UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

SARAH FAGUNDES GROBE

Aspectos metabólicos e funcionais da partícula de HDL: um estudo comparativo entre pacientes com angina refratária e angina não limitante

São Paulo

2024

SARAH FAGUNDES GROBE

Aspectos metabólicos e funcionais da partícula de HDL: um estudo comparativo entre pacientes com angina refratária e angina não limitante

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Henrique Wolff Gowdak

São Paulo

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Grobe, Sarah Fagundes

Aspectos metabólicos e funcionais da partícula de HDL : um estudo comparativo entre pacientes com angina refratária e angina não limitante / Sarah Fagundes Grobe; Luís Henrique Wolff Gowdak, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) -- Programa de Cardiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Angina 2. Angina refratária 3. Aterosclerose 4. HDL 5. Nanopartícula 6. Transferência de lípides I. Gowdak, Luís Henrique Wolff, orient. II. Título

USP/FM/DBD-078/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Dedicatória

Dedico a realização desse sonho aos meus pais, **Jardel e Sílvia**, e ao meu irmão, **Felipe**. Eles que entenderam a minha ausência e sempre fortaleceram o meu propósito durante a minha trajetória.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por ser minha base e por ter sido meu amparo durante toda essa jornada.

Aos **meus pais e meu irmão**, por confiarem nos meus projetos e decisões, por aceitarem a minha ausência e por me encorajarem em todos os momentos.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. **Luís Henrique Wolff Gowdak**, sou grata por ter reconhecido em mim um potencial que eu mesma não imaginava. Agradeço por ter acreditado que eu seria capaz e por ter fortalecido a minha confiança para voos ainda mais longos. O senhor me puxou pelas mãos e direcionou todos os melhores passos que eu poderia dar.

Ao Prof. Dr. **Raul Cavalcante Maranhão**, pelo carinho com que me recebeu em seu laboratório. Agradeço por ter me ensinado tanto sobre a mágica que envolve a partícula de HDL e por ter aprimorado em mim as habilidades de um pesquisador.

Ao Prof. Dr. **José Rocha Faria Neto**, Prof. Dr. **Raul Dias dos Santos Filho** e Prof. Dra. **Fabiana Hanna Rached**, pela generosidade na banca de qualificação. Vocês engrandeceram minha tese.

À Dra. **Luciana Cascaes Oliveira Dourado**, por ser um exemplo dentro do Núcleo de Angina Refratária.

Aos meus grandes parceiros de trabalho, que com carinho, também chamo de amigos: **Fatima**, **Maurício**, **Wanderlei** e **Thauany**. Esse trabalho leva um pouco de cada um de vocês.

Ao Dr. **Vinícius Shibata**, meu grande amigo da faculdade, e com quem tive o prazer de trabalhar novamente nesse projeto.

Aos colegas de doutorado do InCor: **Sara Del Vecchio Ziotti** e **Renato Palácio de Azevedo**. A jornada foi muito melhor com vocês.

À minha avó **Francisca**, que representa em vida os meus outros avós. Agradeço cada abraço e cada incentivo. Obrigada por compartilhar sua sabedoria comigo.

À toda **minha família**, obrigada por vibrarem por cada conquista minha

durante esses anos. Meus tios, tias e primos, obrigada por viverem comigo essa experiência.

À minha amiga **Paula**, de tantos anos, obrigada por me receber em sua casa e fazer desse projeto mais um elo entre nós.

Aos meus **amigos de Curitiba**, o apoio de vocês foi fundamental para que eu tivesse segurança e tranquilidade na condução do meu projeto em São Paulo.

Aos meus estimados **pacientes**, por serem a razão disso tudo e por fortalecerem o meu propósito diariamente. Vocês foram e continuam sendo a motivação do meu trabalho.

Epígrafe

“Nascêssemos, vivêssemos e morrêssemos simplesmente, seria a nossa vida, a nossa passagem por este mundo, vazia de conteúdo e sem qualquer sentido. ”

(Carlos Fagundes, **meu querido avô**)

Resumo

RESUMO

Grobe, S.F. Aspectos metabólicos e funcionais da partícula de HDL: um estudo comparativo entre pacientes com angina refratária e angina não limitante [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Introdução: Pacientes com angina refratária (AR) têm duas vezes mais risco de morte cardiovascular do que pacientes com sintomas não limitantes de angina. A partícula de HDL possui diversas funções anti-aterogênicas que podem contribuir com a proteção cardiovascular e esse estudo tem como objetivo avaliar a capacidade da HDL receber colesterol plasmático em pacientes com AR. **Métodos:** 28 pacientes com AR e 41 controles com angina não-limitante (AE) foram incluídos. Foram analisadas a transferência de colesterol esterificado e não esterificado para a HDL a partir de uma nanopartícula lipídica artificial, o diâmetro médio da HDL, atividade da paraoxonase 1 (PON1), além da concentração de lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) e da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP). Para avaliação da complexidade anatômica foi utilizado o Syntax Escore I. **Resultados:** Não houve diferença entre os grupos quanto às comparações envolvendo o ensaio de transferência de colesterol não esterificado (AE 4,94±0,61% vs. AR 4,92±0,70%, p=0,91) e esterificado (AE 3,84±0,46% vs. AR 3,78±0,61%, p= 0,69), atividade da PON1 (AE 67,74±38,87U/L vs. AR 65,07±50,23, p=0,80) e diâmetro da HDL (AE 9,07±0,23nm vs. AR 9,05±0,32nm, p=0,81). Os dois grupos mostraram ser anatomicamente complexos, com média de Syntax maior que 30, sendo o grupo AR significativamente mais grave (AE 30,30±12,40 vs. AR 36,90±12,10, p<0,05). A complexidade anatômica não mostrou correlação significativa com diâmetro da HDL, atividade da PON1, ou transferências de colesterol não esterificado e esterificado para a HDL (p=0,98; p=0,47; p=0,94; p=0,43; respectivamente). **Conclusão:** Não há diferença nos parâmetros relacionados ao metabolismo e funcionalidade da partícula de HDL, avaliados a partir da transferência de colesterol não esterificado e esterificado, atividade da PON1, diâmetro médio da partícula e concentração de LCAT e CETP, entre os grupos AE e AR.

Palavras-chave: Angina. Angina refratária. Aterosclerose. HDL. Nanopartícula. Transferência de lípides.

Abstract

ABSTRACT

Grobe, S.F. Metabolic and functional aspects of HDL particle: a comparative study between patients with refractory and non-limiting angina [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2024.

Introduction: Patients with refractory angina (RA) have twice as much risk of cardiovascular death than those with the less severe non-limiting angina (NLA) presentation. The HDL fraction has several anti-atherosclerotic actions that can contribute to this, and this study aimed to evaluate the capacity of HDL to receive cholesterol in the plasma of patients with RA. **Methods:** 28 patients with RA and 41 controls with NLA were included. The transfer of unesterified and esterified cholesterol to HDL from a donor lipid emulsion, HDL diameter, paraoxonase 1 (PON1) activity, lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) and cholesterol ester transfer protein (CETP) concentration and serum lipids and apolipoproteins, were performed. The Syntax score I was used to assess anatomical complexity. **Results:** There was no difference between the groups regarding the unesterified (NLA 4.94±0.61 vs. RA 4.92±0.70, p=0.91) and the esterified cholesterol transfer (NLA 3.84±0.46 vs. RA 3.78±0.61, p=0.69), PON1 activity (NLA 67.74±38.87 vs. RA 65.07±50.23, p=0.80) and HDL diameter (NLA 9.07±0.23 vs. RA 9.05±0.32, p=0.81). Both groups presented anatomical complexity, but in RA patients, it was more severe (NLA 30.30±12.40 vs. RA 36.90±12.10, p<0.05). HDL diameter, PON 1 activity, and transfer of unesterified and esterified cholesterol to HDL did not correlate significantly with anatomical complexity (p=0.98; p=0.47; p=0.94; p=0.43; respectively). **Conclusion:** There is no difference in the parameters related to HDL metabolism and functionality, assessed based on the transfer of unesterified and esterified cholesterol, PON1 activity, average particle diameter and concentration of LCAT and CETP, between the NLA and RA groups.

Keywords: Angina. Refractory angina. Atherosclerosis. HDL. Nanoparticle. Lipid transfer

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Metabolismo da HDL 32

Figura 2 – Fluxograma do protocolo clínico 44

Figura 3 – Transferência de colesterol *in vitro* de uma nanopartícula lipídica para a HDL 49

Figura 4 – Fluxograma do recrutamento dos pacientes no estudo 54

Figura 5 – Correlação entre a transferência de colesterol não esterificado (A) e de colesterol esterificado (B) e o Syntax escore I..... 60

Figura 6 – Correlação entre o diâmetro de HDL (A) e atividade de PON1 (B) e o Syntax escore I..... 61

Figura 7 – Correlação entre a concentração de LCAT (A) e de CETP (B) o diâmetro da HDL 63

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas e fatores de risco cardiovasculares dos grupos estudados 55

Tabela 2 – Características basais dos grupos estudados 56

Tabela 3 – Classificação de angina e tratamento medicamentoso dos grupos estudados 57

Tabela 4 – Determinações bioquímicas nos grupos estudados..... 58

Tabela 5 – Transferência de lípides para a HDL nos grupos estudados 58

Tabela 6 – Diâmetro da HDL e atividade da PON1 nos grupos estudados 59

Tabela 7 – Concentração de LCAT e de CETP nos grupos estudados 59

Tabela 8 – Correlação entre LCAT e CETP e transferência para a HDL nos grupos estudados 62

Lista de abreviaturas e siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	ácido acetilsalicílico
ABCA1	transportador A1 cassete ligante de adenosina trifosfato
AE	angina não limitante
apo	apolipoproteina
AR	angina refratária
AVC	acidente vascular cerebral
BRA	bloqueadores do receptor da angiotensina II
CANHEART	*Cardiovascular Health in Ambulatory Care Research Team*
CCS	*Canadian Cardiovascular Society*
CETP	proteína de transferência de colesterol esterificado
CRM	cirurgia de revascularização miocárdica
DAC	doença arterial coronariana
DCV	doença cardiovascular
DM	diabetes *mellitus*
ERASE	*Effect of rHDL on Atherosclerosis - Safety and Efficacy trial*
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	lipoproteína de alta densidade
HDL-c	colesterol da lipoproteína de alta densidade
HF	hipercolesterolemia familiar
IAM	infarto agudo do miocárdio
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
ICP	intervenção coronária percutânea
IECA	inibidores da enzima conversora de angiotensina

IMC	índice de massa corporal
InCor	Instituto do Coração
LCAT	enzima lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LDL-c	colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LDLox	lipoproteína de baixa densidade oxidada
LDLR	receptor da lipoproteína de baixa densidade
Lp(a)	lipoproteína (a)
MESA	*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*
NEPAR	Núcleo de Estudos e Pesquisa em Angina Refratária
PEG	polietilenoglicol
PON	paraoxonase
SCA	síndrome coronariana aguda
SCC	síndrome coronariana crônica
SR-B1	receptor scavenger classe B tipo 1
TRC	transporte reverso do colesterol
TSH	hormônio estimulador da tireoide
VCAM-1	molécula de adesão de células vasculares-1
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 27

1.1 Síndrome Coronariana Crônica e o avanço para Angina Refratária 27

1.2 O papel da HDL na aterosclerose e seu mecanismo de cardioproteção 29

1.2.1 Efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da partícula de HDL e sua ação sobre o endotélio 33

1.3 Racional científico 35

1.4 Qualidade x Quantidade: a importância dos aspectos qualitativos da HDL..... 37

2 JUSTIFICATIVA 39

2.1 Hipótese 39

3 OBJETIVOS 41

3.1 Objetivo primário 41

3.2 Objetivos secundários 41

4 MÉTÓDOS 43

4.1 Cálculo do tamanho amostral 44

4.2 Critérios de inclusão 45

4.3 Critérios de exclusão 45

4.4 Coleta de sangue 46

4.5 Determinações bioquímicas 46

4.6 Preparo da nanopartícula lipídica artificial 47

4.7 Ensaio de transferência de lípides da nanopartícula lipídica artificial para HDL 48

4.8 Determinação do diâmetro da partícula HDL 50

4.9 Determinação da atividade da PON1 50

4.10 Determinação da concentração de LCAT e de CETP 50

4.11 Análise do Syntax Escore I 51

4.12 Análise estatística 51

5 RESULTADOS 53

6 DISCUSSÃO 65

6.1 Limitações 71

7 CONCLUSÃO 73

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome Coronariana Crônica e o avanço para Angina Refratária

As métricas que avaliam o impacto das doenças cardiovasculares (DCV) e seus fatores de risco nas mortes no mundo são claras: a doença isquêmica do coração continua aumentando ao longo do tempo e impondo consequências devastadoras à saúde e bem-estar da população. [1]

O processo aterosclerótico costuma evoluir de maneira assintomática por décadas e sua progressão não costuma ser linear. Há claros períodos de agudização e avanço da placa sobrepostos a períodos de inflamação indolentes. [2] A magnitude e o tempo de exposição aos principais fatores de risco cardiovasculares determinam os riscos e complicações de cada indivíduo. [3] A partir disso, o desenvolvimento da doença arterial coronariana (DAC) passa ser uma questão de tempo. Se nada for feito, um endotélio disfuncionante somado à fatores de risco não controláveis invariavelmente darão espaço para a doença que mais mata no mundo. A natureza dinâmica da aterosclerose permite que os indivíduos se apresentem desde o acometimento subclínico e assintomático, até a progressão para angina estável e episódios de síndrome coronariana aguda (SCA). [4]

Wiliam Heberden descreveu, no século XVIII, o que entendemos hoje como angina pectoris. A angina é considerada a principal manifestação clínica da síndrome coronariana crônica (SCC) e aflige cerca de 5% dos indivíduos com mais de 40 anos em todo o mundo. [5] Fundamentalmente, a angina é classificada em 4 níveis de acordo com a *Canadian Cardiovascular Society* (CCS), sendo o nível de angina uma variável elementar no manejo clínico dos pacientes, espelhando gravidade, e servindo como guia na condução de cada caso. [6]

Há mais de 2 séculos, contemplamos os avanços nos recursos terapêuticos dessa doença, com inúmeras alternativas de tratamento medicamentoso, intervencionista e terapias experimentais promissoras no que tange o controle da dor e a melhora da qualidade de vida. Apesar do progresso, parte dos pacientes não terá sucesso no tratamento e poderá manifestar uma face ainda mais desafiadora da doença: assim começa a jornada dos pacientes com angina refratária (AR), uma condição clínica incapacitante e que promove maior risco cardiovascular.

