL e TGs/c-HDL.

Em relação à segunda comparação (efeitos do c-HDL), independentemente do conteúdo em TGs (normais ou altos) as populações com baixos níveis de c-HDL apresentam valores superiores de TGs, c-Total/c-HDL, c-LDL/c-HDL e TGs/c-HDL, sem alterações nos valores de c-LDL e c-nHDL (Tabela 7.2.2).

Finalmente, os efeitos das variações simultâneas de TGs e c-HDL (comparação 3) foram mais pronunciados quando os dois parâmetros estão fora dos valores recomendados: comparando a população A ([c-HDL] normal e [TGs] normal) com a população D ([c-HDL] baixa e [TGs] alta), esta última apresentou valores significativamente superiores de c-Total, TGs, c-LDL, c-nHDL, c-Total/c-HDL, c-LDL/c-HDL e TGs/c-HDL (Tabela 7.2.2). Ao comparar a população B ([c-HDL] normal e [TGs] elevada) com a população C ([c-HDL] baixa e [TGs] normal), o perfil lipídico foi claramente pior quando os TGs são mais elevados do que quando o c-HDL é baixo; na verdade, a população B apresentou valores significativamente aumentados de c-Total, TGs, c-nHDL, c-LDL/c-HDL e TGs/c-HDL (Tabela 7.2.2).

7.2.3.3 – LDL-ox, subpopulações de HDL e actividade paraoxonase da PON1

Constatou-se, relativamente à primeira comparação (efeitos dos níveis de TGs), que a população B apresentava valores significativamente mais elevados de LDL-ox do que a população A; avaliando os níveis de c-HDL (comparação 2) não se verificaram alterações neste parâmetro [Tabela 7.2.2 e Figura 7.2.1 (c)]. Quando avaliado o efeito dos níveis de c-HDL e de TGs em simultâneo (comparação 3), a população D apresentou valores significativamente superiores de LDL-ox relativamente à população A [Tabela 7.2.2 e Figura 7.2.1 (c)].

Quanto ao conteúdo das subpopulações de HDL, a tabela 7.2.2 e as figuras 7.2.1 (a) e (b) expressam os efeitos do c-HDL e dos níveis de TGs. Tanto os valores mais baixos de c-HDL ou os mais elevados de TGs promovem uma degradação da qualidade do HDL, traduzida pela redução significativa da percentagem das subpopulações grandes de HDL e aumento das pequenas. A actividade paraoxonase manteve-se inalterada entre as quatro populações estudadas, em todas as comparações (Tabela 7.2.2).

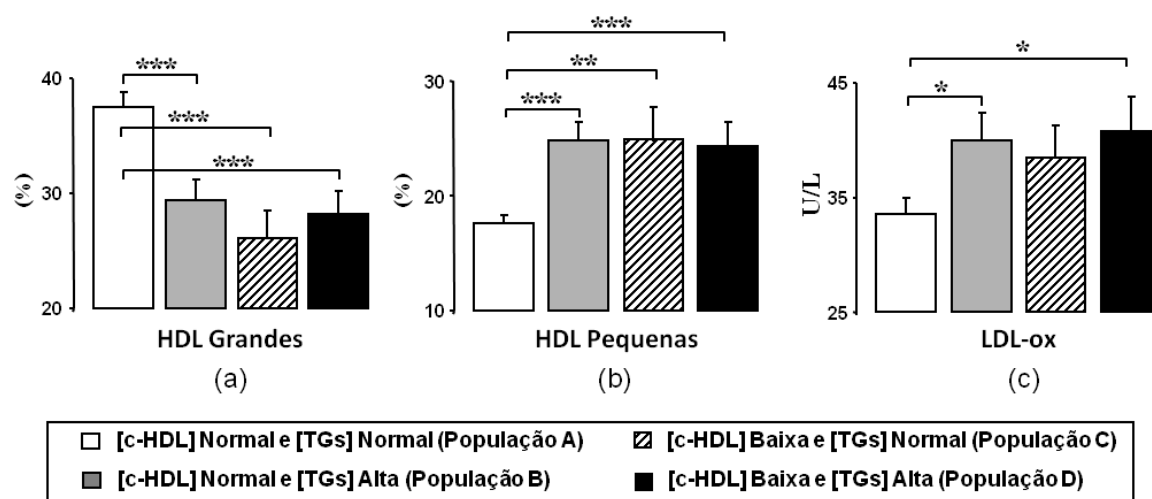


Figura 7.2.1 – Percentagem sérica das subpopulações de HDL grandes (a), HDL pequenas (b) e concentração sérica de LDL-ox (c) nas populações em estudo. Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$.

7.2.3.4 – Marcadores séricos de inflamação, angiogénese e lesão endotelial

Os conteúdos de PCRhs, TNF- α e ICAM-1 não sofreram alterações entre as populações, apesar de uma tendência para uma redução da ICAM-1 na população D (de níveis baixos de c-HDL e elevados de TGs), que foi significativamente mais baixa quando comparada com a população A (níveis normais de c-HDL e normais de TGs) (Tabela 7.2.3). A concentração de adiponectina foi significativamente inferior somente no subgrupo com níveis baixos de c-HDL e elevados de TGs (população D), e o valor foi estatisticamente significativo quando comparado com a população A (níveis normais de c-HDL e normais de TGs) e com a população C (baixos níveis de c-HDL e normais TGs) [Tabela 7.2.3 e Figura 7.2.2 (a)]. Perfil semelhante foi encontrado para o VEGF, com um teor significativamente mais elevado no subgrupo com alteração simultânea de c-HDL e de TGs (população D) que foi estatisticamente significativo quando comparado com o subgrupo com níveis normais de c-HDL e de TGs (população A) [Tabela 7.2.3 e Figura 7.2.2 (b)]. Finalmente, os valores de ácido úrico foram superiores nos subgrupos com TGs altos (população B vs A e D vs C), independentemente dos níveis normais ou baixos de c-HDL [Tabela 7.2.3 e Figura 7.2.2 (c)].

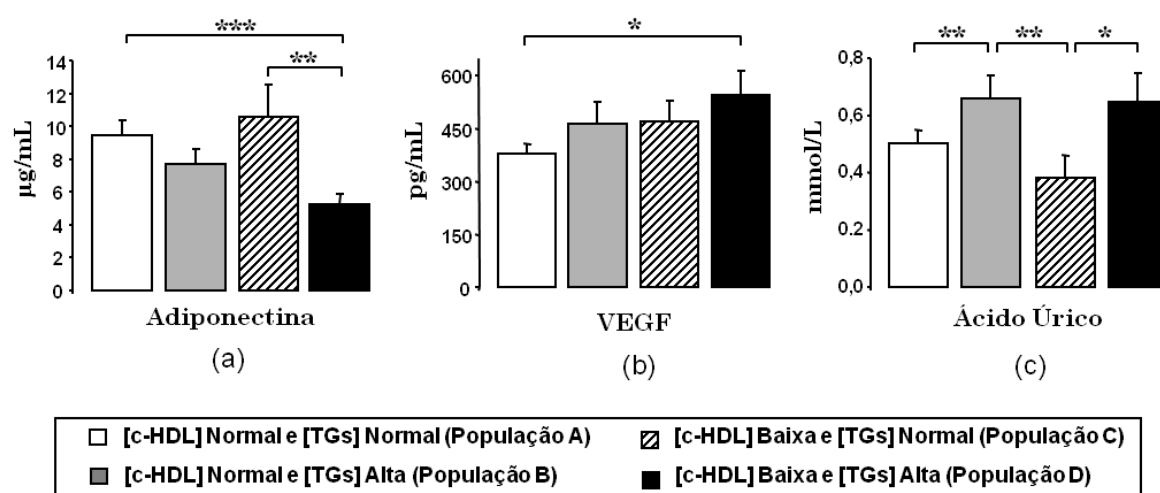


Figura 7.2.2 – Concentração sérica da adiponectina (a), VEGF (b) e ácido úrico (c) nas populações em estudo. Os resultados estão apresentados em média \pm e.p.m. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$.

7.2.3.5 – Análises de correlações entre marcadores nos subgrupos em estudo

Para alguns marcadores descritos anteriormente, os quais apresentavam alterações entre subgrupos, foram encontradas várias correlações significativas, particularmente na população A. Os parâmetros mais interessantes das análises de correlações foram as subpopulações de HDL grandes e pequenas, as LDL-ox, o ácido úrico, a adiponectina e o perímetro abdominal.

Os valores das LDL-ox no subgrupo de c-HDL normal e TGs normais (população A) foram negativa e significativamente correlacionados com as HDL grandes ($r = -0,295$, $p = 0,014$) e positiva e significativamente correlacionados com as HDL pequenas ($r = 0,430$, $p = 0,000$); estas correlações não foram encontradas nas outras três subpopulações (Figura 7.2.3).

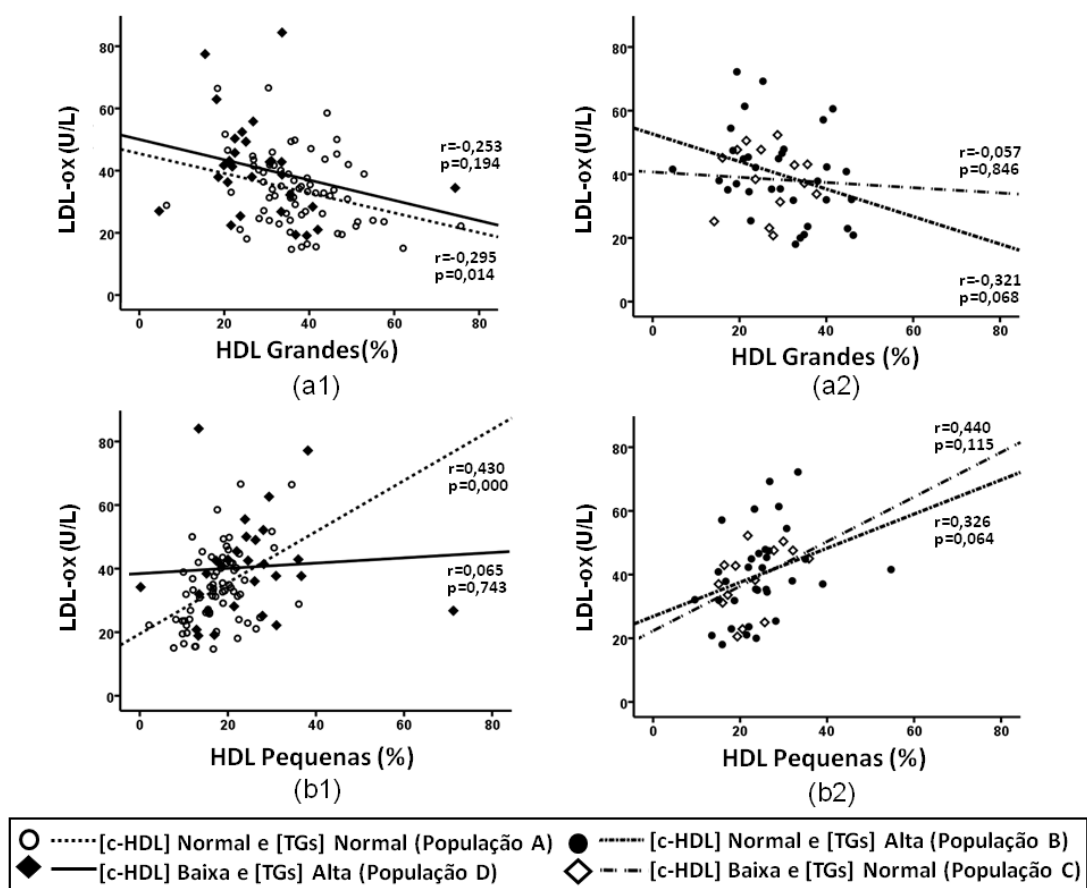


Figura 7.2.3 – Correlações entre as LDL-ox e as HDL grandes (painel superior) e as HDL pequenas (painel inferior) nas subpopulações em estudo.