Diferentes mecanismos fisiopatológicos estão envolvidos na isquemia miocárdica, mas entender que o conceito de AR guarda íntima relação com insuficiência coronariana na presença de doença aterosclerótica, dor torácica persistente após 3 meses de tratamento clínico otimizado, além da inviabilidade dos tratamentos intervencionistas convencionais, é primordial para o diagnóstico correto e para propor estratégias adequadas no seguimento. [7] Por longos anos, pacientes com AR foram julgados como o fim da linha na evolução da SCC, sendo obrigados a conviver com a dor e sem perspectiva de alívio. [8] Estima-se que 15% dos pacientes com SCC apresentem sintomas refratários [9,10] e agreguem, por isso, maior risco para eventos coronarianos agudos e apresentem o dobro de risco para morte cardiovascular. [11,12]

Dados da Universidade de Duke mostram que pacientes com angina e acometimento de múltiplos vasos ao cateterismo cardíaco, quando mantidos em tratamento clínico, têm 61% de taxa de reinternações em 5 anos e uma taxa cumulativa de morte, infarto agudo do miocárdio (IAM), revascularização tardia ou reinternação cardíaca de 78% no mesmo período. [13] Segundo publicação de uma pequena coorte da Cleveland Clinic, a mortalidade em 1 ano nos pacientes com AR é de 17%. [14] No entanto, a maior coorte, e a única destinada exclusivamente ao seguimento de longo prazo dos doentes com AR, envolveu a análise de 1200 pacientes em Minneapolis e mostrou que a mortalidade dessa população em 5 anos foi cerca de 20%. [12] Mais de 50 mil casos de AR são diagnosticados a cada ano nos Estados Unidos, computando cerca de 1,8 milhões de pacientes convivendo com a doença atualmente. [15] Grande parte da incapacidade de intervir no doente com AR atribui-se ao acometimento difuso da árvore coronariana e da complexidade anatômicas das lesões, [16] incluindo reestenose de stent, oclusão total crônica, degeneração de enxertos venosos, [12] e é nítido que essa população experimenta maior incidência de re-hospitalização por instabilidade dos sintomas quando comparada à população pouco sintomática. [17]

Modificar agressivamente os fatores de risco e aplicar o arsenal terapêutico disponível têm potencial para frear a curva de mortalidade nessa população e promover melhora na qualidade de vida. [12] Mas, mesmo com todos os fatores de risco controlados e tratamento clínico otimizado, ainda alguns indivíduos vão progredir com a doença aterosclerótica, experimentar sintomas persistentes e

eventos agudos recorrentes. Isto está sustentado pelos pilares de aterotrombose, inflamação vascular e metabolismo das outras lipoproteínas. [18]

A preocupação com o processo aterosclerótico vem desde a década de 60, em que estabilizar o ateroma e impedir a sua progressão eram objetivos pautados majoritariamente na redução plasmática do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c). [19] Ainda assim, ao entender que as lipoproteínas são as maiores mediadoras da aterosclerose, faz-se indispensável olhar para as outras partículas além da lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Até agora, além da LDL, a lipoproteína (a) [Lp(a)] é o único biomarcador que tem correlação independente com gravidade e progressão da DAC, [20-22] desfechos cardiovasculares adversos, [23] bem como o incremento da angina. [24,25] A atuação da Lp(a) no processo aterogênico é ampla e desafiadora, o que fez dessa partícula um marcador de risco cardiovascular e um potencial alvo terapêutico já em estudo. [26] Ainda hoje, não foi encontrado outro biomarcador para explicar o maior envolvimento aterosclerótico em pacientes com SCC avançada e AR. [12,13] A busca por mais marcadores do metabolismo lipídico capazes de discriminar pacientes com AR é necessária, podendo espelhar alterações metabólicas relacionadas à progressão da DAC e gênese da dor.

Nesse sentido, o interesse sobre a lipoproteína de alta densidade (HDL) cresceu em função do seu complexo metabolismo, interação com outras lipoproteínas do plasma e por alguns estudos mostrarem que a sua funcionalidade alterada pode ser preditora de aterosclerose precoce e acelerada. [27-31]

1.2 O papel da HDL na aterosclerose e seu mecanismo de cardioproteção

Compreender o metabolismo lipídico impacta, seguramente, na prevenção da doença aterosclerótica e suas consequências. Mas isso inclui, também, entender o que há além da concentração de LDL-c.

Designada como uma partícula multifuncional, a HDL apresenta efeitos que vão muito além do transporte reverso do colesterol (TRC) e é capaz de remodelar-se continuamente dependendo da necessidade biológica. Ao ativar sinais intracelulares nos macrófagos, plaquetas e células endoteliais, a HDL promove ativação imunológica com resposta inata nas inflamações agudas, ação no sistema

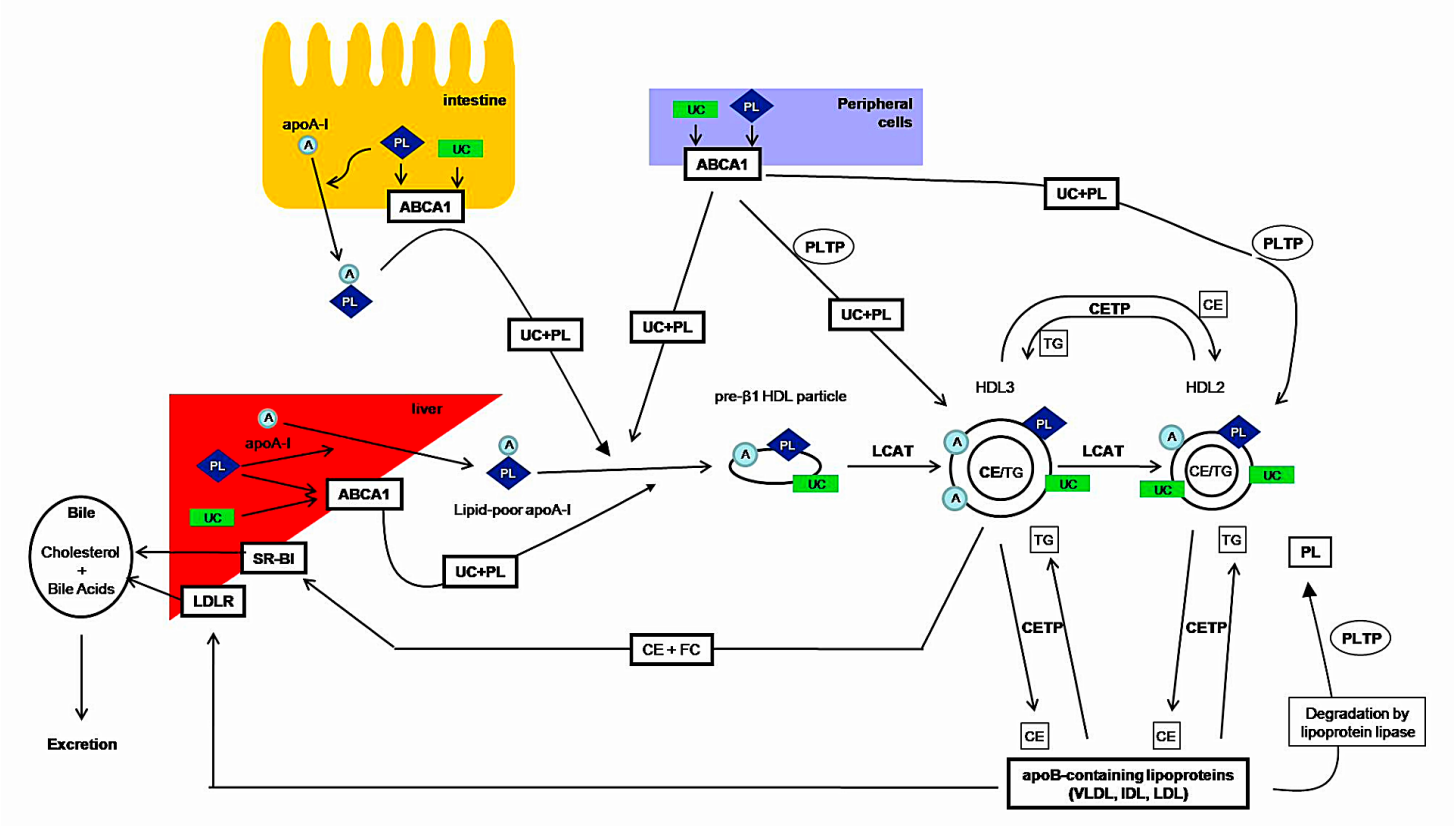
complemento, promoção da angiogênese, comunicação célula a célula, melhora da função endotelial, estímulo à produção e sensibilização da insulina e maior capacidade antioxidante, antitrombótica e anti-inflamatória, que resumem parte de suas propriedades antiaterogênicas. [32-34]

A partícula de HDL é composta por uma superfície de fosfolípides, colesterol não esterificado e apolipoproteinas (apo) que garantem estrutura, interação entre células e atividade antiaterogênica. Já seu núcleo está repleto de colesterol esterificado e pequena quantidade de triglicérides. [35] A HDL adquire um formato esférico após diversas interações celulares e entre lipoproteínas no plasma, que mudam seu tamanho, composição, densidade e carga. [33,36] A estruturação do metabolismo da HDL é complexa e dependente de diferentes receptores, co-transportadores, enzimas e proteínas presentes no plasma e nas superfícies dos órgãos. [32,33] Com isso, o TRC só será válido se o ambiente estiver saudável e todas as etapas do seu metabolismo estiverem íntegras.

As pré-βHDL, partículas que dão origem ao ciclo do metabolismo da HDL, são achatadas e praticamente sem núcleo. [37,38] Sua formação depende muito da interação entre apo A-I com o transportador A1 cassete ligante de adenosina trifosfato (ABCA1) das superfícies dos macrófagos, intestino e fígado. [35,37] A apo A-I, principal proteína da HDL, é capaz de captar o excesso de colesterol não esterificado e de fosfolípides através de sua interação com os transportadores de superfícies e conduz o desenvolvimento da pré-βHDL a partir dos componentes advindos da hidrólise de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. [37] Na circulação, a interação da partícula com os tecidos extra-hepáticos continua sendo fundamental para a captação do colesterol periférico. Ao ser internalizado, o colesterol não esterificado da superfície da partícula é esterificado por ação da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), e forma um núcleo lipídico maior, transformando a partícula em um formato esférico. [32,37] A estrutura da partícula assume uma conformação madura conforme acontece a aquisição de colesterol e seu armazenamento na forma esterificada dentro núcleo hidrofóbico, ou seja, a HDL recolhe o colesterol não esterificado da periferia, esterifica-o e armazena-o no núcleo até que seja transportado até o fígado. A etapa intermediária desse processo forma a partícula de HDL3, esférica, e com um núcleo maior quando comparado à βHDL. Ao cair na circulação, ela cresce em tamanho, conquista mais colesterol e se transforma na HDL2, maior e ainda mais madura. [35,36] Tanto a HDL2 quanto a HDL3

são susceptíveis à ação plasmática da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), capaz de trocar triglicerídeos das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (como os quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade [VLDL] e LDL) em troca de colesterol esterificado. [35,36] Através da sua interação com os receptores scavenger classe B tipo 1 (SR-BI) nas células hepáticas, tanto a HDL rica de triglicerídeos quanto a HDL2 levam até o fígado o colesterol que será removido e excretado na bile e nas fezes, dando fim ao processo de TRC. [32,35,36] (Figura 1).

Figura 1 – Metabolismo da HDL.