Quanto à adiponectina, na população A houve uma correlação positiva e significativa com as HDL grandes ($r = 0,276$, $p = 0,024$) e uma tendência para uma correlação negativa com as HDL pequenas ($r = -0,162$, $p = 0,192$); estas correlações não foram encontradas nas outras três subpopulações (Figura 7.2.4). Para além disso, também na população A, a adiponectina foi negativa e significativamente correlacionada com o perímetro abdominal ($r = -0,363$, $p = 0,004$) e com o ácido úrico ($r = -0,361$, $p = 0,016$), o qual também se correlacionou positiva e significativamente com o perímetro abdominal ($r = 0,544$, $p = 0,000$); mais uma vez, estas correlações estavam ausentes (não estatisticamente significativas) nas outras três subpopulações (Figura 7.2.5).

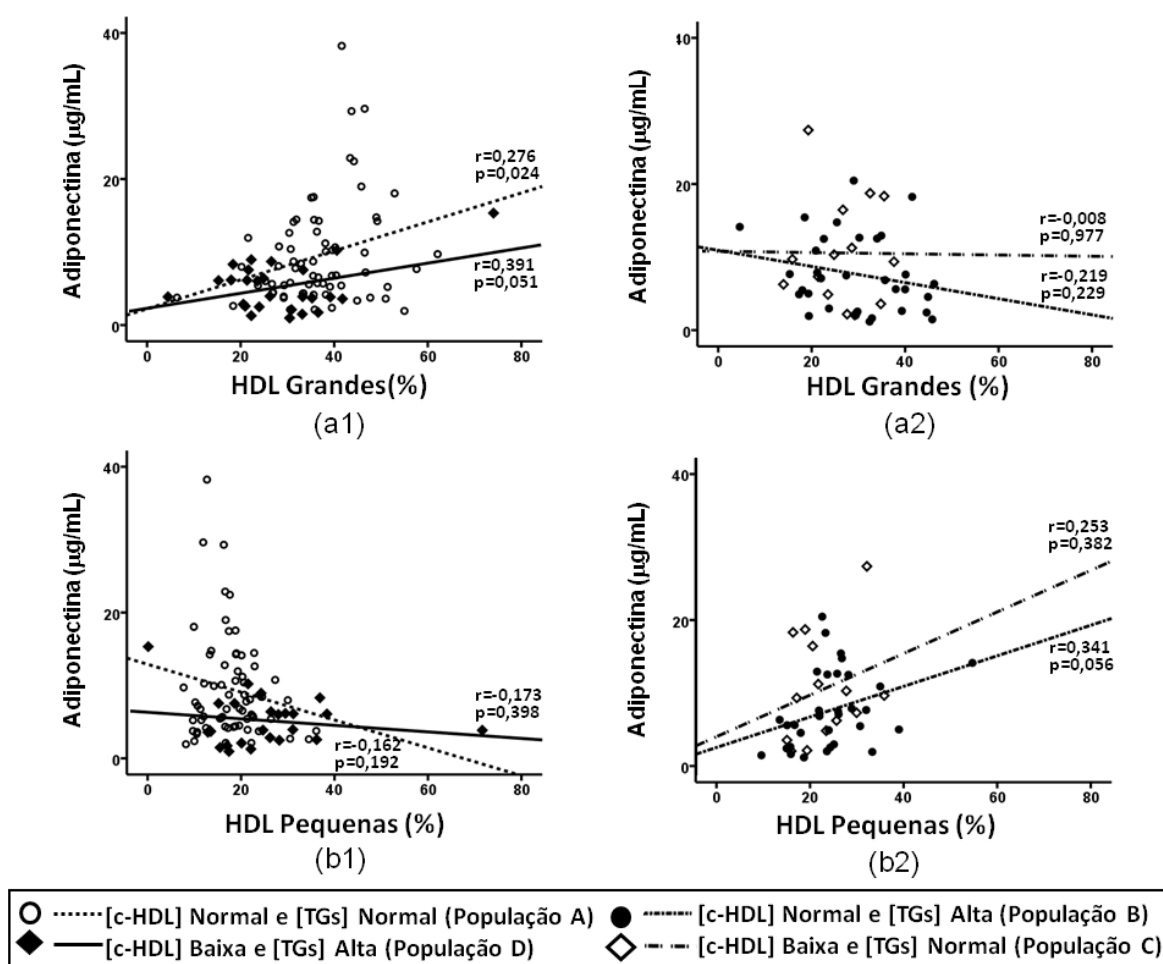


Figura 7.2.4 – Correlações entre a adiponectina e as HDL grandes (painel superior) e as HDL pequenas (painel inferior) nas subpopulações em estudo.

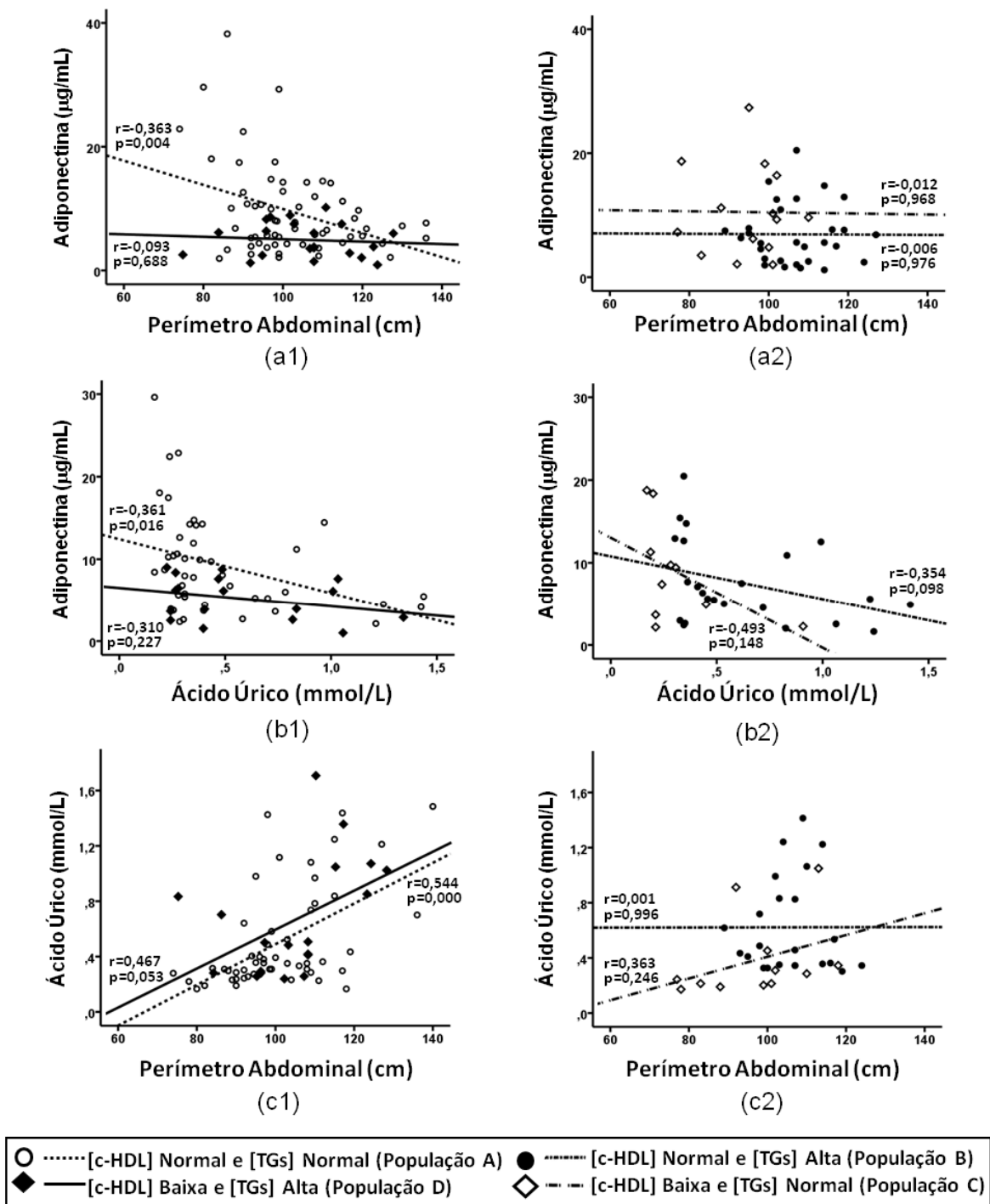


Figura 7.2.5 – Correlações entre a adiponectina e o perímetro abdominal (painel superior), entre a adiponectina e o ácido úrico (painel do meio) e entre o ácido úrico e o perímetro abdominal (painel inferior) nas subpopulações em estudo.

7.2.4 – Discussão e conclusão

É hoje amplamente reconhecido que as terapias antidislipidémicas actuais, em especial as direccionadas para reduzir os níveis de c-LDL, como as estatinas, são insuficientes para evitar parte dos eventos cardiovasculares; na verdade, o risco cardiovascular residual (RCVR) permanece elevado mesmo em ensaios clínicos em que os níveis de c-LDL foram agressivamente reduzidos (Cannon e col., 2004; LaRosa e col., 2005; Pedersen e col., 2005; De Bacquer e col., 2012 ; Mehra e col., 2012; Stone, 2012). Como resultado, tem havido uma maior atenção direccionada para os níveis elevados de TGs e/ou baixos de c-HDL e suas contribuições significativas para o RCVR, mesmo quando os níveis de c-LDL estão bem controlados (Cziraky e col., 2008; Alagona, 2009). Por exemplo, Genest e col. relataram que embora 34% dos pacientes com doença cardíaca prematura tivessem níveis de c-LDL > 160 mg/dL, mais de metade dos pacientes com doença cardíaca prematura (57%) tinham níveis baixos de c-HDL (Genest e col., 1992; Ginsberg, 2002). Para além disso, tem sido relatado que em doentes com DAC prematura, tanto nos homens como nas mulheres, os baixos níveis de c-HDL são o maior factor de risco para doença CV, embora muitas vezes estes indivíduos possuam também níveis elevados de TGs. Este estudo constatou também que os níveis de TGs eram significativamente mais elevados e os de c-HDL significativamente menores em homens e mulheres com DAC prematura, em comparação com os doentes do *Framingham Offspring Study* que não apresentavam doença coronária (Cziraky e col., 2008; Genest e col., 1992).

Os baixos níveis de c-HDL e a elevação dos TGs têm sido amplamente reconhecidos como factores de risco para doença coronária e/ou doença arterial (Asztalos e Schaefer, 2003; Hayden e Tyagi, 2005; Gordon e col., 1977; Sarwar e col., 2007; Hopkins e col., 2005; McBride, 2008), particularmente quando ambas as condições estão presentes (Genest e col., 1992; Ginsberg, 2002). Assim, em doentes medicados com estatinas, com níveis de c-LDL dentro dos valores recomendados, o c-HDL e os TGs têm vindo a ganhar particular relevância, como bons indicadores para a determinação do RCVR e importantes possíveis alvos terapêuticos para a prevenção de muitos eventos cardiovasculares. Várias evidências reforçam a ideia de que os factores de risco tradicionais, incluindo o perfil lipídico (nomeadamente o c-LDL), podem “não contar toda a história” sobre a progressão da DCV e a prevenção de eventos cardiovasculares e,

portanto, outras fracções lipídicas/componentes, tais como as HDL, os TGs e as LDL oxidadas (LDL-ox), podem ter um papel importante como biomarcadores e/ou metas para melhorar a saúde cardiovascular global (Cziraky e col., 2008; Alagona, 2009; Ishigaki e col., 2009; Holvoet, 2004). Na verdade, tem havido um crescente interesse em identificar novos biomarcadores, incluindo lipídicos, inflamatórios e angiogénicos, que possam melhorar a previsão global do risco de doença cardiovascular (Hackam e Anand, 2003; Assmann e col., 2005). O presente estudo teve como objectivo avaliar a influência de níveis baixos de c-HDL e/ou elevados de TGs, e a relevância relativa de cada um isoladamente e em conjunto sobre o perfil cardiometabólico de doentes com factores de risco cardiovascular, já sob medicação preconizada para as suas patologias, e com teores normalizados de c-LDL, utilizando tanto marcadores tradicionais como não-tradicionais (emergentes), incluindo as subpopulações de HDL, as LDL-ox e mediadores inflamatórios e de angiogénese.

O principal achado deste estudo é o de que os doentes com níveis controlados de c-LDL, como resultado da terapêutica antidislipidémica, em particular com estatinas, apresentam um perfil cardiometabólico mais nefasto, como resultado de uma dislipidemia isolada ou combinada de baixos níveis de c-HDL e hipertrigliceridemia. Este perfil cardiometabólico, que tem sido descrito como risco cardiovascular residual (mas não negligenciável), é melhor diagnosticado quando analisado em termos de marcadores não-tradicionais, incluindo as subpopulações de HDL (grandes e pequenas), as LDL-ox, o VEGF, a adiponectina e o ácido úrico.

Em relação ao perfil de obesidade, os resultados mostram claramente que os doentes com níveis elevados de TGs, independentemente dos valores de c-HDL (concentrações normais ou baixas), apresentam valores superiores de IMC (acima de 30 kg/m²) e de perímetro abdominal (acima de 105 cm). Vários outros estudos têm relacionado a obesidade com níveis elevados de TGs e baixos de c-HDL (Chan e col., 2004; Després e col., 1989). No nosso estudo, a elevada concentração de TGs parece ser mais importante na determinação da obesidade em doentes com factores de risco cardiovasculares. Esta ideia fica mais clara quando comparados os doentes com conteúdos normais de TGs e de c-HDL (população A) com doentes com baixos níveis de c-HDL e normais de TGs (população C), mostrando valores inalterados entre os grupos, apesar de ambas as populações já apresentarem excesso de peso (com IMC acima de 28

kg/m² para ambas). Perfil semelhante foi encontrado para o c-Total com níveis significativamente mais elevados nas populações com conteúdos elevados de TGs, independentemente das concentrações de c-HDL. Quanto ao c-LDL e às LDL-ox, verificou-se que os valores mais elevados são encontrados nas populações com altas concentrações de TGs, apesar de uma tendência para o aumento do conteúdo na população com valores baixos de c-HDL e normais de TGs. Assim, mais uma vez, a concentração elevada de TGs é mais importante do que os valores de c-HDL na influência sobre o c-LDL e as LDL-ox, em doentes com factores de risco cardiovascular e sob medicação antilipidémica.

A associação entre a doença cardiovascular e a oxidação das LDL tem sido amplamente demonstrada e estudos anteriores relataram uma relação interessante entre as LDL-ox e marcadores do perfil lipídico, em populações com risco cardiovascular, bem como em indivíduos saudáveis (Palavra e col., 2013; Burgos-Alves e col., 2010). Uma das associações mais relevantes mostra a relação inversa e funções contrárias das LDL oxidadas e do c-HDL na aterogénese e na DAC (Holvoet, 2004; Mertens e Holvoet, 2003; Assmann e col., 1996; Goldbourt e col., 1997). No que respeita à DAC, as LDL-ox são promotoras de processos fundamentais no início e na evolução da aterosclerose, incluindo a estimulação da infiltração de monócitos e a migração de células do músculo liso e sua proliferação; pelo contrário, os níveis elevados de c-HDL impedem o desenvolvimento da aterosclerose e da DAC, em particular devido ao transporte reverso do colesterol e à inibição da infiltração dos monócitos induzida pelas LDL-ox; na verdade, as LDL-ox e o c-HDL são antagonistas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Mertens e Holvoet, 2003). Estudos anteriores nossos, tanto em indivíduos saudáveis como em populações com risco cardiovascular, sugerem fortemente uma associação entre as LDL-ox e as subpopulações de HDL, o que era menos evidente quando analisado só o conteúdo total de c-HDL (Mascarenhas-Melo e col., 2013a; Mascarenhas-Melo e col., 2013b; Mascarenhas-Melo e col., 2013c). Esta parte do trabalho reforça essas associações, uma vez que os níveis de LDL-ox apresentaram correlações significativas com as subpopulações de HDL: inversa com as grandes e directa com as pequenas, em particular no subgrupo de doentes com valores normais de c-HDL e de TGs. Apesar do reconhecimento de uma associação entre os níveis baixos de c-HDL com o aumento do risco para a DAC (Assmann e col., 1996; Goldbourt e col., 1997), tem sido sugerido,

durante os últimos anos que um indicador melhor da funcionalidade das HDL pode ser a sua qualidade, o que depende do tipo de subpopulações (grandes vs pequenas) e constituintes, incluindo a actividade da PON1 (Eren e col., 2012; Soran e col., 2012; Mackness e col., 2004). No nosso estudo, a qualidade das HDL pode ser vista como reduzida nas duas populações, com alto teor de TGs assim como na população de TGs normais, mas com baixa concentração de c-HDL. Assim, tanto a dislipidemia de baixos níveis de c-HDL como a hipertrigliceridemia são, por si só, e não necessariamente cumulativamente, promotores de má qualidade das HDL, traduzida pela simultânea redução da percentagem em subpopulações grandes e aumento em pequenas. Este perfil foi semelhante ao encontrado para a concentração de LDL-ox, que mostrou correlações interessantes com as subpopulações de HDL, tal como relatado previamente. A implicação dos níveis de TGs na qualidade do HDL tem vindo a ganhar importância, conforme relatado também por outros autores (Yan e col., 2004; Tian e col., 2011). Estes estudos sugeriram que o tamanho das partículas de HDL tende a ser mais pequeno com o aumento da concentração de triglicéridos, indicando que a maturação do HDL pode ser dificultada e a eficiência do transporte reverso do colesterol (TRC) pode ser enfraquecida. O nosso estudo indica que quando os níveis de TGs são mais elevados, estes se associam com um pior conteúdo das subpopulações de HDL. Sobre a influência dos níveis de c-HDL nas subpopulações de HDL, alguns estudos têm demonstrado que indivíduos com baixos níveis de c-HDL exibem marcadas mudanças na composição das HDL e distribuição das subpopulações; alguns deles indicam que a percentagem de subpopulações maiores, bem como as partículas de HDL de tamanho médio, são reduzidas em indivíduos com níveis baixos de c-HDL (Watanabe e col., 2006; Pascot e col., 2001), o que está de acordo com os nossos resultados. A actividade da PON1, que tem sido apontada como um indicador da funcionalidade das HDL, manteve-se inalterada entre os grupos, o que está de acordo com dados anteriores por nós já relatados noutras populações de risco cardiovascular (Mascarenhas-Melo e col., 2013a; Mascarenhas-Melo e col., 2013b; Palavra e col., 2013), sugerindo que as subpopulações de HDL, e não a actividade da PON1, são melhores marcadores da qualidade das HDL. Se são a função e/ou a composição das HDL, e não tanto o seu conteúdo total, melhores marcadores do risco cardiovascular residual é uma questão interessante (ainda em aberto) que merece um esforço adicional por parte da comunidade científica.

A inflamação e stresse oxidativo são mecanismos fundamentais para a disfunção endotelial e desenvolvimento da aterosclerose, sendo as LDL oxidadas um dos principais intervenientes neste processo, juntamente com vários mediadores de inflamação (Ishigaki e col., 2009; Holvoet, 2004; Wang e Nakayama, 2010). O c-HDL exerce efeitos protectores directos sobre o endotélio, por estimulação da libertação de NO endotelial, bem como por efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anti-trombóticos (Assmann e Nofer, 2003; Barter e col., 2004; Nofer e col., 2010). Um desequilíbrio inflamatório, como manifestado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , o aumento da PCR, e/ou redução dos níveis de mediadores anti-inflamatórios e anti-aterogénicos, como a adiponectina, tem sido considerado um factor chave para o aumento do risco cardiovascular em algumas patologias (Mangge e col., 2010; Huang e col., 2010). Importância semelhante é agora atribuída ao fenómeno da angiogénese, que tem o VEGF como um biomarcador chave (um factor de crescimento peptídico secretado pelas células endoteliais vasculares), que estimula a angiogénese e vasculogénese, e que tem estado envolvido na patogénese de doenças cardiovasculares, tais como a aterosclerose (Kalka e col., 1999); também as moléculas de adesão intercelular, tais como as ICAM-1, têm sido associadas com a gravidade da aterosclerose e dos eventos cardiovasculares (Kitagawa e col., 2002). Outro novo marcador que merece a nossa atenção é o ácido úrico; embora o ácido úrico possa actuar como um antioxidante, a acumulação em excesso no soro é muitas vezes associada a várias condições, e por isso tem sido sugerido como um fator de risco independente para aterosclerose carotídea em pacientes com doenças cardiovasculares, bem como em diabetes tipo 2 (Li e col., 2011). No nosso estudo, embora tenham sido encontrados valores inalterados para a PCRhs, TNF- α e ICAM-1 entre as quatro populações sob avaliação, foi encontrada uma concentração reduzida de adiponectina e um aumento do conteúdo em VEGF na população de doentes com baixos níveis de c-HDL e altos teores de TGs, sugerindo que ambas as condições contribuem para estas alterações. Estudos anteriores indicaram uma associação entre os baixos níveis de adiponectina e valores elevados de triglicédeos e baixos de c-HDL, tanto em doentes como em indivíduos saudáveis (Kazumi e col., 2004; Izadi e col., 2013). No nosso estudo, os níveis de adiponectina apresentaram uma correlação importante com as subpopulações de HDL, de forma inversa com as subpopulações pequenas e de forma directa com as subpopulações grandes, mas não

com o conteúdo total de c-HDL; além disso, os níveis de adiponectina também apresentaram uma correlação inversa com o perímetro abdominal. Mais uma vez, as correlações foram mais evidentes e fortes na população com conteúdos normais de c-HDL e TGs, como ocorreu também para as correlações entre as LDL-ox e as subpopulações de HDL. Relativamente ao VEGF, as suas concentrações séricas já foram previamente correlacionadas com os parâmetros do perfil lipídico, incluindo com os TGs, em pacientes com hipercolesterolemia (Trapé e col., 2006). Finalmente, o conteúdo de ácido úrico foi significativamente aumentado em ambas as populações de doentes com níveis elevados de TGs, independentemente dos valores de c-HDL, sugerindo um impacto directo dos TGs, conforme relatado anteriormente (Zhao e col., 2005). Os níveis de ácido úrico apresentaram uma correlação inversa e significativa com a adiponectina e directa com o perímetro abdominal, em particular na população com conteúdos normais de c-HDL e TGs, de acordo com as correlações já anteriormente relatadas; todas estas correlações acentuam a ideia de haver uma forte relação entre estes factores lipídicos, oxidativos e inflamatórios. O facto destas associações serem menos evidentes nos subgrupos de doentes com baixos níveis de c-HDL e/ou alto teor de TGs parece indicar que sob uma situação de dislipidemia de c-HDL e/ou uma hipertrigliceridemia há uma desregulação dos factores (lipídicos, oxidativos e inflamatórios), com um possível impacto importante sobre a evolução da doença cardiometabólica e vascular.

Considerando o impacto cardiometabólico dos baixos níveis de c-HDL e/ou dos altos níveis de TGs sobre este tipo de doentes já com factores de risco cardiovasculares anteriores, mesmo quando as concentrações de c-LDL são adequadamente geridas pela medicação antilipidémica, medidas terapêuticas capazes de melhorar os níveis de c-HDL e a sua qualidade/funcionalidade e de reduzir a concentração de triglicédeos, podem ser de importância fundamental para reduzir o risco residual previamente identificado neste este tipo de populações, nomeadamente através da redução dos mecanismos oxidativos, inflamatórios e angiogénicos subjacentes à evolução da doença. Uma vez que o arsenal terapêutico actual é de impacto limitado sobre os níveis de c-HDL, em particular os medicamentos mais populares, incluindo as estatinas, e uma vez que a percentagem de doentes que apresentam dislipidemia de níveis baixos de c-HDL e/ou hipertrigliceridemia é preocupante, medidas não farmacológicas (incluindo o exercício físico regular e dietas com baixo teor de gordura e açúcar) devem merecer mais atenção.

De igual forma, novos agentes que possam comprovar maior eficácia na redução da concentração dos TGs e melhorar a qualidade das HDL e os seus efeitos benéficos, incluindo a redução da oxidação das LDL, bem como de mediadores inflamatórios nocivos, serão de elevada utilidade. Apesar de alguns resultados decepcionantes de alguns ensaios clínicos recentes, realizados para mostrar os supostos benefícios de uma farmacoterapia direccionada para o colesterol HDL, particularmente em termos de incidência de efeitos colaterais e resultados a curto e longo prazo no que diz respeito aos eventos cardiovasculares (Wright, 2013), há resultados positivos relacionados com o impacto do dalcetrapib, um inibidor da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), na qualidade das HDL (Ballantyne e col., 2012). Mais dados de grandes ensaios clínicos, destinados a avaliar o impacto sobre os eventos cardiovasculares de fármacos dirigidos a modular a concentração de HDL e/ou a sua qualidade, são necessários para melhor elucidar esta questão.