Fonte: Adaptado de Maranhão e Freitas.[38] Sintetizada pelo fígado e intestino, a apolipoproteina (apo) A-I capta o excesso de colesterol livre (UC) e fosfolípides (PL) das superfícies das células através da interação com o receptor A1 cassete ligante de adenosina trifosfato (ABCA1). Essa interação promove a formação da pré-βHDL. Por ação da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), ocorre a esterificação do colesterol, que transforma a HDL nascente em uma partícula esférica e mais madura. As partículas menores são HDL3 e as maiores com mais conteúdo de colesterol esterificado (CE), as HDL2. As partículas mais maduras são capazes de adquirir lípides de outras lipoproteínas e trocar CE por triglicerídeos (TG) em função da ação da lipase lipoproteica e da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP). O colesterol contido na HDL é transportado até o fígado, reconhecido pelos receptores scavenger classe B tipo I (SR-BI) e excretado na bile. O colesterol contido nas lipoproteínas contendo apo B é captado pelo receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) no fígado.

1.2.1 Efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da partícula de HDL e sua ação sobre o endotélio

A oxidação do LDL-c é ponto crucial no processo aterogênico, servindo como fator quimiotático para a mobilização de células inflamatórias e moléculas de adesão a nível subendotelial. A HDL tem em sua estrutura substâncias capazes de conter o processo oxidativo, fundamentalmente representadas pelas apo A-I e paraoxonases (PON). A apo A-I, produzida no fígado e intestino, é o maior componente proteico da estrutura da HDL e está responsável por ativar diversos mecanismos ateroprotetores no plasma: a ação antioxidativa, o aumento do efluxo de colesterol e a interação com receptores SR-BI e ABCA1. [39]

Contudo, as PON constituem uma família de proteínas com a maior capacidade antioxidativa da HDL, provavelmente pela habilidade de hidrolisar e reduzir a formação de hidroxiperóxidos de fosfolípides na superfície da LDL. [39] São compostas por três subtipos: PON1, PON2 e PON3. A primeira e a última fazem parte da partícula de HDL, enquanto que a PON2 é encontrada nos macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. [39,40] Estudos experimentais mostraram o papel da PON no desenvolvimento da aterosclerose, especialmente o subtipo 1. Foi proposto que ao incubar LDL e HDL juntas, sob condições oxidantes, a quantidade total de peróxidos lipídicos formados seria substancialmente menor do que quando as partículas fossem incubadas separadamente, esse fato sugere que a oxidação da LDL é de fato menor na presença da HDL. [41]

A expressão de moléculas de adesão induzida por citocinas e o recrutamento de monócitos e leucócitos a nível de endotélio são as principais consequências da oxidação da LDL. Esse mecanismo dispara o processo inflamatório que perpetua a formação da placa aterosclerótica. Ao mesmo tempo em que inibir a oxidação da LDL impacta em menor internalização da partícula para a camada íntima do vaso e, por consequência, menor formação de células espumosas, há também menor inflamação local. A ação anti-inflamatória atribuída à HDL vem da sua capacidade de agir sobre as funções secretoras do endotélio [42] em que reduzir a expressão das moléculas de adesão irá impactar em menor interação do endotélio com monócitos e leucócitos e menor recrutamento e migração dessas células para o espaço subendotelial. [43] Já foi demonstrada a presença abundante de molécula de adesão

de células vasculares-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e selectina-E nas placas ateroscleróticas. [44]

O endotélio doente perde sua capacidade de autorregulação do fluxo sanguíneo e, com isso, o seu poder de vasodilatação. A aterosclerose prejudica diretamente essa qualidade do vaso, reduz drasticamente a concentração de óxido nítrico derivado do endotélio, e é nesse ponto que a regulação mediada pela HDL pode contribuir para mitigar essa evolução. [45] A HDL é capaz de estimular a produção de prostaglandina pelas células endoteliais, melhorar a disponibilidade de óxido nítrico local, e modular a síntese de peptídeo C natriurético. Todos esses fatores irão culminar em maior vasodilatação e menor liberação de fatores de crescimento, proliferação de células musculares lisas e secreção de endotelina-1. [40,42,43]

Existem algumas perspectivas e avanços nos tratamentos da HDL. Partindo desses conceitos, alguns estudos com infusão de HDL reconstituído e delipidado e de apo A-I foram desenvolvidos a fim de entender melhor a dinâmica metabólica da partícula e talvez proporcionar uma nova estratégia terapêutica. [46-48]

Em uma pequena comunidade da Itália, foi identificada uma variante da apo A-I que mantinha níveis de colesterol da HDL (HDL-c) muito baixos nessa população, entre 10 e 30mg/dL. [47] Apesar disso, esses indivíduos apresentavam alta longevidade e menos aterosclerose do que se imaginava. A apo A-I passou, então, a ser um alvo terapêutico, principalmente na sua variação natural tipo Milano. Um estudo realizado em 2003 avaliou, em 123 pacientes, a infusão de HDL recombinante contendo apo A-I Milano em pacientes com SCA. Esse tratamento resultou numa significativa redução na placa de ateroma em coronárias avaliadas por ultrassom, com uma diminuição no volume total da placa de 4,2% após 5 semanas de tratamento. [47] Um estudo subsequente chamado ERASE (*Effect of rHDL on Atherosclerosis - Safety and Efficacy*) avaliou a regressão do ateroma com a infusão de HDL reconstituído em 183 pacientes com DAC. O resultado não mostrou redução de ateroma, mesmo assim, a proposta dos estudos com infusão de HDL sinaliza uma terapia clinicamente factível e impulsiona novas investigações sob esta perspectiva. [46]

1.3 Racional científico

Há mais de 50 anos o aspecto quantitativo do HDL-c passou a ser um relevante preditor de desfecho cardiovascular nos indivíduos saudáveis. Além do mais, cerca de 40% dos pacientes com DAC apresentam níveis baixos de HDL-c. [49]

Sabe-se, desde o estudo de Framingham, que o valor plasmático do HDL-c é um marcador de risco para a doença aterosclerótica. [50] Uma subanálise desse estudo mostrou a associação entre a maior incidência de DAC em pacientes acima de 50 anos, independente do sexo, e baixos níveis plasmáticos do HDL-c. Além disso, o HDL-c esteve associado à piores condições de saúde: intolerância à glicose, níveis de pressão arterial e excesso de peso. [50] Para cada redução de 5mg/dL de HDL-c houve um aumento de 25% no risco de IAM. [51] Apesar disso, já era discutido se os valores plasmáticos do HDL-c apontavam a direção quanto ao risco cardiovascular da população ou seria também um guia para o tratamento. [50] Apesar dos estudos epidemiológicos sugerirem que há uma relação inversa entre as concentrações do HDL-c e prevalência e desfechos cardiovasculares desfavoráveis, [52] coortes mais recentes colocam esse pensamento sob dúvida, especialmente nos pacientes com doença estabelecida. Já nessa época, com o início da terapia farmacológica com estatinas para melhor controle lipídico e a busca por metas mais rigorosas, o entendimento sobre a relação causal entre lipoproteínas e aterogênese ganhou outro foco e o controle intensivo do LDL-c passou a ser prioridade. [32,53]

Com mais de 600 mil pacientes sem DAC, uma das maiores coortes observacionais do mundo determinou se haveria associação entre HDL-c e morte cardiovascular e não cardiovascular. Mais do que somente o risco cardíaco, esse trabalho mostrou que os baixos níveis de HDL-c foram reflexo da má condição de saúde como um todo, pacientes com mais comorbidades, piores condições sociodemográficas e, por consequência, também maior mortalidade por todas as causas. [52] Dados do estudo MESA (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*) mostraram não haver impacto e aumento da mortalidade no seguimento de 10 anos nos pacientes com baixos níveis de HDL-c e que estavam em prevenção primária. [51] Mais de 4 mil chineses foram seguidos por cerca de 27 meses a fim de avaliar a relação entre níveis de HDL-c e gravidade e prognóstico de pacientes com DAC. O resultado foi negativo mesmo quando considerados idade, sexo e níveis de LDL-c. [32,33]

Estudos de randomização mendeliana apontam para uma relação não tão óbvia e direta entre HDL e aterosclerose. [54] Polimorfismos genéticos podem explicar a grande variação fenotípica relacionada aos lípides, e a influência deles sobre os valores de HDL-c não seria diferente. A base hereditária é muito forte quando se avalia HDL-c baixo e esse fato foi investigado em uma revisão que avaliou estudos genéticos entre 1990 e 2013. Defeitos nos genes da apo A-I, lipase lipoproteica, bem como LCAT e ABCA1, culminam com baixos níveis plasmáticos de HDL-c e consequente maior risco de DAC. [55] Embora essa relação pareça coerente e linear, alterações genéticas que promovem um aumento muito significativo de HDL-c, como deficiência de CETP ou lipase hepática, [56] não mostraram proteção cardiovascular, inclusive sugerindo aumento na incidência de IAM. [54,57] Cerca de 43 mutações foram descritas relacionadas à apolipoproteina A-I e a única variante que parece não aumentar o risco cardiovascular é a do tipo Milano. Ao passo que pacientes com mutações no gene da ABCA1, em que a partícula de HDL está praticamente ausente, estão sob maior risco cardiovascular. [54,56]

Dados do estudo CANHEART (*Cardiovascular Health in Ambulatory Care Research Team*) apontam para um conceito alternativo, em que a concentração de HDL-c manifesta um comportamento bimodal de risco, já que homens com valores plasmáticos de HDL-c acima de 70mg/dL e mulheres acima de 90mg/dL tiveram maior mortalidade não cardiovascular. [52] Um estudo de coorte de 2022 mostrou que pacientes com DAC e HDL-c acima de 80mg/dL estiveram sob maior risco de mortalidade cardiovascular e por todas as causas quando comparados com indivíduos que apresentavam HDL-c entre 40 e 60mg/dL. [58] Em 2017, duas coortes dinamarquesas também mostraram esse comportamento em “U”. Tanto níveis reduzidos quanto aumentos extremos nos valores plasmáticos da partícula aumentaram a mortalidade por todas as causas, independente do sexo. [32,53]

A relevância biológica da partícula de HDL é indiscutível, visto todas as suas propriedades antiaterogênicas, mas a arte está justamente na interpretação dos seus resultados considerando a população avaliada. Diversos estudos com intervenção farmacológica responderam que não é possível atenuar o risco cardiovascular com medicamentos que só aumentem os níveis plasmáticos de HDL-c. [59-61] O aumento indiscriminado dos seus valores não traz impacto sobre o risco cardiovascular, não podendo considerá-lo, então, como um marcador de benefício na população com DAC. [62]

1.4 Qualidade x Quantidade: a importância dos aspectos qualitativos da HDL

É justo pensar que quanto mais HDL circulante estiver disponível, maior quantidade de colesterol periférico será captado e, por consequência, excretado através do TRC. [60,63] Contudo, a competência da partícula em predizer o risco cardiovascular guarda íntima relação com a sua capacidade antiaterogênica e não necessariamente com seu nível plasmático de colesterol. [32] A partir disso, algumas metodologias foram desenvolvidas para esse fim. Um sistema de nanopartículas capaz de avaliar a transferência de lípides entre diferentes classes de lipoproteínas, desenvolvido por Maranhão e colaboradores, foi capaz de mostrar que a funcionalidade da HDL está comprometida em diversas situações clínicas, incluindo a DAC. [28-31,64]

A habilidade da HDL em adquirir e transferir colesterol impacta na sua estrutura, forma e distribuição nas subclasses, pilares fundamentais na proteção cardiovascular. [35]

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Diante da observação de que pacientes com AR configuram um dos extremos da SCC, com maior morbimortalidade em relação aos pacientes sem limitação funcional, maior acometimento da árvore coronariana e progressão da doença aterosclerótica ao longo do tempo, propõe-se a análise da função da partícula de HDL como um marcador de risco para angina refratária.

2.1 Hipótese

Há diferença nos aspectos metabólicos e funcionais da partícula de HDL entre pacientes com AR e angina não limitante (AE).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

Comparar, entre pacientes com AR e AE, a capacidade da partícula de HDL de receber colesterol de outras lipoproteínas a partir do ensaio de transferências de colesterol não esterificado e esterificado de uma nanopartícula lipídica artificial.

3.2 Objetivos secundários

3.2.1 Comparar os aspectos metabólicos e funcionais da partícula de HDL entre pacientes com AR e AE a partir das seguintes determinações:

a) Atividade da PON1;

b) Diâmetro médio das partículas de HDL;

c) Concentrações plasmáticas de LCAT e CETP.

3.2.2 Correlacionar os aspectos metabólicos e funcionais da partícula de HDL, acima elencados, com a complexidade anatômica coronariana a partir do Syntax escore I.

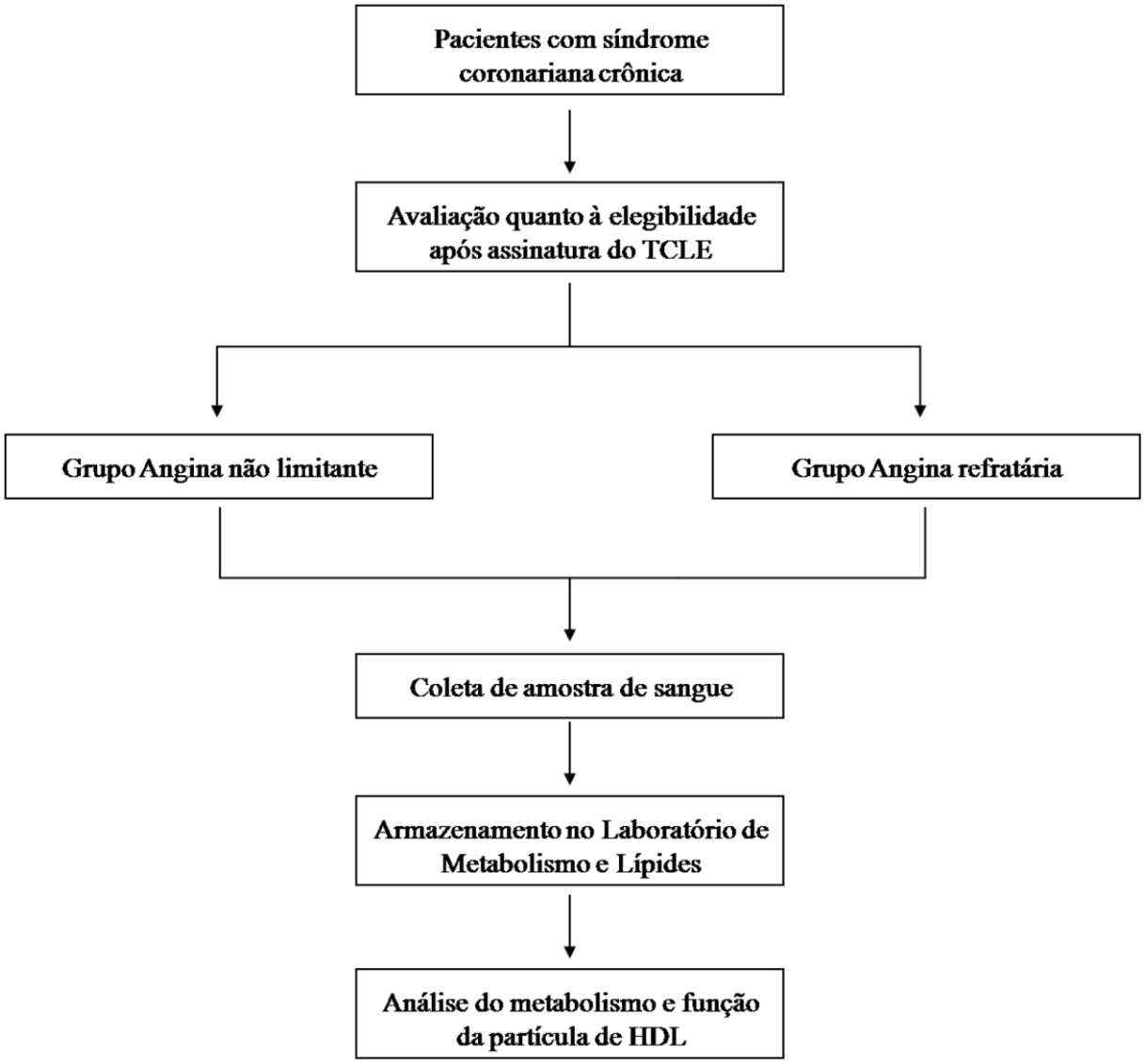
Métodos

4 MÉTODOS

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos da Universidade de São Paulo e seguindo as orientações da Declaração de Helsinki. Trata-se de estudo transversal, unicêntrico, descritivo e comparativo. A busca pelos participantes foi realizada pela pesquisa em prontuário eletrônico do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor - HCFMUSP). Os pacientes foram selecionados a partir da Unidade Ambulatorial do Núcleo de Estudos e Pesquisa em Angina Refratária (NEPAR), da Unidade de Coronariopatia Crônica e da Unidade de Aterosclerose, quando atendidos os critérios de inclusão e exclusão descritos abaixo. Os pacientes leram o termo de consentimento livre e esclarecido e aceitaram participar do estudo. Foram esclarecidas todas as dúvidas e antes da realização de qualquer procedimento, o termo foi assinado e datado em duas vias. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética de Pesquisas do InCor-HCFMUSP, sob número: 16233519.4.0000.0068.

O fluxograma a seguir ilustra como o protocolo clínico foi seguido durante o estudo (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma do protocolo clínico.



4.1 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral abaixo usou como referência o percentual de variação das taxas de transferência de colesterol não esterificado de uma nanopartícula lipídica artificial para HDL-c observado em um trabalho publicado por Maranhão e colaboradores. [63]

Número de grupos: 2

Parâmetros utilizados:

Alfa= 0,05

1-β= 0,80

Médias: AE: 3,8 ± 1,2

AR: 2,9 +- 1,2

Desvio padrão: 3

Assumindo a hipótese que o grupo AR teria 25% a menos de transferência de colesterol não esterificado, chega-se a um número de 28 participantes por grupo.

4.2 Critérios de inclusão

Comuns a ambos os grupos de pacientes:

- Ambos os sexos são elegíveis;
- Idade maior ou igual a 18 anos;
- Uso de estatinas em doses maximamente toleradas há pelo menos 3 meses;
- Angiografia coronariana com evidência de DAC obstrutiva, com pelo menos 50% de comprometimento do vaso epicárdico;
- Angiografia coronariana com no máximo 2 anos da data de inclusão;
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Para os pacientes do grupo AR, além dos critérios acima:

- Presença de sintomas incapacitantes de acordo com classe de angina da CCS (III ou IV) por pelo menos 3 meses em terapia antianginosa maximamente tolerada (3 classes diferentes) e não candidatos a procedimentos de revascularização;
- Documentação objetiva de isquemia miocárdica estresse-induzida por qualquer método.

Para os pacientes do grupo AE, além dos critérios citados:

- Angina CCS 0 ou I.
- Uso de no máximo 2 classes diferentes de antianginosos

4.3 Critérios de exclusão

Comuns a ambos os grupos de pacientes:

- História de SCA nos últimos seis meses;

- Uso de hormônios anabolizantes nos últimos seis meses;
- Uso atual de terapia antirretroviral para tratamento do vírus da imunodeficiência humana;
- Uso de fibratos nos últimos três meses;
- Hipotireoidismo primário ou secundário não compensado (valores de hormônio estimulador da tireoide (TSH) ≥ 10 µUI/mL);
- Praticantes de atividade física em pelo menos 5 dias na semana e/ou de alto rendimento;
- Doença renal crônica estágio V (dialítica);
- Mulheres em idade fértil;
- Terapia de reposição hormonal na mulher;
- Etilismo crônico;
- Uso de agentes imunossupressores nos últimos três meses;
- Diagnóstico atual de síndromes colestáticas ou hepatopatias crônicas;
- Hipercolesterolemia familiar;
- Participação concomitante em outro estudo.

4.4 Coleta de sangue

Indivíduos em uso de estatinas isoladamente ou em associação a outros agentes hipolipemiantes suspenderam seu uso por 30 dias antes da coleta de sangue. Foram coletados 4 tubos de plasma contendo EDTA e 2 tubos de soro de cada paciente por meio de coleta de sangue venoso periférico, após 12 horas de jejum. As coletas foram feitas no período da manhã no Laboratório de Metabolismo e Lípides do InCor-HCFMUSP por técnico habilitado e armazenadas no mesmo local.

4.5 Determinações bioquímicas

Os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total foram determinados por método colorimétrico enzimático (Siemens Healthcare, Newark, EUA). O HDL-c foi determinado pelo mesmo método utilizado para o colesterol total, após precipitação química das lipoproteínas que contêm apo B, utilizando-se reagente

precipitante constituído por cloreto de magnésio e ácido fosfotungstico. O LDL-c foi estimado pela equação de Friedewald (LDL-c = colesterol total - HDL-c - (triglicerídeos/5). [65] A concentração de não HDL-c foi calculada (Não-HDL-c = Colesterol total - HDL-c). As concentrações plasmáticas de apo A-I e B foram determinadas através do método imunonefelometria (Siemens Healthcare).

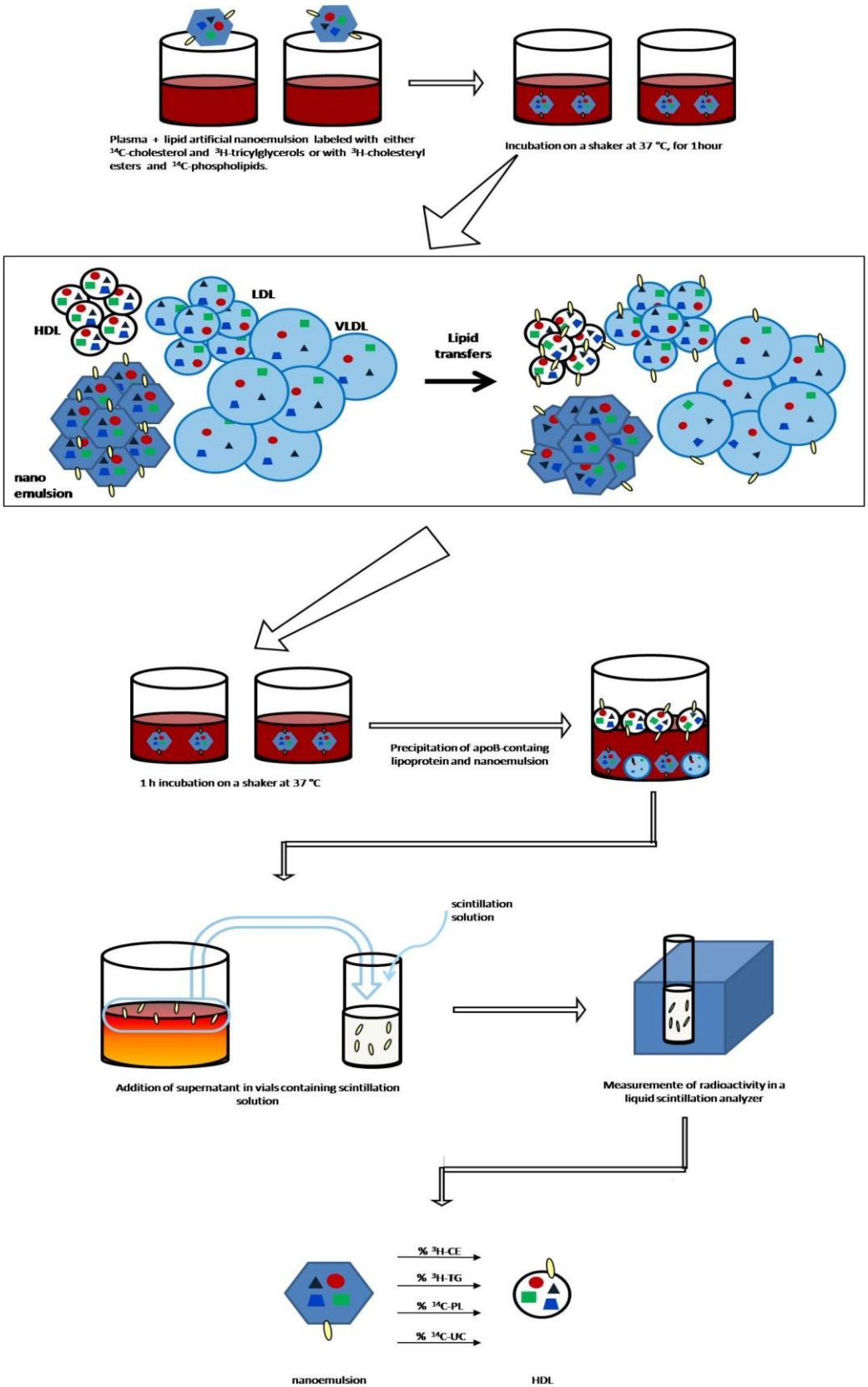
4.6 Preparo da nanopartícula lipídica artificial

A nanopartícula lipídica artificial foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg, Small e Atkinson [66] e modificada por Maranhão e colaboradores. [67] Em um frasco, foram pipetados 40mg de fosfatidilcolina, 20mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5mg de colesterol, diluídos em clorofórmio:metanol (2:1). Foram também adicionados à mistura de lípides, os isótopos ^{3}H-colesterol esterificado e ^{14}C-colesterol não esterificado. Os solventes residuais foram então evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecação a vácuo por 16 horas a 4ºC. Após a adição de 10mL de tampão Tris-HCl 0,01M pH 8, a mistura de lípides foi emulsificada por irradiação ultrassônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil) potência 125W, durante 3 horas, com temperatura variando entre 51ºC a 55ºC. Para obtenção da nanopartícula lipídica artificial na faixa de diâmetro e tamanho desejados, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação. Na primeira etapa (200.000g por 30 minutos a 4ºC), o sobrenadante foi removido por aspiração (1mL) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para 1,21g/mL. Após a segunda centrifugação (200.000g por 2 horas a 4ºC), a nanopartícula lipídica artificial foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise em tampão Tris HCl 0,01M pH=8. Finalmente, a emulsão foi esterilizada por filtração em membrana Millipore de 0,22µm de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4ºC por até 15 dias.