Em conclusão, numa população de doentes com factores de risco cardiovascular, níveis baixos de c-HDL e/ou altos de TGs estão associados a um perfil cardiometabólico menos favorável (ou mais nefasto). Esta condição, que muitas vezes ocorre em doentes sob medicação antidislipidémica, que apresentam mesmo concentrações de c-LDL normalizadas, foi chamada de risco cardiovascular residual. Contudo, apesar da terminologia “residual”, estes doentes, não raras vezes, são os que experimentam eventos fatais e não-fatais cardio e cerebrovasculares. O nosso estudo sugere que o risco cardiovascular residual é melhor identificado por biomarcadores não-tradicionais (emergentes) de carácter lipídico, incluindo as subpopulações de HDL, e as LDL oxidadas, assim como marcadores de inflamação, angiogénese e disfunção endotelial, tais como a adiponectina, o ácido úrico e o VEGF. Intervenções terapêuticas (farmacológicas e/ou não-farmacológicas) adequadas dirigidas para aumentar os níveis de c-HDL e, principalmente, a sua funcionalidade, e reduzir os teores séricos de TGs são medidas preventivas que se aconselham neste tipo de populações de risco CV.

7.2.5 – Referências

Alagona P Jr. Beyond LDL cholesterol: the role of elevated triglycerides and low HDL cholesterol in residual CVD risk remaining after statin therapy. *American Journal of Managed Care* 2009; 15(3 Suppl):S65-73.

Assmann G, Cullen P, Fruchart JC, et al. Implications of emerging risk factors for therapeutic intervention. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2005; 15(5):373-81.

Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annual Review of Medicine* 2003; 54:321-41.

Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, et al. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124 Suppl:S11-20.

Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, et al. Distribution of ApoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20(12):2670-6.

Asztalos BF, Schaefer EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atherosclerosis* 2003; 4(1):21-9.

Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366(9493):1267-78.

Ballantyne CM, Miller M, Niesor EJ, et al. Effect of dalcetrapib plus pravastatin on lipoprotein metabolism and high-density lipoprotein composition and function in dyslipidemic patients: results of a phase IIb dose-ranging study. *American Heart Journal* 2012; 163(3):515-21, 521.e1-3.

Barter P, McPherson YR, Song K, et al. Serum insulin and inflammatory markers in overweight individuals with and without dyslipidemia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007; 92(6):2041-5.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, et al. Antiinflammatory properties of HDL. *Circulation Research* 2004; 95(8):764-72.

Burgos-Alves MI, Avilés-Plaza F, Martínez-Tomás R, et al. Oxidized LDL and its correlation with lipid profile and oxidative stress biomarkers in young healthy Spanish subjects. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2010; 66(3):221-7.

Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine* 2011; 17(10):594-603.

Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *New England Journal of Medicine* 2004; 350(15):1495-504.

Cannon CP, Steinberg BA, Murphy SA, et al. Meta-analysis of cardiovascular outcomes trials comparing intensive versus moderate statin therapy. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48(3):438-45.

Chan DC, Barrett HP, Watts GF. Dyslipidemia in visceral obesity: mechanisms, implications, and therapy. *American Journal of Cardiovascular Drugs* 2004; 4(4):227-46.

Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Kearney PM, Blackwell L, et al. Efficacy of cholesterol lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. *Lancet* 2008; 371(9607):117-25.

Cziraky MJ, Watson KE, Talbert RL. Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting. *Journal of Managed Care Pharmacy* 2008; 14(8 Suppl):S3-28.

da Silva PM, Cardoso SM, Investigadores do Estudo DYSIS Portugal. Persistent lipid abnormalities in patients treated with statins: Portuguese results of the Dyslipidemia International Study (DYSIS). *Revista Portuguesa de Cardiologia* 2011; 30(1):47-63.

De Bacquer D, Dallongeville J, Kotseva K, et al. Residual risk of cardiovascular mortality in patients with coronary heart disease: The EUROASPIRE Risk Categories", *International Journal of Cardiology* 2013; 168(2):910-914.

Després JP, Moorjani S, Tremblay A, et al. Relation of high plasma triglyceride levels associated with obesity and regional adipose tissue distribution to plasma lipoprotein-lipid composition in premenopausal women. *Clinical & Investigative Medicine* 1989; 12(6):374-80.

Drexel H, Chazelle F, Fauer C, et al. Persistent dyslipidemia in Austrian patients treated with statins for primary and secondary prevention of atherosclerotic events - Results of the DYSlipidemia International Study (DYSIS). *Wien Klin Wochenschr* 2011; 123(19-20):611-7.

Eren E, Yilmaz N, Aydin O. High density lipoprotein and it's dysfunction. *Open Biochemistry Journal* 2012; 6:78-93.

Genest JJ, Martin-Munley SS, McNamara JR, et al. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation* 1992; 85(6):2025-33.

Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, et al. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *American Journal of Cardiology* 1991; 67(15):1185-9.

Ginsberg HN. New perspectives on atherogenesis: role of abnormal triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Circulation* 2002; 106(16):2137-42.

Gitt AK, Jünger C, Smolka W, et al. Prevalence and overlap of different lipid abnormalities in statin-treated patients at high cardiovascular risk in clinical practice in Germany. *Clinical Research in Cardiology* 2010; 99(11):723-33.

Goldbourt U, Yaari S, Medalie JH. Isolated low HDL cholesterol as a risk factor for coronary heart disease mortality. A 21-year follow-up of 8000 men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997; 17(1):107-13.

Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *American Journal of Medicine* 1977; 62(5):707-14.

Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *Journal of the American Medical Association* 2003; 290(7):932-40.

Hayden MR, Tyagi SC. Isolated low high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C): implications of global risk reduction. Case report and systematic scientific review. *Cardiovascular Diabetology* 2005; 4(1):1.

Hermans MP, Fruchart JC. Reducing residual vascular risk in patients with atherogenic dyslipidemia: where do we go from here? *Clinical Lipidology* 2010; 5(6):811-26.

Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiologica* 2004; 59(5):479-84.

Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, et al. Plasma triglycerides and type III hyperlipidemia are independently associated with premature familial coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 45(7):1003-12.

Horgan S, Crowley J, Feely J, et al. Prevalence of dyslipidaemia in statin-treated patients in Ireland: Irish results of the DYSlipidaemia International Study (DYSIS). *Irish Journal of Medical Science* 2011; 180(2):343-9.

Huang SS, Huang PH, Chen YH, et al. Association of adiponectin with future cardiovascular events in patients after acute myocardial infarction. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2010; 17(3):295-303.

Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. *Current Opinion in Lipidology* 2009; 20(5):363-9.

Izadi V, Farabad E, Azadbakht L. Epidemiologic evidence on serum adiponectin level and lipid profile. *International Journal of Preventive Medicine* 2013; 4(2):133-40.

Kalka C, Takahashi T, Masuda H, et al. Vascular endothelial factor (VEGF): therapeutic angiogenesis and vasculogenesis in the treatment of cardiovascular disease. *Med Klin (Munich)* 1999; 94(4):193-201.

Kazumi T, Kawaguchi A, Hirano T, et al. Serum adiponectin is associated with high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and low-density lipoprotein particle size in young healthy men. *Metabolism* 2004; 53(5):589-93.

Keech A, Simes RJ, Barter P, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 366(9500):1849-61.

Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, et al. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice. *Atherosclerosis* 2002; 160(2):305-10.

Kypreos KE, Gkizas S, Rallidis LS, et al. HDL particle functionality as a primary pharmacological target for HDL-based therapies. *Biochemical Pharmacology* 2013; 85(11):1575-8.

LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *New England Journal of Medicine* 2005; 352(14):1425-35.

Li Q, Yang Z, Lu B, et al. Serum uric acid level and its association with metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2011; 10:72.

Mackness M, Durrington P, Mackness B. Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 2004; 15(4):399-404.

Mangge H, Almer G, Truschnig-Wilders M, et al. Inflammation, Adiponectin, Obesity and Cardiovascular Risk. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17(36):4511-20.

Mascarenhas-Melo F, Marado D, Palavra F, et al. Diabetes abrogates sex differences and aggravates cardiometabolic risk in postmenopausal women. *Cardiovascular Diabetology* 2013a; 12:61.

Mascarenhas-Melo F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, et al. Implication of low HDL-c levels in patients with LDL-c average levels – focus on oxidized LDL, large HDL subpopulation and adiponectin. *Mediators Inflamm* 2013b; 2013:612038.

Mascarenhas-Melo F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, et al. Markers of increased cardiovascular risk in postmenopausal women: focus on oxidized-LDL and HDL subpopulations. *Disease Markers* 2013c; 35(1):1-12.

McBride P. Triglycerides and risk for coronary artery disease. *Current Atherosclerosis Reports* 2008; 10(5):386-90.

McLaughlin T, Reaven G, Abbasi F, et al. Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *American Journal of Cardiology* 2005; 96(3):399-404.

Mehra S, Movahed H, Movahed A. Emerging therapies for residual risk. *Reviews in Cardiovascular Medicine* 2012; 13(1):e24-31.

Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *The FASEB Journal* 2001; 15(12):2073-84.

- Miller M, Cannon CP, Murphy SA, et al. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; 51(7):724-30.
- Nofer JR, Brodde MF, Kehrel BE. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2010; 37(7):726-35.
- Palavra F, Marado D, Mascarenhas-Melo F, et al. New markers of early cardiovascular risk in multiple sclerosis patients: Oxidized-LDL correlates with clinical staging. *Disease Markers* 2013; 34(5):341-8.
- Pascot A, Lemieux I, Prud'homme D, et al. Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity. *Journal of Lipid Research* 2001; 42(12):2007-14.
- Pedersen TR, Faergeman O, Kastelein JJ, et al. High-dose atorvastatin vs usual-dose simvastatin for secondary prevention after myocardial infarction: the IDEAL study: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 2005; 294(19):2437-45.
- Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. High-density lipoprotein subfractions - what the clinicians need to know. *Cardiology* 2013; 124(2):116-25.
- Querton L, Buyschaert M, Hermans MP. Hypertriglyceridemia and residual dyslipidemia in statin-treated patients with diabetes at the highest risk for cardiovascular disease and achieving very-low low-density lipoprotein-cholesterol levels. *Journal of Clinical Lipidology* 2012; 6(5):434-42.
- Quijada Z, Paoli M, Zerpa Y, et al. The triglyceride/HDL-cholesterol ratio as a marker of cardiovascular risk in obese children; association with traditional and emergent risk factors. *Pediatric Diabetes* 2008; 9(5):464-71.
- Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007; 115(4):450-8.
- Schaefer JR. HDL level or HDL function as the primary target in preventive cardiology. *Herz* 2012; 37(1):51-5.
- Soran H, Hama S, Yadav R, et al. HDL functionality. *Current Opinion in Lipidology* 2012; 23(4):353-66.
- Stone NJ. Reducing residual risk in secondary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2012; 125(16):1958-60.
- Tian L, Xu Y, Fu M, et al. The impact of plasma triglyceride and apolipoproteins concentrations on high-density lipoprotein subclasses distribution. *Lipids in Health and Disease* 2011; 10:17.
- Trapé J, Morales C, Molina R, et al. Vascular endothelial growth factor serum concentrations in hypercholesterolemic patients. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2006; 66(3):261-7.
- Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, et al. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 208(1):3-9.
- Vanuzzo D. The epidemiological concept of residual risk. *Internal and Emergency Medicine* 2011; 6(1):45-51.
- Wang Z, Nakayama T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. *Mediators of Inflammation* 2010; 2010:535918.
- Watanabe H, Söderlund S, Soro-Paavonen A, et al. Decreased high-density lipoprotein (HDL) particle size, pre β -, and large HDL subspecies concentration in Finnish low-HDL families: relationship with intima-media thickness. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2006; 26(4):897-902.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97(18):1837-47.

Wright RS. Recent clinical trials evaluating benefit of drug therapy for modification of HDL cholesterol. *Current Opinion in Cardiology* 2013; 28(4):389-98.