4.7 Ensaio de transferência de lípides da nanopartícula lipídica artificial para HDL

O ensaio de transferência de lípides para HDL foi realizado segundo descrito por Lo Prete e colaboradores. [30] Uma alíquota de 200µL de plasma dos participantes foi incubada com 50µL da nanopartícula marcada com os lípides radioativos (^{3}H-colesterol esterificado e ^{14}C-colesterol não esterificado) a 37^{o}C sob agitação durante 1 hora. Após esse procedimento, foram adicionados 250µL de reagente precipitante (0,2% Dextran / 0,3mol/L $MgCl_2$) seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos a 3000rpm. O infranadante, contendo a nanopartícula e as lipoproteínas plasmáticas que contém apo B, VLDL e LDL, foi desprezado. No sobrenadante, contendo a HDL, foi contada a radioatividade presente em contador de cintilação líquida (Hidex, Turku, Finlândia), que corresponde à transferência dos lípides radioativos da nanopartícula para a HDL do indivíduo. Foi calculada a percentagem de transferência de cada um dos lípides radioativos, considerando como 100% a radioatividade total utilizada na incubação. Os resultados foram expressos em percentagem de lípides transferidos. O ensaio de transferência lipídica *in vitro* está representado a seguir (Figura 3).

Figura 3 – Transferência de colesterol *in vitro* de uma nanopartícula lipídica para a HDL.



Fonte: Adaptado de Maranhão e Freitas. [38]

4.8 Determinação do diâmetro da partícula HDL

Em amostra de plasma fresco, a HDL foi separada por precipitação química das lipoproteínas que contêm apo B, através da adição de polietileno glicol (PEG) 8000 (200g/L). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas vigorosamente durante 30 segundos e posteriormente centrifugadas a 5.000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante contendo HDL foi diluído em solução de Na Cl (10mmol/L) e, em seguida, filtrado em filtro Millipore 0,22µm de diâmetro. A medida do diâmetro da HDL foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano-ZS, Malvern, Reino Unido) em um ângulo de 90º e em 658nm, e expressos pelos resultados médios obtidos em 10 corridas de 1 minuto cada. [68]

4.9 Determinação da atividade da PON1

A atividade da PON1 associada a HDL foi medida adicionando-se 25uL de soro a 500uL de tampão Tris-HCl (0,1M, pH 8) contendo 2 mmol/L de CaCl2 e 1,1mmol/L de paraoxon (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). Em seguida foi adicionado 200mL da mistura (tampão + soro), em placa de 96 poços, em duplicata. A geração de p-nitrofenol foi medida a 405nm a 37ºC em leitor de microplaca (Multilabel Reader VictorTMX3, PerkinElmer, Massachusetts, EUA). Para o cálculo da atividade da enzima, a média da variação das absorbâncias foi multiplicada pelo fator 1163,43nMol/mL.

4.10 Determinação da concentração de LCAT e de CETP

A concentração de LCAT e de CETP foi determinada pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (método ELISA, Cloud-clone Corp, Katy, EUA).

4.11 Análise do Syntax escore I

O diagnóstico de DAC foi realizado de acordo com exames angiográficos disponíveis no sistema hospitalar da instituição. A partir desse acesso, a análise da complexidade anatômica foi executada por um único observador, Cardiologista Intervencionista do InCor-HCFMUSP.

O método escolhido para essa determinação foi o Syntax escore I, instrumento amplamente utilizado para determinar a gravidade e o prognóstico da DAC. Quanto maior a pontuação da soma das suas variáveis, maior a complexidade anatômica.

4.12 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade da distribuição. Os resultados estão descritos por médias e desvios padrão ou medianas e intervalo interquartílico (variáveis quantitativas) ou por frequências e percentuais (variáveis categóricas). A comparação entre médias se deu por meio de testes não-paramétricos (teste de Mann-Whitney) naquelas variáveis com distribuição não-normal, e testes paramétricos (teste t de Student) naquelas com distribuição normal; para a comparação das frequências utilizou-se o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. A associação entre variáveis contínuas de interesse foi testada através do modelo de regressão linear e está apresentada sob a forma de gráficos de dispersão e curvas de tendência. Valores de $p<0,05$ indicam significância estatística. Para os cálculos estatísticos, utilizou-se o pacote IBM SPSS Statistics for Windows versão 29.0 (2022).

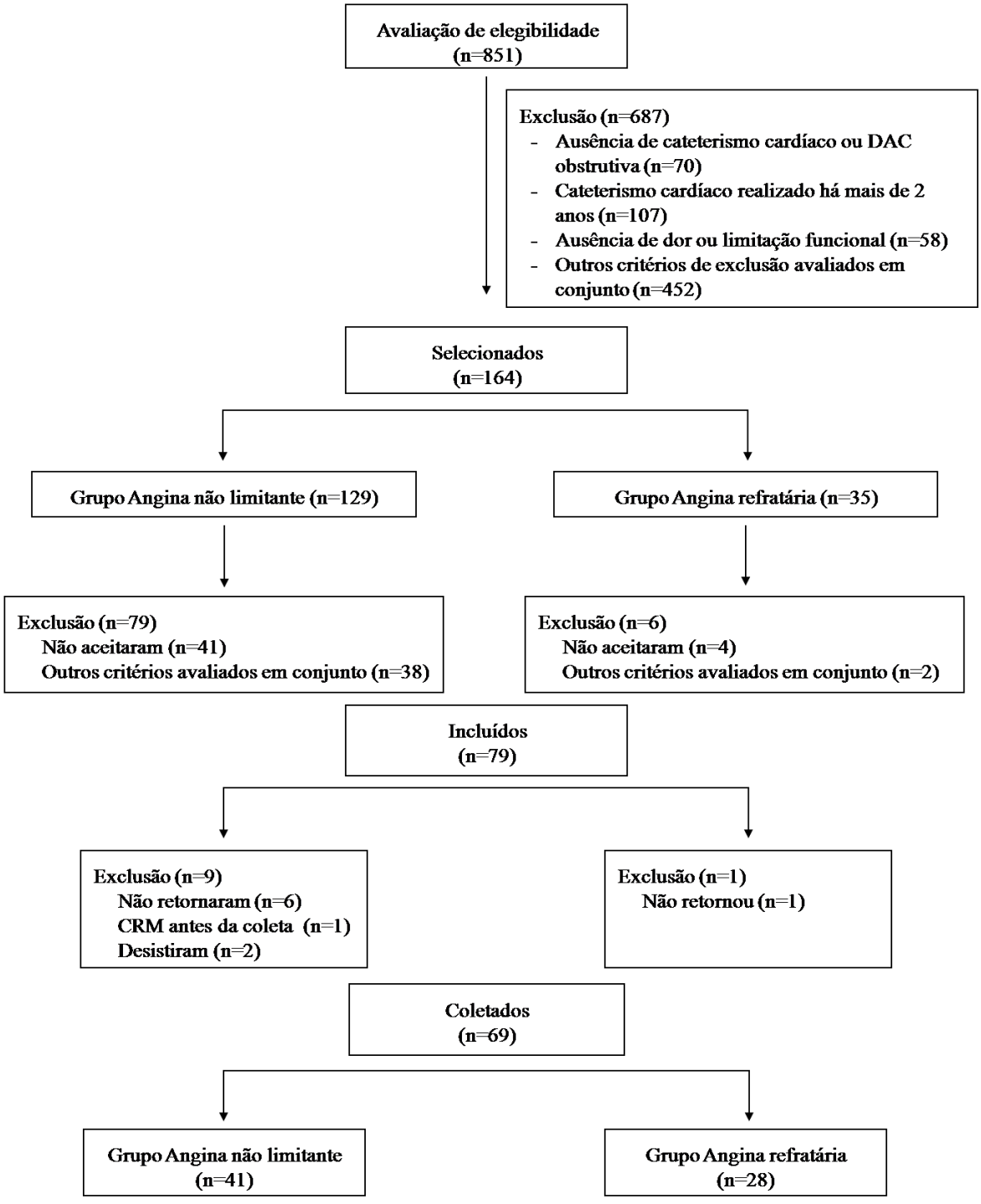
Resultados

5 RESULTADOS

Ao total, foram avaliados 851 prontuários, sendo 584 do grupo AE e 267 do grupo AR. Para o grupo AE, dos 584 prontuários analisados, 455 foram excluídos, especialmente por não possuírem cateterismo ou não o terem realizado recentemente (dentro de 2 anos do ano da inclusão) ou, ainda, por não ter sido diagnosticado DAC obstrutiva ao exame. Dos 129 pacientes selecionados, 79 não foram incluídos, sendo a razão principal o não consentimento para o estudo. Assim, foram incluídos 50 pacientes, dos quais 41 realizaram a coleta de sangue no laboratório (Figura 4).

No grupo AR, dos 267 prontuários analisados, 232 foram excluídos. Dentre os principais critérios de exclusão, temos a ausência de angina ou limitação funcional e a realização do cateterismo cardíaco há mais de 2 anos do ano de inclusão. Dos 35 pacientes selecionados, 6 não foram incluídos, sendo que 4 deles não deram o consentimento para o estudo. Ao final, foram incluídos 29 pacientes, dos quais 28 realizaram a coleta de sangue no laboratório. O fluxograma do recrutamento dos pacientes no estudo está a seguir (Figura 4).

Figura 4 – Fluxograma do recrutamento dos pacientes no estudo



CRM: cirurgia de revascularização do miocárdio.

As características demográficas e fatores de risco cardiovasculares selecionados podem ser vistos na Tabela 1. Nota-se que os grupos são similares

quanto ao sexo, idade e índice de massa corporal (IMC), bem como a presença de fatores de risco cardiovasculares (hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes mellitus e tabagismo). O diagnóstico de dislipidemia foi obtido através da anamnese e confirmada por registro em prontuário.

Tabela 1 – Características demográficas e fatores de risco cardiovasculares dos grupos estudados.

	AE (n=41)	**AR (n=28)**	**Valor de p**
Idade (anos)	65±8	66±9	0,44
Sexo masculino (n(%))	32 (78)	20 (71)	0,57
Raça			0,68
Branco (n(%))	30 (73)	23 (82)	
Negro (n(%))	9 (22)	4 (14)	
Asiático (n(%))	2 (5)	1 (4)	
Tabagismo (n(%))	5 (12)	0 (0)	0,07
HAS (n(%))	32 (78)	26 (93)	0,17
Diabetes mellitus (n(%))	17 (41)	15 (54)	0,33
Dislipidemia (n(%))	40 (98)	28 (100)	>0,99

Dados expressos em média ± desvio padrão ou em (n(%)). AE, angina não limitante; AR, angina refratária; HAS, hipertensão arterial sistêmica.

A Tabela 2 resume as características basais da população. Os grupos foram semelhantes quanto às condições clínicas associadas (acidente vascular cerebral prévio e doença vascular periférica). A fração de ejeção também foi semelhante entre os grupos. Na avaliação hemodinâmica, observa-se controle mais intensivo da frequência cardíaca no grupo AR, mas sem diferença no controle dos valores pressóricos. Percebe-se significativa diferença quanto a presença de IAM prévio (p≤0,001). Tanto o histórico de IAM quanto o número de eventos foram maiores no grupo AR. A realização de intervenção coronariana cirúrgica e/ou percutânea e o número de procedimentos foram significativamente maiores no grupo AR quando comparada ao grupo AE (p≤0,001). Ao analisar a complexidade coronariana pelo

Syntax escore I, nota-se dois grupos anatomicamente complexos, contudo, o grupo AR mostrou-se ser ainda mais grave (p=0,03).

Tabela 2 – Características basais dos grupos estudados.

	AE (n=41)	**AR (n=28)**	**Valor de p**
IMC (kg/m^2)	26,89±4,04	27,75±4,92	0,44
Pressão arterial (mmHg)			
Sistólica	132±27	124±24	0,78
Diastólica	74±13	73±11	0,62
Frequência Cardíaca (bpm)	71±12	65±8	0,01
Fração de ejeção média (%) *	50±13	52±12	0,53
Doença vascular periférica (n(%))	2 (5)	0 (0)	0,51
AVC prévio (n(%))	0 (0)	0 (0)	>0,99
IAM prévio (n(%))	21 (51)	22 (79)	0,02
Número de IAM	0,50±0,60	1,60±1,60	≤0,001
ICP prévia (n(%))	6 (15)	23 (82)	≤0,001
Número de ICP	0,10±0,30	2,0±2,2	≤0,001
CRM prévia (n(%))	1 (2)	23 (82)	0,001
Número de CRM	0,02±0,16	1,21±0,79	0,001
Média do Syntax escore I	30,30±12,40	36,90±12,10	0,03

Dados expressos em média ± desvio padrão ou em (n(%)). AE, angina não limitante; AR, angina refratária; AVC, acidente vascular cerebral; CRM, cirurgia de revascularização miocárdica; IAM, infarto agudo do miocárdio; ICP, intervenção coronária percutânea; IMC, índice de massa corporal * número total de pacientes do grupo AE com fração ejeção avaliada é de 31.

A Tabela 3 mostra a classificação de angina dos grupos e o tratamento medicamentoso utilizado. A maioria dos pacientes do grupo AE não apresentava sintomas, enquanto que a maior parte do grupo AR apresentava angina incapacitante para mínimos esforços. Não houve diferença na prescrição de antiplaquetários, estatinas, inibidores da enzima conversora de

angiotensina/bloqueadores do receptor de angiotensina 2, betabloqueadores, ranolazina e alopurinol. Porém, como esperado, houve significativamente maior uso de antianginosos, como nitratos de longa duração, trimetazidina e ivabradina no grupo AR.