Yan BY, Fu MD, Yang YY, et al. The interrelationships between serum triglyceride, total cholesterol and HDL subpopulations. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2004; 35(3):327-9.

Zhao LJ, Zhao D, Liu J, et al. Association between serum uric acid and triglyceride in a Chinese community. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2005; 44(9):664-7.

Tabela 7.2.1 – Dados demográficos e antropométricos das populações em estudo

Parâmetros	1 – Efeitos dos níveis dos TGs (normais vs altos) em condições/populações de [c-HDL] normais e baixas				2 – Efeitos da [c-HDL] (normal vs baixa) em condições de [TGs] normais e altas		3 – Efeitos das variações simultâneas das [c-HDL] e das [TGs]			
	[c-HDL] Normal (n=119)		[c-HDL] Baixa (n=50)		[TGs] Normais P (A vs C)	[TGs] Altas P (B vs D)	P A vs D	P B vs C		
	[TGs] Normais População A	[TGs] Altas (n = 36) População B	P A vs B	[TGs] Normais (n = 17) População C	[TGs] Altas (n = 33) População D	P C vs D	0,508	0,449	0,873	
Idade (anos)	60,12 ± 1,06	58,69 ± 1,78	0,491	61,88 ± 2,76	60,42 ± 1,36	0,640	0,508	0,449	0,873	0,324
IMC (Kg/m²)	28,52 ± 0,52	30,73 ± 0,77	0,020	28,27 ± 0,85	30,69 ± 0,81	0,046	0,839	0,972	0,027	0,048
PA (cm)	102,16 ± 1,60	106,61 ± 1,75	0,049	97,71 ± 2,78	105,42 ± 2,74	0,045	0,228	0,707	0,306	0,007
PAS (mmHg)	140,64 ± 2,68	139,18 ± 3,10	0,748	136,12 ± 5,83	134,33 ± 3,58	0,785	0,485	0,259	0,191	0,939
PAD (mmHg)	77,85 ± 1,42	78,40 ± 2,19	0,830	74,82 ± 3,62	75,67 ± 2,27	0,838	0,392	0,389	0,414	0,535
Glicemia (mmol/L)	7,88 ± 0,41	8,92 ± 0,64	0,096	7,62 ± 0,80	9,94 ± 0,76	0,064	0,759	0,404	0,015	0,084
HbA1c (%)	7,90 ± 0,24	8,61 ± 0,47	0,143	8,42 ± 0,75	9,75 ± 0,44	0,126	0,431	0,082	0,000	0,833

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. O teste-T para amostras independentes e o teste de Mann-Whitney foram usados para amostras com uma distribuição normalizada e não normalizada, respectivamente. IMC, índice de massa corporal; HbA1c, hemoglobina glicosilada; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PA, perímetro abdominal.

Tabela 7.2.2 – Perfil lipídico das populações em estudo

Parâmetros	1 – Efeitos dos níveis dos TGS (normais vs altos) em condições/populações de [c-HDL] normais e baixas						2 – Efeitos da [c-HDL] (normal vs baixa) em condições de [TGS] normais e altas		3 – Efeitos das variações simultâneas das [c-HDL] e das [TGS]	
	[c-HDL] Normal (n=119)			[c-HDL] Baixa (n=50)			[TGS] Normais P (A vs C)	[TGS] Altas P (B vs D)	P A vs D	P B vs C
	[TGS] Normais (n = 83) População A	[TGS] Altas (n = 36) População B	P A vs B	[TGS] Normais (n = 17) População C	[TGS] Altas (n = 33) População D	P C vs D				
c-Total (mmol/L)	4,60 ± 0,10	5,54 ± 0,20	0,000	4,48 ± 0,19	5,45 ± 0,20	0,004	0,599	0,768	0,000	0,002
TGS (mmol/L)	1,06 ± 0,03	2,53 ± 0,13	0,000	1,23 ± 0,07	3,23 ± 0,19	0,000	0,049	0,006	0,000	0,000
c-LDL (mmol/L)	2,61 ± 0,09	3,02 ± 0,19	0,049	2,89 ± 0,18	3,09 ± 0,20	0,517	0,176	0,831	0,029	0,937
LDL-ox (U/L)	33,65 ± 1,40	40,00 ± 2,43	0,018	38,55 ± 2,77	40,83 ± 3,01	0,825	0,148	0,830	0,016	0,728
LDL-ox/c-LDL	12,85 ± 0,39	13,73 ± 0,68	0,229	13,34 ± 1,02	14,33 ± 0,84	0,476	0,616	0,572	0,153	0,655
c-HDL (mmol/L)	1,50 ± 0,03	1,42 ± 0,04	0,229	1,04 ± 0,04	1,00 ± 0,03	0,385	0,000	0,000	0,000	0,000
HDL grandes (%)	37,54 ± 1,25	29,41 ± 1,83	0,000	26,10 ± 2,38	28,16 ± 2,06	0,541	0,000	0,646	0,000	0,295
HDL interméd (%)	44,83 ± 0,72	45,74 ± 0,97	0,474	48,95 ± 1,36	47,42 ± 1,34	0,667	0,017	0,311	0,071	0,064
HDL pequenas (%)	17,62 ± 0,72	24,84 ± 1,57	0,000	24,92 ± 2,99	24,32 ± 2,06	0,937	0,005	0,991	0,000	0,927
c-nHDL (mmol/L)	3,10 ± 0,09	4,12 ± 0,21	0,000	3,44 ± 0,18	4,45 ± 0,19	0,002	0,111	0,242	0,000	0,047
c-Total/c-HDL	3,17 ± 0,08	4,03 ± 0,19	0,000	4,40 ± 0,25	5,56 ± 0,23	0,002	0,000	0,000	0,000	0,194
c-LDL/c-HDL	1,82 ± 0,08	2,22 ± 0,16	0,037	2,84 ± 0,23	3,15 ± 0,23	0,539	0,000	0,001	0,000	0,032
TGS/c-HDL (mmol/L)	0,75 ± 0,03	1,85 ± 0,12	0,000	1,20 ± 0,09	3,38 ± 0,25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
PON1 (U/mL/min)	487,23 ± 16,04	509,12 ± 37,36	0,593	523,43 ± 64,79	503,52 ± 39,36	0,778	0,776	0,918	0,902	0,810

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. O teste-T para amostras independentes e o teste de Mann-Whitney foram usados para amostras com uma distribuição normalizada e não normalizada, respectivamente. c-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade; c-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade; LDL-ox, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas; TGS, triglicédeos; c-Total, colesterol total; PON1, paraoxonase 1.

Tabela 7.2.3 – Marcadores de inflamação, angiogénese e lesão endotelial nas populações em estudo

Parâmetros	1 – Efeitos dos níveis dos TGs (normais vs altos) em condições/populações de [c-HDL] normais e baixas				2 – Efeitos da [c-HDL] (normal vs baixa) em condições de [TGs] normais e altas			3 – Efeitos das variações simultâneas das [c-HDL] e das [TGs]	
	[c-HDL] Normal (n=119)		[c-HDL] Baixa (n=50)		[TGs] Normais (n = 17)	[TGs] Altas (n = 33)	[TGs] Altas P (B vs D)	P A vs D	P B vs C
	[TGs] Normais População A	[TGs] Altas População B	[TGs] Normais População C	[TGs] Altas População D	P C vs D	[TGs] Normais P (A vs C)			
PCRhs (µg/mL)	0,42 ± 0,09	0,35 ± 0,08	0,59 ± 0,16	0,60 ± 0,12	0,981	0,206	0,237	0,131	0,327
TNF-α (pg/mL)	3,21 ± 0,36	2,96 ± 0,39	2,83 ± 0,43	3,50 ± 0,55	0,758	0,914	0,552	0,573	0,858
ICAM-1 (ng/mL)	580,98 ± 32,51	553,40 ± 61,34	536,10 ± 55,09	426,54 ± 26,89	0,064	0,525	0,215	0,001	0,975
Adiponectina (µg/mL)	9,48 ± 0,87	7,67 ± 0,93	10,55 ± 1,96	5,22 ± 0,66	0,010	0,697	0,110	0,000	0,201
Ác. úrico (mmol/L)	0,50 ± 0,05	0,66 ± 0,08	0,38 ± 0,08	0,65 ± 0,10	0,023	0,104	0,616	0,144	0,005
VEGF (pg/mL)	376,48 ± 30,81	461,24 ± 63,74	468,45 ± 61,39	546,34 ± 67,86	0,759	0,113	0,302	0,017	0,564

Os resultados estão apresentados em média ± e.p.m. O teste-T para amostras independentes e o teste de Mann-Whitney foram usados para amostras com uma distribuição normalizada e não normalizada, respectivamente. PCRhs, proteína C reactiva de alta sensibilidade; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; TNF-α, factor de necrose tumoral alfa; VEGF, factor de crescimento vascular endotelial; Ác. úrico, ácido úrico.

Capítulo 8

Comentários finais e conclusões

8.1 – Comentários finais

O estudo de *Framingham* foi o primeiro a sugerir que os níveis elevados de c-HDL influenciam positivamente uma diminuição da mortalidade por doença cardiovascular (Gordon e col., 1977); desde então, outros estudos confirmaram estes dados. Actualmente, um tratamento bem orientado com estatinas consegue alcançar uma redução do risco de mortalidade cardiovascular de cerca de 25-35% (Boden e col., 2011; Brooks e col., 2010; Davidson e Rosenson, 2009). Considerando-se que a doença cardiovascular pode ser responsabilizada por cerca de 50% de todas as mortes, uma redução do risco de 25-35% não pode ser considerada suficiente e satisfatória (Greenow e col., 2005).

Aumentar o c-HDL foi visto como uma forma viável e promissora para reduzir ainda mais o risco de mortalidade cardiovascular. No entanto, a modulação do c-HDL parece ser uma tarefa bem mais complexa (Asztalos e col., 2006; Freund, e col., 1993; Gordon e col., 1977, 1989; Kannel e McGee, 1985; Wilson e col., 1988). Com efeito, dos fármacos antilipidémicos actualmente disponíveis, apenas a niacina mostrou capacidade para aumentar de forma substancial (em cerca de 25%) os níveis de c-HDL (Carlson, 2005; Brooks e col., 2010).

Mudanças na dieta e no estilo de vida, bem como a terapêutica com estatinas, podem ajudar a elevar os níveis de c-HDL em cerca de 5-10% (Downs e col., 1998; Streja e col., 2002; Varady e Jones, 2005; Nissen e col., 2006; Hausenloy e Yellon, 2009). O tratamento com fibratos consegue elevar o c-HDL em 10-15% (Frick e col., 1987; Goldenberg e col., 2008); contudo, estudos que visavam avaliar o efeito de fibratos na mortalidade cardiovascular apresentaram resultados decepcionantes (Keech e col., 2005; Abourbih e col., 2009; Ginsberg e col., 2010; Tenenbaum e Fisman, 2010).

A niacina parece ser negligenciada no tratamento da dislipidemia, sobretudo porque frequentemente provoca rubor. Este efeito colateral apesar de quase inofensivo é certamente incomodativo para os doentes. No entanto, enquanto estudos anteriores indicaram que a niacina teve um efeito positivo sobre a mortalidade cardiovascular, os resultados publicados recentemente do *AIM-HIGH* foram inicialmente decepcionantes. Este estudo não mostrava qualquer benefício da combinação de niacina com estatina. Contudo, tal como descrito por Nicholls (2012), os resultados deste ensaio deviam ser

interpretados com cautela. O veredicto sobre a niacina ainda continuava em aberto, nomeadamente até que fossem devidamente analisados os resultados do estudo *HPS2-PROSPERAR*, que teve que ser abandonado devido aos efeitos secundários e por não ter mostrado qualquer efeito benéfico na redução dos eventos cardiovasculares.