Tabela 3. Classificação de angina e tratamento medicamentoso dos grupos estudados.

	AE (n=41)	**AR (n=28)**	**Valor de p**
Classificação CCS (n(%))			
0	24 (58)	0(0)	
I	17 (41)	0(0)	
II	0	17 (61)	
III	0	11 (39)	
Número de antianginosos	1,2±0,5	4,0±0,7	≤0,001
Medicamentos (n(%))			
BRA	14 (34)	9 (32)	>0,99
IECA	23 (56)	9 (32)	0,08
Betabloqueador	37 (90)	27 (96)	0,64
Anlodipino	7 (17)	25 (89)	≤0,001
Nitrato	4 (10)	26 (93)	≤0,001
Trimetazidina	1 (2)	26 (93)	≤0,001
Ivabradina	0 (0)	4 (14)	0,024
Alopurinol	0 (0)	2 (7)	0,161
Ranolazina	0 (0)	2 (7)	0,161
AAS	40 (98)	28 (100)	>0,99
Clopidogrel	10 (24)	6 (21)	>0,99

Dados expressos em média ± desvio padrão ou em (n(%)). AAS, ácido acetilsalicílico; AE, angina não limitante; AR, angina refratária; BRA, bloqueadores do receptor da angiotensina II; CCS, classificação de angina pela *Canadian Cardiology Society*; IECA, inibidores da enzima conversora de angiotensina.

Todas as determinações bioquímicas estão apresentadas na Tabela 4. Nota-se que não houve diferença entre os valores plasmáticos dos lípides e das apolipoproteínas entre os grupos estudados.

Tabela 4 – Determinações bioquímicas nos grupos estudados.

	AE (n=41)	**AR (n=28)**	**Valor de p**
Colesterol (mg/dL)			
Total	227±55	233±58	0,64
LDL	149±47	152±51	0,84
Não-HDL	184±54	189±58	0,70
HDL	43±10	44±11	0,67
Triglicérides (mg/dL)	177±101	182±111	0,84
Apolipoproteinas (g/L)			
A-I	1,33±0,20	1,35±0,20	0,64
B	1,18±0,33	1,21±0,33	0,76

Dados expressos em média ± desvio padrão. AE, angina não limitante; AR, angina refratária; LDL, lipoproteina de baixa densidade; HDL, lipoproteina de alta densidade.

As transferências de colesterol esterificado e não esterificado para a HDL em cada grupo do estudo estão descritas na Tabela 5. Os resultados obtidos não foram estatisticamente diferentes entre os grupos.

Tabela 5 – Transferência de lípides para a HDL nos grupos estudados.

	AE	**AR**	**Valor de p**
Colesterol esterificado (%)	3,84 ± 0,46	3,78 ± 0,61	0,69
Colesterol não esterificado (%)	4,94 ± 0,61	4,92 ± 0,70	0,91

Dados expressos em média±desvio padrão. AE, angina não limitante; AR, angina refratária; HDL, lipoproteína de alta densidade.

Ao analisar as medidas do diâmetro da partícula de HDL bem como a atividade antioxidativa pela avaliação da PON1 (Tabela 6), os resultados permanecem não significativos, e não mostram diferenças entre os grupos avaliados.

Tabela 6 – Diâmetro da HDL e atividade da PON1 nos grupos estudados.

	AE	**AR**	**Valor de p**
Diâmetro da HDL (nm)	9,07 ± 0,23	9,05 ± 0,32	0,81
Atividade da PON1 (U/L)	67,74 ± 38,87	65,07 ± 50,23	0,80

Dados expressos em média ± desvio padrão. AE, angina não limitante; AR, angina refratária; HDL, lipoproteína de alta densidade; PON1, paraoxonase 1.

As concentrações de LCAT e de CETP estão na Tabela 7. Como se pode observar, não houve diferença dessas variáveis entre os grupos.

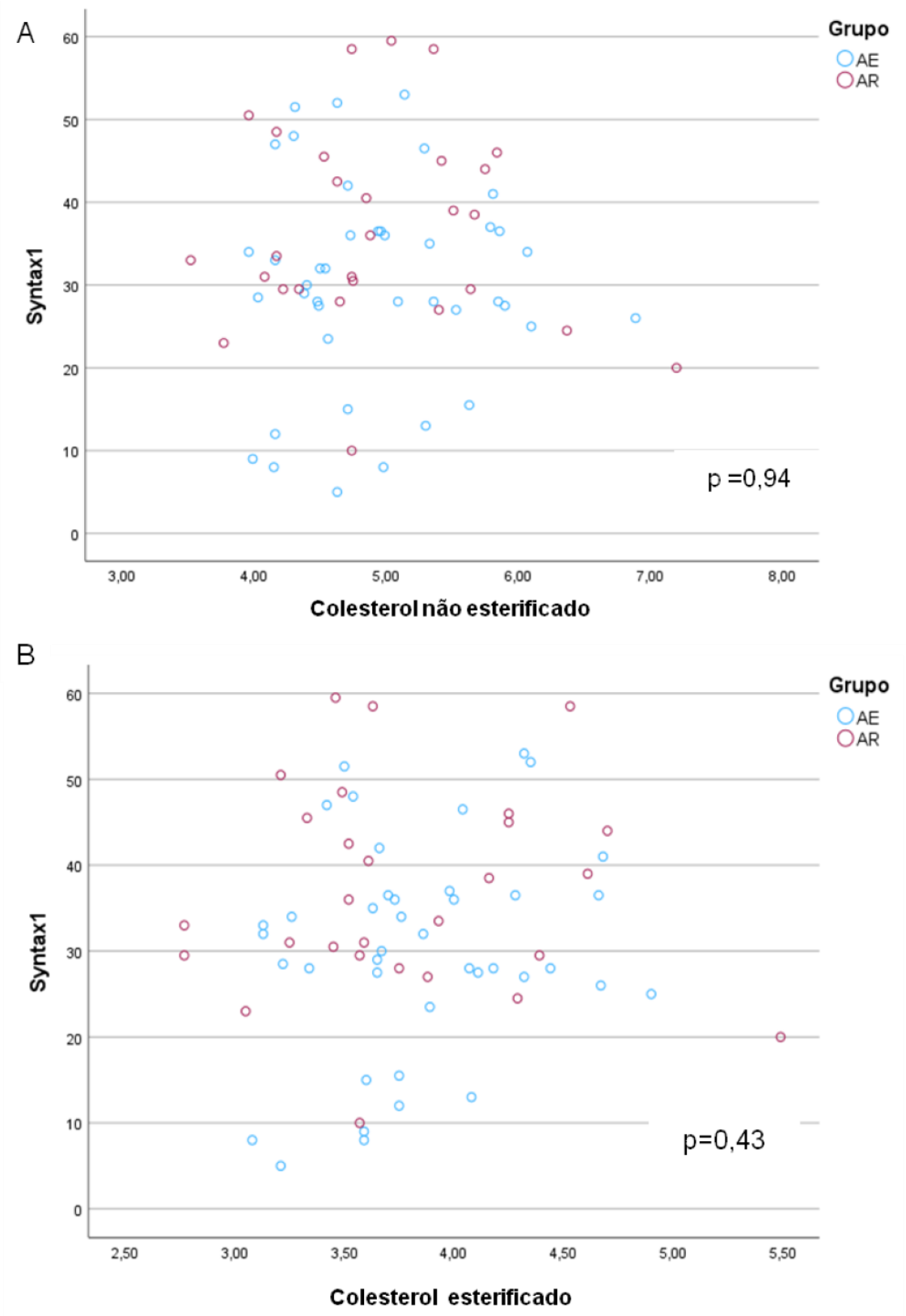
Tabela 7 – Concentração de LCAT e de CETP nos grupos estudados.

	AE	**AR**	**Valor de p**
LCAT (ug/mL)	46,59 ± 15,09	51,93 ± 19,26	0,20
CETP (ug/mL)	0,43 ± 0,20	0,44 ± 0,19	0,89

Dados expressos em média ± desvio padrão. AE, angina não limitante; AR, angina refratária; CETP, proteína de transferência de colesterol esterificado; LCAT, enzima lecitina-colesterol aciltransferase.

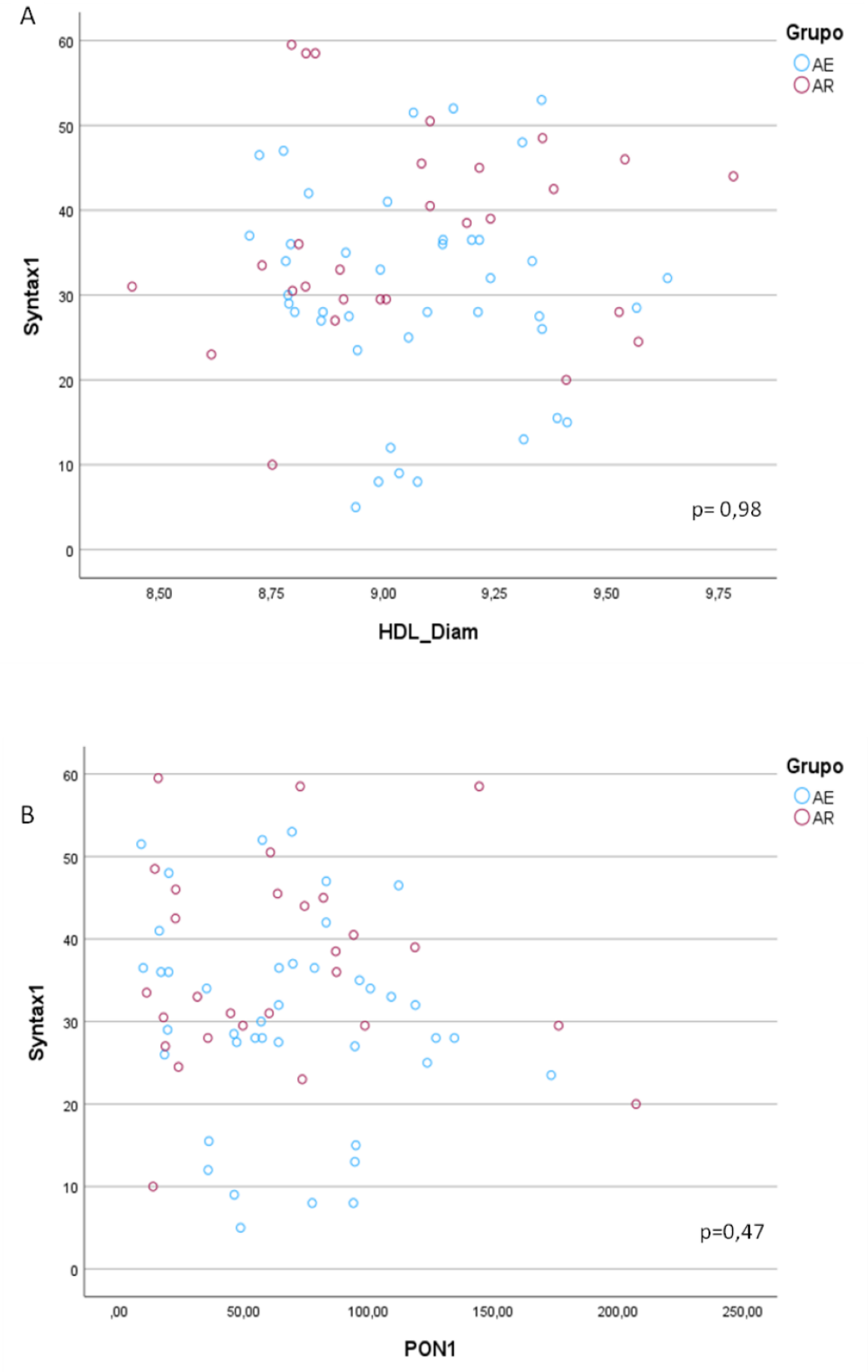
Ao realizar a análise de regressão linear entre Syntax escore I e as variáveis correspondentes à funcionalidade da HDL (transferências de colesterol, diâmetro da HDL e atividade da PON1), o resultado não demonstra relevância estatística. Mesmo explorando a relação intragrupo, o valor final de p permanece não significativo. As análises feitas com a população total estão ilustradas nas Figuras 5 e 6, que englobam os gráficos de dispersão.

Figura 5 – Correlação entre a transferência de colesterol não esterificado (A) e de colesterol esterificado (B) e o Syntax escore I.



AE, angina não limitante; AR: angina refratária.

Figura 6 – Correlação entre o diâmetro de HDL (A) e atividade de PON1 (B) e o Syntax escore I.



AE, angina não limitante; AR, angina refratária; HDL_Diam, diâmetro da HDL; PON1, paraoxonase 1.

Ao verificar a correlação entre as concentrações de LCAT e de CETP com a transferência de colesterol não esterificado e colesterol esterificado da nanopartícula para a HDL, os resultados se mantêm. Não há significância estatística, conforme os valores de p descritos na Tabela 8.

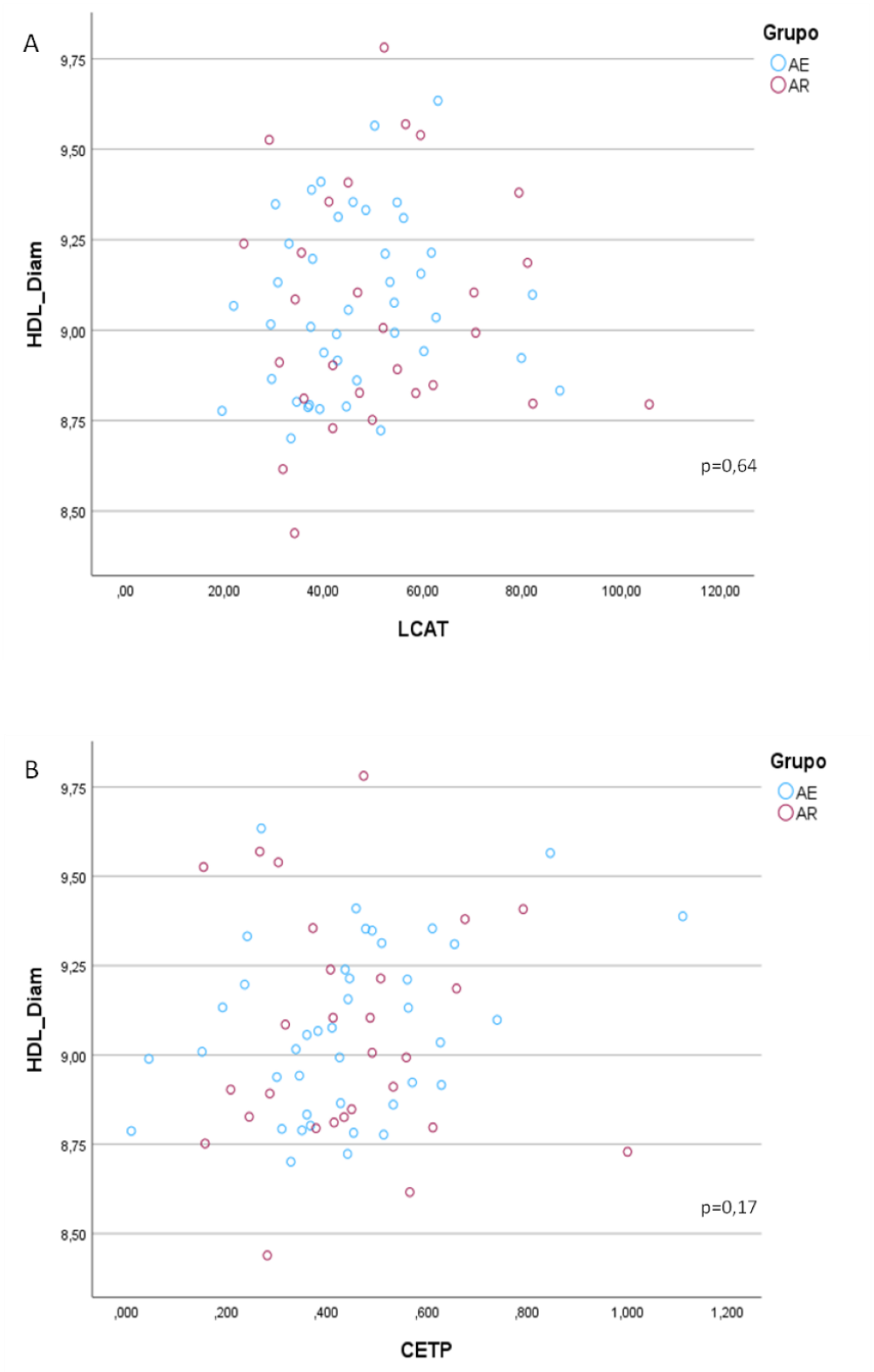
Tabela 8 – Correlação entre LCAT e CETP e transferência para a HDL nos grupos estudados.

		Transferência de colesterol não esterificado	**Transferência de colesterol esterificado**
LCAT (ug/mL)	p	0,616	0,430
	r^2	0,004	0,009
CETP (ug/mL)	p	0,616	0,578
	r^2	0,004	0,005

CETP, proteína de transferência de colesterol esterificado; LCAT, enzima lecitina-colesterol aciltransferase.

A correlação entre a concentração de LCAT e de CETP com o diâmetro médio da partícula de HDL está exposta na Figura 7. Não houve correlação estatisticamente significativa entre essas variáveis.

Figura 7 – Correlação entre a concentração de LCAT (A) e da CETP (B) e o diâmetro da HDL.



AE, angina não limitante; AR, angina refratária; CETP, proteína de transferência de colesterol esterificado; HDL_Diam, diâmetro da HDL; LCAT, enzima lecitina-colesterol aciltransferase.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Nosso estudo mostrou que a função da HDL, avaliada pelo seu diâmetro, atividade da PON1, concentração de LCAT e CETP e variáveis de transferência de colesterol, não se comportou como um marcador de risco para AR. Apesar dos nossos resultados, ainda assim, devemos enxergar a HDL como muito mais do que apenas um carreador de lípides. O estudo do metabolismo lipídico em pacientes com AR é pouco estudado, as referências são escassas e limitam-se quase exclusivamente às análises de Lp(a).

O perfil de pacientes desse trabalho condiz com a maior parte dos estudos que envolvem DAC: população masculina, branca e acima de 60 anos foi predominante. Como esperado, o grupo AR teve um comportamento mais difuso, mais complexo, e, portanto, mais agressivo da doença coronariana avaliado pelo Syntax escore I. [7,11] Seguindo o mesmo conceito, todos os pacientes do grupo AR tinham limitação funcional, estando a maioria com sintomas de angina para os mínimos esforços apesar do uso diário de pelo menos 4 diferentes classes de antianginosos. Os pacientes que integram o seleto grupo de refratários espelham, de fato, o pior extremo da SCC. Por outro lado, nos pacientes pertencentes ao grupo AE, as manifestações clínicas da DAC foram menos graves, pois não apresentavam limitações funcionais e faziam menor uso de medicamentos antianginosos.

É digno de nota que, embora os valores de LDL-c e não-HDL tenham sido iguais nos dois grupos, eles estavam acima das metas recomendadas para pacientes em prevenção cardiovascular secundária [69]. A interrupção do tratamento com estatinas por 30 dias antes da coleta de sangue foi necessária devido ao efeito geral das estatinas no metabolismo lipídico plasmático que poderia influenciar na precisão dos nossos resultados de transferência de colesterol. Não se espera que a retirada das estatinas por um período tão curto seja prejudicial para esses pacientes. Apenas 1 paciente do grupo AR relatou piora da angina durante o período de suspensão, mas isso não pôde ser atribuído somente à ausência da medicação. [29,30,63,64]

O fato dos valores de triglicerídeos e colesterol não-HDL também estarem acima das recomendações das Diretrizes de prevenção cardiovascular poderia

comprometer a análise funcional da partícula de HDL. No entanto, esses resultados não foram diferentes entre os grupos AE e AR, e, portanto, espera-se que as influências desses parâmetros tenham impactado igualmente os dois grupos de estudo.

Em relação ao HDL-c, biomarcador lipídico clássico e variável central neste estudo, os valores médios estavam dentro da faixa recomendada, mas é perceptível que os valores apresentaram grande desvio padrão, com muitos pacientes com HDL-c abaixo da faixa normal. Embora HDL-c mais baixo seja esperado em populações com DAC, é comum encontrar faixas normais em pequenas coortes de DAC. [29,30,64] Também é interessante que, apesar das diferenças na gravidade dos sintomas da doença e na complexidade coronariana, o HDL-c da AR não foi inferior ao do grupo AE. A esse respeito, nossos dados sugerem que o HDL-c, assim como o LDL-c, o não-HDL e os triglicerídeos, todos marcadores clássicos da presença de DAC, não são marcadores robustos de extensão de DAC em pequenas populações de estudo. [70-73]

A redução da transferência de colesterol da nanoemulsão doadora para a fração HDL, medida pelo ensaio *in vitro*, tem sido associada à presença de condições que predispõem à aterosclerose precoce e recorrente. [28-31] Partindo desse conceito e, entendendo que pacientes com AR estão sob maior risco, esse trabalho foi idealizado.

Maranhão e colaboradores avaliaram 30 pacientes, com menos de 50 anos e diagnóstico de DAC, e os compararam a 30 indivíduos saudáveis. Nesse trabalho, houve redução da transferência de colesterol não esterificado e triglicérides na população com DAC manifesta e, para os autores, esse resultado poderia colocar a funcionalidade da HDL como um possível novo marcador de risco no cenário da DAC precoce. [63] Seguindo o mesmo princípio, Martinez e colaboradores avaliaram pacientes com hipercolesterolemia familiar (HF). Vinte e sete pacientes com HF foram comparados à 66 indivíduos normolipêmicos. A transferência de colesterol não esterificado foi menor na população HF, fato esse que poderia contribuir com as alterações metabólicas que culminam com maior aterosclerose nessa população. [29]

Sprandel e colaboradores aplicaram a mesma técnica de transferência em pacientes diabéticos. Cerca de 80 pacientes com diabetes mellitus (DM) e DAC foram comparados a 76 pacientes diabéticos livres de doença coronariana. As transferências tanto de colesterol esterificado quanto não esterificado foram

menores no grupo com DAC e DM. [28] Para Tavoni e colaboradores, ao comparar 96 pacientes com DAC em relação a 132 pacientes com DM e DAC manifesta, as taxas de transferência de colesterol esterificado também foram reduzidas no grupo com DM e DAC. [64]

A funcionalidade da HDL também foi testada em pacientes pós-transplante cardíaco, já que há maior risco de doença aterosclerótica nesse cenário. Na transferência *in vitro*, quatro lipídios marcados para HDL foram alterados quando comparados aos participantes saudáveis. Foi demonstrado que, além desses pacientes possuírem um diâmetro menor da partícula, as transferências de colesterol esterificado e não esterificado também estavam reduzidas, fato que poderia explicar as frequentes alterações lipídicas em pacientes pós-transplante, incluindo a doença vascular do enxerto, importante causa de morte após o primeiro ano. [31] Esses resultados reiteram a importância do estudo dinâmico e sistemático do metabolismo da HDL, ao invés da pura determinação da sua concentração plasmática.

No presente estudo, a ausência de significância estatística na transferência de colesterol para HDL entre os grupos AE e AR provavelmente reflete o fato do processo aterosclerótico já estar instalado em todos os pacientes desde o início da análise. Nos estudos acima citados, todos os grupos que apresentaram comprometimento na transferência de colesterol haviam sido comparados com grupos sem doença aterosclerótica. Nesse sentido, uma vez estabelecida a doença coronariana obstrutiva, a função da partícula parece perder a influência sobre a progressão da aterosclerose para casos como a AR.

A correlação dos aspectos funcionais da HDL, elaborados nesse trabalho, com a complexidade anatômica coronariana ainda não havia sido estudada. Diante disso, esses dados foram avaliados juntos com a determinação do Syntax. A avaliação isolada do Syntax escore I aponta para dois grupos anatomicamente complexos. [74] Ainda assim, o grupo AR mostrou ser mais grave. Apesar de originalmente o Syntax ter sido desenhado e estudado com o objetivo de guiar a melhor intervenção em pacientes com lesão de tronco de coronária esquerda e/ou doença multiarterial, neste estudo ele foi utilizado para mensurar a complexidade anatômica dos grupos, já que não possuímos um escore específico que inclua todo o perfil da população desse trabalho, especialmente pacientes pós-revascularização cirúrgica. A falta de correlação, entre todas as variáveis acima citadas, sugere que a

presença de DAC anatomicamente complexa não esteve relacionada com a função da partícula de HDL.