Por outro lado, tem havido cada vez mais indicações de que a qualidade das HDL, e não tanto o conteúdo total, é um parâmetro importante e a ter em conta. As partículas de HDL são em grande parte responsáveis pelo transporte reverso do colesterol, o mecanismo que pode prevenir ou retardar a formação da placa de ateroma. As partículas de HDL retiram o colesterol das células espumosas e, assim, reduzem o risco da sua oxidação e da formação de mais células espumosas. Desta forma, o círculo vicioso pode ser quebrado e a inflamação da parede arterial ser interrompida. As partículas de HDL também são capazes de melhorar/normalizar um conjunto de funções importantes e com relação com o desenvolvimento de doença cardiovascular aterogénica. Com efeito, têm um impacto positivo nas células endoteliais, por melhoria da vasodilatação, nomeadamente por indução da libertação de NO, inibição da inflamação, quimiotaxia e trombose. Assim, para influenciar a aterosclerose uma função adequada das partículas de HDL é de extrema importância (Tall, 2008; Singh e col., 2010). Estudos anteriores mostraram que num estado de inflamação crónica (como é o caso da aterosclerose, da doença renal crónica, da diabetes e de outras doenças inflamatórias crónicas), o transporte reverso do colesterol é fortemente reduzido. Para além disso, as partículas de HDL não agem como agentes antioxidantes; em vez disso, apoiam a oxidação do colesterol, alimentando o processo inflamatório, e outros efeitos pleiotrópicos das HDL são igualmente dificultados (Natarajan e col., 2010; Saemann e col., 2010).

Compostos mais recentes, como o torcetrapibe, um inibidor da CETP (*ILLUSTRATE*, *ILLUMINATE*, *RADIANCE*) e fármacos mais antigos, como a niacina (*AIM-HIGH*), conseguem promover um aumento dos níveis de c-HDL de forma substancial, que pode variar de 25 a 60% (Barter, 2009). Ainda assim, nenhuma mudança na mortalidade por doença cardiovascular foi detectada. Adicionalmente, o tamanho da placa de ateroma não foi afectado, o que poderia apoiar a noção de que o aumento dos níveis de c-HDL poderia não ser tão benéfico como se pensava. Uma meta-análise (Singh e col., 2010), estudando a associação entre a alteração nos níveis de c-HDL e a morbilidade e

mortalidade por DAC, não detectou uma redução significativa do risco de DAC com a elevação dos níveis de c-HDL, enquanto a redução dos níveis de c-LDL teve um efeito benéfico significativo (Briel e col., 2009). A função correcta das partículas de HDL parece ser um factor crucial na expressão dos efeitos favoráveis que lhe são apontados. Apoiando essa hipótese está o facto de que as pessoas que expressam a apoA-I Milano têm baixos níveis de c-HDL, e não estão em maior risco de sofrer de doenças cardiovasculares do que a população normal. Infusões de apoA-I Milano ajudaram muito mais eficazmente a reduzir a carga de ateroma pela via do transporte reverso do colesterol (Joy e Hegele, 2008; Tall, 2008; Vergeer e col., 2010).

Estes dados poderão estar relacionados com alguns aspectos menos abordados e devem merecer maior reflexão. Com efeito, os níveis de c-HDL que são obtidos por ultracentrifugação determinam a quantidade de colesterol no HDL por 100 mL de plasma, não dando nenhuma ideia sobre a composição das partículas de HDL nem da sua funcionalidade (deGoma e col., 2008). As HDL diferem nas suas formas de acção (por exemplo, grandes partículas ricas em colesterol activam o transporte reverso do colesterol via SR-B1, enquanto as partículas pre- β -HDL menores usam o ABCA1). A medição dos níveis de c-HDL não chega para fornecer informações suficientes sobre este sistema altamente complexo e dinâmico. Ensaio novos, económicos e facilmente aplicáveis são necessários para avaliar a capacidade funcional das partículas de HDL em pacientes com doenças cardiovasculares para melhor compreender a fisiopatologia da aterosclerose e serem capazes de identificar as necessidades terapêuticas específicas para cada paciente (deGoma e col., 2008; Vergeer e col., 2010).

Mas a verdade é que a razão pela qual tanta ênfase tem sido colocada no nível sérico de c-HDL como um preditor da saúde vascular é porque, teoricamente, este representa o transporte reverso do colesterol (TRC), o sistema responsável pela remoção dos excessos de colesterol celulares a partir dos locais de acumulação nos tecidos periféricos (Assmann e col., 1993). O espaço subendotelial da artéria de calibre médio é o mais importante neste contexto, pois a acumulação de células ricas em colesterol promove a formação de ateromas e o verdadeiro alvo da terapêutica é activar a saída de colesterol destes locais. Dado que a função essencial das HDL ocorre no espaço extravascular, e não no compartimento vascular, é provável que avaliar os níveis séricos

de c-HDL tenha um significado limitado para prever a funcionalidade em termos de TRC no tecido alvo. Para além disso, as HDL influenciam o processo aterogénico não só através da extracção de colesterol, mas também através de propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, entre outras (Petraki e col., 2009).

No entanto, o que nós testamos no plasma é quase exclusivamente a quantidade de colesterol que as HDL recolhem a partir de diferentes tecidos ou da parede arterial. Se quantidades inadequadas de HDL penetrarem na placa ou se a carga de lípidos oxidados na placa destabilizarem a função das HDL, é óbvio que os níveis séricos de c-HDL deixam de se poder relacionar da mesma forma com a previsão do risco para a doença cardiovascular. Este novo conhecimento sobre HDL disfuncional tem sido chamado de “um paradoxo” porque a funcionalidade não está directamente ligada a mudanças nas concentrações plasmáticas de c-HDL (Ansell e col., 2007). No entanto, parece não haver nada de paradoxal nisto. O TRC é necessário para remover o excesso de colesterol das células periféricas em todos os tecidos, uma função biológica essencial. Os níveis séricos de HDL representam o equilíbrio entre a produção de partículas de HDL maduras na circulação e a perda de carga lipídica através dos receptores das HDL presentes essencialmente nos hepatócitos (receptores *scavenger* tipo BI [SR-BI]), que medeiam a captação selectiva de colesterol livre e esterificado, e através da transferência mediada por CETP para outras lipoproteínas (Acton e col., 1996; McPherson e Marcel, 1991). A perda de carga lipídica é um evento desejável porque conduz à descarga de colesterol e fosfolípidos oxidados no fígado e contribui para o renascimento das partículas de HDL para um novo ciclo de aquisição de colesterol. Portanto, um alto nível de c-HDL pode significar aumento da produção de HDL maduras no compartimento do plasma (uma coisa boa) ou redução da perda de carga lipídica (que não é uma coisa boa). Por outro lado, um baixo nível de c-HDL pode ser sinal de aumento da perda de carga lipídica (uma coisa boa) ou uma redução da recolha de colesterol periférico (que não é uma coisa boa).

O conhecimento existente sobre as funções desempenhadas pelas HDL e seu metabolismo não foi suficiente para que os fármacos testados até agora fossem capazes de oferecer uma estratégia útil e eficiente para a redução de eventos cardiovasculares. Não obstante o facto de as terapêuticas destinadas a aumentar o c-HDL ainda não terem cumprido as expectativas iniciais, fármacos que venham a ser capazes de modular

positivamente as HDL ainda devem ser vistos como uma esperança viável para aqueles doentes que permanecem com um alto risco cardiovascular na presença de regimes hipolipidemiantes. Vários novos medicamentos, que têm como alvo as actividades ateroprotectoras das HDL, estão actualmente sob investigação. A avaliação completa dos efeitos desses fármacos sobre o número de partículas de HDL, composição e função, pode ser fundamental para confirmar a importância das HDL como um verdadeiro alvo terapêutico na doença aterosclerótica. Para além disso, efeitos profundos das HDL sobre o sistema imunitário foram recentemente descritos, indicando um papel imunorregulador essencial desta partícula complexa, que pode entrar em desequilíbrio em vários estados de doença associados com o risco de aterosclerose excessiva. Assim, mais estudos sobre os efeitos complexos das HDL, também a este nível, são necessários para lidar com futuras opções terapêuticas que sejam capazes de aumentar a quantidade, mas sobretudo melhorar a qualidade, das HDL.

Apesar da impressionante redução do risco de DCC que foi alcançada por diminuição do c-LDL induzido pelas estatinas, o risco residual permanece inaceitavelmente elevado. Há claramente uma necessidade de ir além do c-LDL e das estatinas. Esta necessidade torna-se ainda mais premente quanto a epidemia da diabetes tipo 2 e da síndrome metabólica continua a crescer. As provas são esmagadoras de que a modulação das HDL deve ser um dos novos alvos; alguns estudos já estão em curso, com agentes mais eficazes que possam tornar-se disponíveis num futuro não muito distante. Assim, poder-se-á dizer que chegou o momento de intervir para elevar o nível, mas principalmente a funcionalidade, das HDL em doentes de alto risco, com a mesma agressividade que actualmente é aplicada para reduzir o c-LDL. Para além disso, também é hoje sabido que se torna cada vez mais necessário perceber os mecanismos envolvidos na evolução da doença aterosclerótica, assumindo-a como uma doença multifactorial, para assim identificar melhores biomarcadores que possam ser utilizados para auxílio da prática clínica. Foi neste contexto que este trabalho foi pensado e projectado. Como tal, os principais objectivos do trabalho foram o de compreender o envolvimento das subpopulações de HDL na determinação do perfil cardiometabólico e a sua associação/correlação com outros mediadores (marcadores) do fenómeno aterogénico em populações com factores de risco cardiovascular.

Ainda antes de apreciar populações de doentes com uma clara conotação com a doença cardiovascular ou às quais é atribuído um risco cardiovascular aumentado, propusemo-nos fazer uma análise em indivíduos controlo, sem doença cardiovascular diagnosticada. Partindo do princípio de que existem potenciais diferenças de género e ainda um perfil de risco alterado em mulheres antes versus após a menopausa, que podem ter uma associação com as HDL, quisemos analisar marcadores de perfil cardiometabólico, tradicionais e não-tradicionais, tendo como enfoque as subpopulações de HDL.

Os nossos resultados sugerem que os homens apresentam um perfil cardiometabólico menos favorável quando comparados com o das mulheres, que fica principalmente patente ao analisar marcadores não-tradicionais, que podem resultar de ligeiras, mas concomitantes, variações de diversos factores (apesar dos valores estarem dentro dos recomendados na clínica normal), incluindo valores mais elevados de c-Total, c-LDL, TGs e glicemia e mais baixos de c-HDL, juntamente com um elevado IMC. A acumulação destes factores parece promover um perfil oxidativo e inflamatório, com um conteúdo superior de LDL-ox, de TNF- α e de HDL pequenas e inferior de HDL grandes e de adiponectina. Este conjunto de alterações pró-cardiometabólicas (mesmo que de ligeira intensidade), juntamente com o aumento do ácido úrico e da pressão arterial, pode representar um maior risco cardiovascular, quando comparado com o das mulheres, que parecem estar protegidas, nomeadamente antes da menopausa. Do mesmo modo, após a menopausa, as mulheres apresentam um aumento do IMC, do perímetro abdominal e da glicemia, o que pode ser responsável pelas modificações do perfil cardiometabólico. De facto, as mulheres na pós-menopausa, para além de apresentarem valores superiores de c-LDL e ligeiramente inferiores de c-HDL (sem alterações dos níveis de c-Total e de TGs), evidenciaram um perfil mais oxidativo, angiogénico e pró-inflamatório, com conteúdos superiores de LDL-ox, VEGF e PCRhs e percentagens inferiores de HDL grandes, sugerindo, e uma vez mais, que um conjunto de pequenas variações dos marcadores tradicionais (ainda que dentro dos valores de referência da clínica) pode promover um perfil cardiometabólico mais nefasto. Assim, deve ser dada maior atenção ao perfil pró-aterogénico das mulheres em pós-menopausa, eventualmente intervindo terapêuticamente de forma mais precoce para prevenir o desenvolvimento prematuro de

doenças cardiovasculares. Finalmente, este estudo sugere que alguns dos marcadores clássicos do perfil cardiovascular (nomeadamente a ficha lipídica) muitas vezes podem não traduzir o verdadeiro risco, por apresentarem valores normais ou apenas ligeiramente alterados, mas dentro da faixa clínica normal, recomendando que os dados bioquímicos de rotina poderão ser mais esclarecedores com a inclusão de outros marcadores mais confiáveis e específicos, que transmitam informações adicionais do risco cardiometabólico nesta população específica.

Nesta primeira parte do trabalho sobressaiu a ideia de que o maior conteúdo em c-HDL apresentado pelas mulheres relativamente aos homens é sobretudo composto por HDL de melhor qualidade (subpopulações de HDL grandes), e que se acompanha de quantidade reduzida de LDL oxidadas e de TNF- α e aumentada de adiponectina, que são consonantes com uma protecção antioxidante e anti-inflamatória das HDL funcionalmente benéficas. Contudo, esse efeito protector é perdido após a menopausa, com redução do c-HDL e das subpopulações de HDL grandes, com aumento de LDL, incluindo LDL oxidadas, e de PCR $_{hs}$, sugestivo de um aumento do carácter oxidativo e inflamatório que pode estar relacionado com a existência de HDL disfuncional, eventualmente influenciado por um perfil de obesidade.

Na fase seguinte do trabalho, quisemos verificar se idênticos achados poderiam ser encontrados numa população de doentes diabéticos tipo 2, os quais se sabe estarem particularmente sujeitos ao desenvolvimento de doença cardiovascular aterogénica. Assim, pretendeu-se estudar a influência do género e da menopausa no perfil cardiometabólico de uma população diabética, usando marcadores tradicionais mas também novos marcadores não-tradicionais relacionados com o perfil lipídico, oxidativo e inflamatório. Os resultados mostraram que a diabetes anula o efeito protector conferido pelo sexo feminino em mulheres não diabéticas comparativamente aos homens; para além disso, as mulheres diabéticas em pós-menopausa apresentam um perfil cardiometabólico mais nefasto: aterogénico, pró-inflamatório e pró-angiogénico. Uma vez mais, alguns marcadores "não-clássicos" parecem ser importantes para expôr estas diferenças, incluindo as subpopulações de HDL. Mais ainda, sobressaem diferenças em alguns mediadores de inflamação e angiogénese, nomeadamente TNF- α e VEGF, quando se compara as diferenças entre géneros numa população diabética, e parâmetros de

obesidade (perímetro abdominal e IMC), TGs e TNF- α quando se analisam as diferenças entre as mulheres pré e pós-menopausa. Também neste estudo, os resultados sugerem que a qualidade das HDL, avaliada pela percentagem em subpopulações, poderá ter um papel importante na determinação do perfil de risco desta população, em detrimento do conteúdo total de c-HDL. Assim, intervir mais precocemente e de forma direccionada não apenas para a obesidade, mas também para as partículas lipídicas aterogénicas e mediadores inflamatórios pode ser uma estratégia crucial nas mulheres diabéticas após a menopausa, com o objectivo de evitar o desenvolvimento das sérias complicações cardiovasculares da diabetes.

No estudo seguinte, pretendemos avaliar uma população de doentes jovens adultos com esclerose múltipla, aos quais tem sido associado um risco cardiovascular precoce, mas cuja etiologia permanece por esclarecer. A esclerose múltipla é uma doença inflamatória e desmielinizante do SNC que tem sido associada a um aumento da pressão arterial e taquicardia (Sanya e col., 2005), distúrbios ventriculares (Olindo e col., 2002) e desequilíbrios entre vasoconstritores e vasodilatadores, tais como prostaglandinas e NO (Kanabrocki e col., 2004; Mirshafiey e col., 2010); ao mesmo tempo, a doença cardiovascular aterogénica é uma doença multifactorial, na qual a componente inflamatória parece ter um papel muito importante. Assim, julgámos interessante poder analisar as influências atrás descritas nesta população jovem e, de certa forma, verificar se a componente relacionada com a degradação cardiovascular aterogénica associada à idade e a hábitos de estilo de vida pouco saudáveis, que está muito implicada na aterosclerose em doentes diabéticos, também tem algum peso numa doença de jovens adultos. Assim, foi nosso objectivo caracterizar esta população e identificar os marcadores (clássicos e não clássicos) potencialmente mais relevantes na determinação do perfil de risco e estudar a sua possível correlação com a atividade clínica da doença.

Os dados obtidos sugerem que os doentes com EM podem ter um perfil de risco cardiometabólico mais nefasto de forma prematura. Esta indicação é sobretudo apoiada nos valores aumentados de LDL-ox e na deterioração da funcionalidade das HDL, com aumento da percentagem das subpopulações de HDL menos ateroprotectoras (pequenas) e diminuição da percentagem das HDL mais ateroprotectoras (HDL grandes), não obstante valores idênticos de concentração sérica de c-HDL total. Este perfil está mascarado num quadro lipídico clássico aparentemente normal, excepto hipertrigliceridemia, com teor de c-Total idêntico ao do grupo controlo e de c-LDL mesmo

mais reduzido, ainda que dentro do intervalo considerado normal. Adicionalmente, foi verificada uma correlação de alguns destes marcadores lipídicos, sobretudo o LDL oxidado, com o estadió clínico da doença, avaliado pela pontuação na EDSS, o que levanta a possibilidade destes biomarcadores estarem envolvidos no processo de progressão da doença. Ao contrário dos doentes diabéticos, não se poderá aqui atribuir responsabilidades particulares a outros factores de risco importantes para a doença CV típica, já que os doentes são jovens adultos, não são obesos, não apresentam hipertensão nem hiperglicemia/diabetes. Ou seja, a disfuncionalidade das HDL e o seu impacto na oxidação das LDL, e eventualmente em outras funções ateroprotectoras das HDL, poderão ser, por si só, aspectos importantes, quiçá determinantes, para o risco CV aumentado.

Tal como nas populações anteriores, também neste estudo não se constatou existir uma influência especial em termos de actividade da paraoxonase 1. Esta enzima tem sido associada às funções antioxidantes das HDL, mas não parece poder ser, por si só, indicadora da qualidade/funcionalidade das HDL nas populações aqui estudadas. Contudo, não se deverá excluir por completo neste momento, e com os dados analisados, o seu contributo para a (dis)funcionalidade das HDL nestas populações, já que outros aspectos podem estar em causa tendo em conta a complexidade desta enzima. Com efeito, para além da actividade paraoxonase, a mais descrita e medida, possui também actividades arilesterase e lactonase que podem ter um papel antioxidante e ateroprotector, e que não foram avaliadas nestas populações. Estas actividades da enzima podem ser moduladas por muitos factores externos, incluindo dieta, exercício físico, tabaco, fármacos, entre outros (Schrader e Rimbach, 2011), que não estiveram em análise neste trabalho. Adicionalmente, estão descritos alguns polimorfismos da PON que alguns autores associam com a determinação da actividade enzimática da enzima (Ribeiro e col., 2012). Nas populações por nós avaliadas não foi feita uma análise genotípica, até porque a mesma seria vazia de significado dado a pequena amostragem para um estudo desta natureza. Por fim, alguns autores têm descrito a existência de anticorpos anti-HDL (e anti-paraoxonase) que podem condicionar os efeitos antioxidantes e ateroprotectores das HDL (Batuca e col., 2007; Batuca e col., 2009), contribuição essa que também não esteve no cerne deste trabalho, mas que não poderá ser totalmente afastada, sobretudo

tendo em conta o carácter imunológico da esclerose múltipla. Trabalhos futuros deverão dar corpo a estas possíveis implicações para melhorar o conhecimento nestas áreas específicas da biologia das HDL, que poderão/deverão incluir também outras componentes das HDL, tais como as suas principais apolipoproteínas.

Finalmente, o nosso trabalho debruçou-se sobre o estudo de doentes dislipidémicos, com factores de risco cardiovascular mas conteúdos normalizados de c-LDL (actualmente designados de doentes com risco CV residual). Nestes doentes foi estudada a influência de baixos níveis de c-HDL e/ou elevados de TGs no perfil cardiometabólico, utilizando marcadores tradicionais e não-tradicionais, incluindo as subpopulações de HDL, as LDL oxidadas e mediadores inflamatórios e de angiogénese. O impacto dos baixos níveis de c-HDL é traduzido por alguns parâmetros clássicos, mas principalmente através de marcadores não-clássicos. Na primeira parte do trabalho foram comparados doentes dislipidémicos com controlos de idade e género comparáveis, com níveis normais versus baixos de c-HDL. Na população controlo, os indivíduos com reduzidos valores de c-HDL apresentam algumas alterações comparativamente aos que tinham valores normais de c-HDL, incluindo um aumento da pressão arterial (PAS e PAD), hipertrigliceridemia e diminuição da actividade da PON1 e dos níveis de adiponectina. No entanto, quando se analisa a população de doentes, o subgrupo com baixos níveis de c-HDL apresenta um perfil de risco cardiometabólico substancialmente mais nefasto quando comparado com o subgrupo de doentes com c-HDL normal, sendo essas diferenças notoriamente mais acentuadas do que as encontradas nos indivíduos controlo. O impacto dos baixos níveis de c-HDL foi expresso por alguns parâmetros clássicos, mas principalmente através de marcadores não-clássicos. Com efeito, os doentes com baixas concentrações de c-HDL apresentam conteúdos superiores de HbA1c, TGs, c-nHDL, LDL-ox, PCRhs, VEGF e HDL pequenas, bem como menores valores de adiponectina e percentagem inferior de HDL grandes. Assim, a redução de c-HDL associa-se a uma redução da sua qualidade/funcionalidade, com distorção da proporção entre grandes (mais ateroprotectoras) e pequenas (menos ateroprotectoras), com impacto em marcadores de oxidação lipídica (LDL-ox), inflamação (PCRhs e adiponectina) e angiogénese (VEGF).

O conceito de risco cardiovascular residual, que foi definido como o "risco residual de eventos vasculares ou progressão de lesão vascular que persistem em doentes tratados com as terapêuticas actualmente recomendadas com base nas melhores

evidências científicas, incluindo o risco associado aos factores de risco estabelecidos, como a dislipidemia, a hiperglicemia, a inflamação e de estilos de vida menos saudáveis, ou risco relacionado com factores emergentes", tem vindo a concentrar cada vez mais atenção (Vanuzzo, 2011; Hermans e Fruchart, 2010). Com efeito, um número significativo de eventos cardiovasculares ocorre em doentes sob terapêutica com estatinas e cujos níveis de c-LDL foram agressivamente reduzidos (Cannon e col., 2004; LaRosa e col., 2005; Pedersen e col., 2005). Como resultado, tem havido maior atenção para os níveis elevados de TGs e reduzidos de c-HDL e das suas contribuições significativas para o risco cardiovascular residual, mesmo quando os níveis de c-LDL estão bem controlados (Cziraky e col., 2008; Alagona, 2009). Os doentes com hipertrigliceridemia estão em risco particularmente elevado de DCV, nomeadamente quando coexistem com baixos níveis de c-HDL (Genest e col., 1992; Ginsberg, 2002). Para além disso, estes estudos reforçam a ideia de que os factores de risco clássicos explicam apenas cerca de 50-60% das doenças cardiovasculares (Wilson e col., 1998); assim, tem havido um crescente interesse em identificar novos biomarcadores que possam melhorar a previsão global do risco de doenças cardiovasculares (Hackam e Anand, 2003; Assmann e col., 2005).

Neste contexto, e uma vez que alguns dos dados anteriores mostravam que a hipertrigliceridemia acompanhava e se correlacionava frequentemente com as alterações de HDL e de outros marcadores, pretendemos avaliar a influência de níveis baixos de c-HDL e/ou elevados de TGs sobre o perfil cardiometabólico de doentes dislipidémicos com factores de risco cardiovascular, mas apresentando valores normalizados de c-LDL. À semelhança dos ensaios anteriores, foram analisados tanto marcadores clássicos como novos não-tradicionais, incluindo as subpopulações de HDL, as LDL oxidadas e mediadores inflamatórios e de angiogénese. Os resultados obtidos sugerem que níveis baixos de c-HDL e/ou altos de TGs estão associados a um perfil cardiometabólico mais nefasto. Esta condição ocorre frequentemente em doentes medicados com fármacos antidislipidémicos, e nos quais as concentrações de c-LDL foram agressivamente reduzidas e normalizadas. O nosso estudo sugere que o risco cardiovascular residual é melhor identificado por biomarcadores não-tradicionais (ou emergentes) de carácter lipídico, incluindo as subpopulações de HDL, e as LDL oxidadas, assim como marcadores

de inflamação, angiogénese e disfunção endotelial, tais como a adiponectina, o ácido úrico e o VEGF.

Apesar da terminologia usada para definir o risco associado a estes doentes (“risco cardiovascular residual”), estes doentes, não raras vezes, são os que experimentam eventos fatais e não-fatais cardio e cerebrovasculares. Assim, medidas terapêuticas capazes de melhorar os níveis de c-HDL e a sua qualidade/funcionalidade e de reduzir a concentração de TGs, devem ser implementadas. Uma vez que o impacto do arsenal terapêutico actual é limitado sobre os níveis de c-HDL, nomeadamente a medicação mais usadas, as estatinas, medidas não farmacológicas (incluindo o exercício físico regular e dietas com baixo teor de gordura e açúcar) devem merecer mais atenção. De igual forma, novos agentes que possam comprovar maior eficácia na redução da concentração dos TGs e melhorar a qualidade das HDL e os seus efeitos benéficos, incluindo a redução da oxidação das LDL, bem como de mediadores inflamatórios, serão de elevada utilidade. Os últimos ensaios clínicos com fármacos dirigidos ao aumento do c-HDL (nomeadamente os inibidores da CETP) apresentaram alguns resultados decepcionantes, nomeadamente em termos de incidência de efeitos colaterais e sobretudo de efeitos a curto e longo prazo no que diz respeito aos eventos cardiovasculares (Wright, 2013). Mais dados de grandes ensaios clínicos, destinados a avaliar o impacto sobre os eventos cardiovasculares de fármacos dirigidos a modular não apenas a concentração de HDL mas, e sobretudo, a sua qualidade/funcionalidade, são necessários para melhor elucidar esta questão. A melhoria da capacidade de intervenção terapêutica ao nível da qualidade das HDL e das suas funções ateroprotectoras poderá vir a constituir-se como um passo importante na terapêutica da dislipidemia, com previsível impacto significativo na melhoria da morbidade e mortalidade por doença cardiovascular.

8.2 – Conclusões

O nosso trabalho permitiu obter alguns achados que podem vir a ser importantes para melhorar o acompanhamento clínico de doentes que estão em risco mais elevado de complicações cardiovasculares decorrentes das suas condições fisiopatológicas. Assim, os resultados mostram claramente que:

1) A qualidade/funcionalidade das HDL é um indicador mais interessante do que o conteúdo total em c-HDL. As subpopulações grandes de HDL relacionam-se com uma maior protecção e funcionalidade, ao contrário das subpopulações pequenas de HDL que se podem considerar disfuncionais em termos de efeitos ateroprotectores.

2) As populações de doentes, e mesmo aquelas sem doença CV diagnosticada mas com um perfil cardiometabólico mais danificado (como as mulheres em pós menopausa), apresentaram uma degradação (disfuncionalidade) das HDL, traduzida pela redução da percentagem de HDL grandes e aumento de HDL pequenas, mesmo quando os conteúdos de c-HDL estavam inalterados ou dentro de valores clinicamente vistos como normais.

Este resultado foi transversal a todas as populações em estudo, o que recomenda que a determinação das subpopulações de HDL deva ser um parâmetro a adoptar na clínica substituindo-o pela “tradicional” medição do c-HDL total.

O trabalho faz ressaltar também a importância de outros biomarcadores “não-tradicionais” (ou emergentes) como indicadores do perfil cardiometabólico de populações específicas. No entanto, estes parecem ser muito mais específicos e direccionados a cada população em estudo. Sendo assim, o nosso estudo mostra que cada indivíduo deve ser abordado de forma personalizada, tendo em conta as suas características individuais, com vista à melhor apreciação do risco global que engloba factores distintos mas que cooperam para o risco para a DCV. De forma sumária, podemos concluir que:

3) Numa população sem diagnóstico prévio de DCV, os homens, e as mulheres em pós-menopausa, apresentam um perfil cardiometabólico mais nefasto, relativamente às mulheres e às mulheres em pré-menopausa, respectivamente. Estes resultados ficam mais patentes sobretudo, mas não exclusivamente, quando se analisam marcadores “não-tradicionais”: subpopulações de HDL, LDL-ox, TNF- α e adiponectina, para a

diferenciação do risco entre os géneros, e subpopulações de HDL, LDL-ox, VEGF e PCRhs, para a diferenciação entre as mulheres em pré versus pós-menopausa;

4) A diabetes tipo 2 atenua o efeito protector conferido pelo género feminino, traduzindo-se por uma degradação da qualidade das HDL, aumento de TNF- α e de VEGF; para além disso, após entrarem na menopausa as mulheres diabéticas apresentam um perfil compatível com maior risco para a DCV, uma vez mais traduzido pela perda de qualidade (disfuncionalidade) das HDL, aumento da obesidade, hipertrigliceridemia e aumento de TNF- α ;

5) Numa população com esclerose múltipla, mais jovem do que as populações tipicamente associadas a DCV, e ainda sem outros factores de risco estabelecidos, como obesidade, hipertensão, hiperglicemia/diabetes e dislipidemia, também as subpopulações de HDL, o VEGF e principalmente as LDL-ox (que se relacionam significativamente com o estadio da doença), podem ser bons biomarcadores do risco para a DCV precoce que este tipo de doentes aparenta ter;

6) Em populações consideradas dislipidémicas, ainda que sob medicação antidislipidémica apropriada e com níveis normalizados de c-LDL, a concentração reduzida de c-HDL e/ou elevada de TGs têm fortes implicações no seu perfil cardiometabólico. Também nestes, alguns marcadores “não-tradicionais” parecem ser particularmente reveladores desse risco CV residual (mas frequentemente associado a morbidade e mortalidade por DCV), incluindo-se, uma vez mais, as subpopulações de HDL, as LDL-ox, a adiponectina e o VEGF.

A confirmação dos resultados deste trabalho poderá contribuir no futuro para melhorar as estratégias de diagnóstico e as medidas terapêutica para controlo do risco cardiovascular aumentado que este tipo de populações apresenta, de forma a ter implicações positivas e significativas na morbidade e mortalidade por DCV. A inclusão na prática clínica de novos biomarcadores com maior capacidade de fornecer indicações sobre a componente cardiometabólica destes doentes, e uma abordagem direccionada para as diferentes componentes da doença, mas que tenha em conta as desigualdades e características interpessoais da população, deverão ser uma realidade, por forma a ser possível um impacto significativo na prevenção e no tratamento da DCV aterogénica, com redução da morbidade e mortalidade que lhe estão associadas.

8.3 – Referências

- Abourbih S, Filion KB, Joseph L, et al. Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: a systematic review. *Am J Med* 2009; 122(10):962.e1-8.
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271(5248):518-20.
- Andreou I, Tousoulis D, Miliou A, et al. Effects of rosuvastatin on myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure: a randomized placebo-controlled study. *Atherosclerosis* 2010; 210(1):194-8.
- Ansell BJ, Fonarow GC, Fogelman AM. The paradox of dysfunctional high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18(4):427-34.
- Assmann G, von Eckardstein A, Funke H. High density lipoproteins, reverse transport of cholesterol, and coronary artery disease. Insights from mutations. *Circulation* 1993; 87(4 Suppl):III28-34.
- Asztalos BF, Demissie S, Cupples LA, et al. LpA-I, LpA-I:A-II HDL and CHD-risk: the framingham offspring study and the veterans affairs HDL intervention trial. *Atherosclerosis* 2006; 188(1):59-67.
- Barter P. Lessons learned from the Investigation of Lipid Level Management to Understand its Impact in Atherosclerotic Events (ILLUMINATE) trial. *Am J Cardiol* 2009; 104 (10 Suppl):10E-5E.
- Batuca JR, Ames PR, Amaral M, et al. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein are affected by specific antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(1):26-31.
- Batuca JR, Ames PR, Isenberg DA, Alves JD. Antibodies toward high-density lipoprotein components inhibit paraoxonase activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1108:137-46.
- Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* 2011; 365(24):2255-67.
- Briel M, Ferreira-Gonzalez I, You JJ, et al. Association between change in high density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease morbidity and mortality: systematic review and meta-regression analysis. *BMJ* 2009; 338:b92.
- Brooks EL, Kuvin JT, Karas RH. Niacin's role in the statin era. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11(14):2291-300.
- Carlson LA. Nicotinic acid: the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review. *J Intern Med* 2005; 258(2):94-114.
- Davidson MH, Rosenson RS. Novel targets that affect high-density lipoprotein metabolism: the next frontier. *Am J Cardiol* 2009; 104(10 Suppl): 52E-7E.
- deGoma EM, deGoma RL, Rader DJ. Beyond high-density lipoprotein cholesterol levels evaluating high-density lipoprotein function as influenced by novel therapeutic approaches. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(23):2199-211.
- Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279(20):1615-22.
- Favari E, Lee M, Calabresi L, et al. Depletion of pre-beta-high density lipoprotein by human chymase impairs ATP-binding cassette transporter A1- but not scavenger receptor class B type I-mediated lipid efflux to high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2004; 279(11):9930-6.

Freund KM, Belanger AJ, D'Agostino RB, et al. The health risks of smoking. The Framingham Study: 34 years of follow-up. *Ann Epidemiol* 1993; 3(4):417-24.

Frick MH, Elo O, Haapa K, et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med* 1987; 317(20):1237-45.

Ginsberg HN, Elam MB, Lovato LC, et al. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2010; 362(17):1563-74.

Goldenberg I, Benderly M, Goldbourt U. Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4(1):131-41.

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1):8-15.

Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977; 62(5):707-14.

Greenow K, Pearce NJ, Ramji DP. The key role of apolipoprotein E in atherosclerosis. *J Mol Med* 2005; 83(5):329-42.

Hausenloy DJ, Yellon DM. Enhancing cardiovascular disease risk reduction: raising high-density lipoprotein levels. *Curr Opin Cardiol* 2009; 24(5):473-82.

Joy T, Hegele RA. Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(2):143-55.

Kannel WB, McGee DL. Epidemiology of sudden death: insights from the Framingham Study. *Cardiovasc Clin* 1985; 15(3):93-105.

Keech A, Simes RJ, Barter P, et al. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 366(9500):1849-61.

McPherson R, Marcel Y. Role of cholesteryl ester transfer protein in reverse cholesterol transport. *Clin Cardiol* 1991; 14(2 Suppl 1):131-4.

Natarajan P, Ray KK, Cannon CP. High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55(13):1283-99.

Nicholls SJ. Is niacin ineffective? Or did AIM-HIGH miss its target? *Cleve Clin J Med* 2012; 79(1):38-43.

Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006; 295(13):1556-65.

Petraki MP, Mantani PT, Tselepis AD. Recent advances on the antiatherogenic effects of HDL-derived proteins and mimetic peptides. *Curr Pharm Des* 2009; 15(27):3146-66.

Ribeiro S, do Sameiro Faria M, Mascarenhas-Melo F, et al. Main Determinants of PON1 Activity in Hemodialysis Patients. *Am J Nephrol* 2012; 36(4):317-23.

Saemann MD, Poglitsch M, Kopecky C, et al. The versatility of HDL: a crucial anti-inflammatory regulator. *Eur J Clin Invest* 2010; 40(12): 1131-43.

Schrader C, Rimbach G. Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. *Curr Med Chem* 2011; 18(36):5624-43.

Singh V, Sharma R, Kumar A, et al. Low high-density lipoprotein cholesterol: current status and future strategies for management. *Vasc Health Risk Manag* 2010; 6:979-96.

- Smith JD. Dysfunctional HDL as a diagnostic and therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010a; 30(2):151-5.
- Smith JD. Myeloperoxidase, inflammation, and dysfunctional high-density lipoprotein. *J Clin Lipidol* 2010b; 4(5):382-8.
- Streja L, Packard CJ, Shephard J, et al. Factors affecting low-density lipoprotein and high-density lipoprotein cholesterol response to pravastatin in the West of Scotland Primary Prevention Study (WOSCOPS). *Am J Cardiol* 2002; 90(7):731-6.
- Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* 2008; 263(3):256-73.
- Tenenbaum A, Fisman EZ. 'If it ain't broke, don't fix it': a commentary on the positive-negative results of the ACCORD Lipid study. *Cardiovasc Diabetol* 2010; 9:24-28.
- Varady KA, Jones PJ. Combination diet and exercise interventions for the treatment of dyslipidemia: an effective preliminary strategy to lower cholesterol levels? *J Nutr* 2005; 135(8):1829-35.
- Vergeer M, Holleboom AG, Kastelein JJ, et al. The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis? *J Lipid Res* 2010; 51(8):2058-73.
- Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis* 1988; 8(6):737-41.