O diâmetro da HDL é considerado um estratificador de risco melhor do que o HDL-c em pacientes com DAC. [75] Partindo desse conceito, há duas formas dessa análise ser feita com resultados, teoricamente, equivalentes. [76] De acordo com a espectroscopia por ressonância magnética, técnica proposta para quantificar as partículas de HDL e suas subpopulações, partículas de menor diâmetro tiveram forte associação inversa com morte cardiovascular e morte por todas as causas em pacientes com DAC e duas das explicações possíveis seriam a sua maior capacidade em receber o efluxo de colesterol dos macrófagos e a redução na oxidação da LDL. [75] A análise realizada por Duparc e colaboradores considerou, por esse mesmo método, que HDL entre 8,8-13nm eram de grande tamanho, enquanto que entre 7,3-8,7nm, de pequeno tamanho. Nesse mesmo estudo, a gravidade das lesões coronarianas foi inversamente relacionada à concentração de partículas de HDL. Em contrapartida, as HDL grandes não foram associadas a um pior desfecho, mas houve um movimento de maior mortalidade conforme o incremento no tamanho das partículas. [75] Outro estudo avaliou sistematicamente a composição da HDL e o diâmetro analisado por ressonância. Pacientes com diabetes [77,78] tiveram associação positiva com partículas pequenas, enquanto que a DAC foi inversamente associada às HDL de pequeno e médio tamanho. [77]

Por outro lado, trabalhos anteriores utilizando a mesma metodologia, demonstraram resultados diferentes. O primeiro grande estudo prospectivo publicado, com mais de 27 mil mulheres saudáveis, apontou para o seguinte resultado: partículas grandes de HDL tiveram associação inversa e significativa com o risco cardiovascular, enquanto que partículas pequenas não mostraram nenhuma relação causal. [79] Estudo desenvolvido por Rosenson e colaboradores, envolvendo pacientes com DAC em uso de pravastatina, reforçou esses resultados e sugeriu que HDL de grande tamanho foi, inclusive, inversamente relacionado à progressão de DAC. [80] O mesmo grupo já havia alertado que partículas menores de HDL poderiam se relacionar com a extensão da doença coronariana. [81] Para Harchaoui e colaboradores, o tamanho da HDL foi associado com o risco DCV, contudo essa associação foi influenciada por fatores relacionados à síndrome metabólica. [82]

O espalhamento dinâmico de luz é outra forma de avaliar o diâmetro da HDL e foi a técnica escolhida nesse trabalho por ser um ensaio mais fácil, barato e com

melhor potencial de aplicabilidade. Dados anteriores sugerem, com essa metodologia, que o tamanho médio da HDL é melhor preditor de aterosclerose subclínica em carótidas do que o próprio HDL-c [83] e valores de HDL >8,22 nm tiveram associação independente com baixo espessamento intimal. [83] Segundo Parra e colaboradores, a partir de uma amostra da população brasileira assintomática, tanto o tamanho quanto o volume do HDL-c variaram de acordo com sexo e idade. A mediana na população em prevenção primária foi de 7,82 nm, tendo as mulheres um tamanho médio superior ao dos homens. [83] Além disso, o tamanho da partícula aumentou conforme o incremento da idade e isso ocorreu independente do sexo. [83] O tamanho médio do diâmetro da HDL da população do Brasil é menor que a dos Estados Unidos, Reino Unido e Finlândia, e os dados do nosso presente estudo mostram valores acima da referência brasileira [76] e que seriam considerados partículas de grande tamanho pela maioria dos valores de corte das publicações. Partículas de maior tamanho tendem a captar melhor o colesterol não esterificado e o sexo feminino parece se beneficiar dessa propriedade, com tendência a um melhor TRC. [84] Essas partículas também aparentam maior ação antitrombótica e melhor ação vasomotora. Em contrapartida, partículas pequenas desempenham melhor a função anti-inflamatória e antioxidativa. [75,84] Em suma, a idade e o gênero do paciente podem interferir na avaliação final do diâmetro [84] e a classificação do que é considerado pequeno e grande também varia entre os estudos e/ou metodologia.

Alguns dos fatores que podem influenciar a função e o tamanho da partícula de HDL, incluindo a atividade e concentração da LCAT e da CETP, foram mensurados nesse trabalho. [83] Em um estudo envolvendo pacientes diabéticos, publicado por Cardner e colaboradores, o aumento da atividade da CETP provavelmente teve relação com a redução na quantidade de partículas de grande diâmetro, [77] justamente por reduzir o conteúdo de colesterol esterificado do núcleo ao trocá-lo por triglicérides das partículas ricas em triglicerídeos. Esses dados foram corroborados na análise feita por Parra e colaboradores, em que a atividade da CETP teve relação inversa com o tamanho da HDL. [83] Além do diâmetro, a CETP parece afetar a transferência de lípides, favorecendo a transferência de CE e triglicérides, conforme estudo publicado por Ribeiro e colaboradores. [85] Pacientes com doença arterial periférica e diabetes mostraram que a concentração de CETP teve correlação positiva e independente com a transferência de colesterol esterificado. [85]

No presente estudo, os valores de concentração de CETP não diferiram entre os grupos e não tiveram influência sobre o tamanho ou a função da partícula, avaliada pela transferência de colesterol.

Por agir na esterificação do colesterol, a LCAT tem grande influência no TRC e guarda relação direta com o remodelamento e tamanho das HDL. [86] Cerca de 75% da atividade plasmática da LCAT está associada à HDL. [87] A redução da captação de colesterol não esterificado advindo dos tecidos periféricos e da transferência de outras lipoproteínas para a HDL pode reduzir o processo de esterificação, interferindo diretamente no TRC. [63] A deficiência de LCAT é evento raro e somente poucos casos no mundo foram relatados. Nesses pacientes, os valores de HDL-c são extremamente baixos e, teoricamente, o risco cardiovascular, muito maior. Embora pareça óbvio, essa premissa ainda não está bem estabelecida. [87]

Em nosso estudo, a concentração de LCAT não foi diferente entre os grupos e, surpreendentemente, não se correlacionou com o diâmetro médio das partículas ou com a transferência de colesterol.

Avançar no entendimento do papel da PON1 a nível vascular é fundamental, bem como entender quais seriam as maneiras possíveis de modular sua atividade. [88] Há uma relação inversa, proposto por alguns estudos, entre a atividade da PON1 e o risco de DAC. Conforme experimentos em camundongos nocaute, a capacidade da HDL em impedir o acúmulo de peróxidos lipídicos é perdida na presença de inibidores da PON1, [40,89] ao passo que a superexpressão de PON1 os tornam menos susceptíveis ao aparecimento da aterosclerose. [90] Foi também demonstrada a contribuição da PON1 na menor absorção de LDL oxidada (LDLox) pelos macrófagos e aumento do efluxo de colesterol das células espumosas mediadas pela HDL. [39]

A PON1 é determinante para a capacidade antioxidativa da HDL e a redução da sua atividade poderia comprometer essa função. É conhecido que pacientes com DAC têm concentração e atividade da PON1 reduzidos em comparação com indivíduos sadios. Mackness e colaboradores, relacionaram a atividade sérica da PON1 à novos eventos coronarianos. Dos homens avaliados, os que se apresentaram com o maior valor de PON1 tiveram, consequentemente, cerca de 60% menos chances de evento coronariano futuro quando comparados com aqueles com menores valores de atividade da enzima. [91] Mas há indícios de que sejam ainda menores em pacientes com SCA quando comparados aos com SCC. [92]

Neste estudo, a atividade sérica da PON1 não diferiu entre os grupos e não mostrou ter influência na extensão da doença coronariana analisada pelo Syntax escore I.

6.1 Limitações

Esse projeto tem diversas limitações. Em se tratando de um estudo observacional, a análise não nos permite criar uma relação causal entre os resultados obtidos. Além disso, a população do estudo é bastante seleta, o número de pacientes disponíveis é substancialmente menor e as limitações funcionais impõem desafios para o recrutamento dos pacientes e participação no estudo.

Houve, também, dificuldade na avaliação do Syntax escore I em pacientes revascularizados cirurgicamente. Há como fazer o uso do Syntax residual em pacientes com intervenção coronária percutânea prévia, mas não cirúrgica. Tendo em vista que o acometimento aterosclerótico fazia parte do objetivo secundário, foi então optado por fazer a avaliação do Syntax I do vaso nativo. Após essa constatação, faz-se necessário a elaboração de um escore anatômico que possa refletir o acometimento aterosclerótico em pacientes já revascularizados cirurgicamente.

Respeitadas as nossas limitações e apesar do resultado não significativo, algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas. Há um grande número de variáveis que poderiam influenciar a transferência de colesterol e que não foram mensuradas, como: subfrações de HDL, LDL oxidado, proteína de transferência de fosfolipídios e outros componentes da lipidômica e proteômica da HDL, e que, de fato, poderiam fortalecer os resultados finais desse projeto.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados da investigação realizada, é possível concluir que não há diferença nos lipídeos plasmáticos e nos parâmetros relacionados ao metabolismo e funcionalidade da HDL, avaliados a partir da transferência de colesterol não esterificado e esterificado, atividade da PON1, diâmetro médio da partícula e concentração de LCAT e CETP, entre os grupos AE e AR.

O fato de os importantes aspectos funcionais da HDL aqui medidos, não terem sido diferentes na AR em comparação ao grupo AE estimula a busca por outros marcadores metabólicos que poderiam contribuir para o agravamento da doença coronariana e aparecimento do quadro clínico da AR.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas [1]

1. Dai H, et al. Global, regional, and national burden of ischaemic heart disease and its attributable risk factors, 1990-2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017. Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes. 2022 Jan;8(1):50-60. doi: 10.1093/ehjqcco/qcaa076.

2. Libby P. Inflammation during the life cycle of the atherosclerotic plaque. Cardiovasc Res. 2021 Nov;117(13):2525-36. doi: 10.1093/cvr/cvab303.

3. Tokgözoğlu L, Libby P. The dawn of a new era of targeted lipid-lowering therapies. Eur Heart J. 2022 Sep;43(34):3198-208. doi: 10.1093/eurheartj/ehab841.

4. Fan Y, et al. Comprehensive metabolomic characterization of coronary artery diseases. J Am Coll Cardiol. 2016 Sep;68(12):1281-93. doi: 10.1016/j.jacc.2016.06.044.

5. Writing Group Members, et al. Heart disease and stroke statistics - 2016 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2016 Jan;133(4):e38-360. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350.

6. Campeau L. Letter: Grading of angina pectoris. Circulation. 1976 Sep;54(3):522-3. doi: 10.1161/circ.54.3.947585Circulation. 1976;54:522–523.

7. Gowdak LHW. Living with pain. Heart Metab. 2017;72:2-3.

8. Huqi A, Marzilli M. Refractory angina or inappropriate antianginal therapy? Heart Metab. 2017;72:4-8.

9. McGilion M, et al. Management of patients with refractory angina: Canadian Cardiovascular Society/Canadian Pain Society joint guidelines. Can J Cardiol. 2012 Mar-Apr;28(2 Suppl):S20-41. doi: 10.1016/j.cjca.2011.07.007.

10. Mukherjee D, et al. Direct myocardial revascularization and angiogenesis—how many patients might be eligible? Am J Cardiol. 1999 Sep;84(5):598-600. doi: 10.1016/s0002-9149(99)00387-2.

11. Steg PG. Prognostic implications of refractory angina. Heart Metab. 2017;72:13-17.

[1] De acordo com: Estilo Vancouver, sistema numérico. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte IV (Vancouver) / Sistema Integrado de Bibliotecas da USP; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, coordenadora; Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro [et al.]. 3.ed. rev. ampl. mod. São Paulo: SIBi/USP, 2016. 100p. (Cadernos de estudos; 9). Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

12. Henry TD, et al. Long-term survival in patients with refractory angina. Eur Heart J. 2013 Sep;34(34):2683-8. doi: 10.1093/eurheartj/eht165.

13. Cavender MA, et al. Long-term morbidity and mortality among medically managed patients with angina and multivessel coronary artery disease. Am Heart J. 2009 Dec;158(6):933-40. doi: 10.1016/j.ahj.2009.10.013.

14. Mukherjee D, et al. Clinical outcome of a cohort of patients eligible for therapeutic angiogenesis or transmyocardial revascularization. Am Heart J. 2001 Jul;142(1):72-4. doi: 10.1067/mhj.2001.115786.

15. Williams B, et al. Patients with coronary artery disease not amenable to traditional revascularization: prevalence and 3-year mortality. Catheter Cardiovasc Interv. 2010 May;75(6):886-91. doi: 10.1002/ccd.22431.

16. Gowdak LH. Prevalence of refractory angina in clinical practice. Heart Metab. 2017;72:9-12.

17. Povsic TJ, et al. Predictors of long-term clinical endopoints in patients with refractory angina. J Am Heart Assoc. 2015 Jan;4(2):e001287. doi: 10.1161/JAHA.114.001287.

18. Davidson MH. Reducing residual cardiovascular risk with novel therapies. Curr Opin Lipidol. 2020 Apr;31(2):108-10. doi: 10.1097/MOL.0000000000000672.

19. Knuuti J, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. Eur Heart J. 2020 Jan;41(3):407-77. doi: 10.1093/eurheartj/ehz425.

20. Anderson TJ, et al. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. New Engl J Med.1995;332:488-93. doi: 10.1056/NEJM199502233320802.

21. Gordon BR, Saal SD. Low-density lipoprotein apheresis using the Liposorber dextran sulfate celulose system for patients with hypercholesterolemia refractory to medical therapy. J Clin Apher. 1996;11(3):128-31. doi: 10.1002/(SICI)1098-1101(1996)11:3<128::AID-JCA2>3.0.CO;2-D.

22. Sachais BS, et al. Long term effects of LDL apheresis in patients with severe hypercholesterolemia. J Clin Apher.2005 Dec;20(4):252-5. doi: 10.1002/jca.20036.

23. Stefanutti C, Di Giacomo S, Morozzi C. LDL apheresis: an update and overview. LDL apheresis in Sardinia, Italy (SMILDLa). G Ital Nefrol. 2012 Jan-Feb;29 Suppl 54:S14-8. PMID: 22388823.

24. Schaefer EL, et al. Lipoprotein(a) levels and risk of coronary heart disease in men. J Am Med Assoc. 1994 Apr;271:999-1003. doi: 10.1001/jama.1994.03510370051031.

25. Bambauer R, Schneidewind JM, Latza R. Apheresis technologies for prevention and regression of atherosclerosis: clinical results ASAIO J.1999 Sep-Oct;45(5):403-7. PMID: 10503615.

26. Viney NJ, et al. Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials. Lancet. 2016 Nov;388(10057):2239-2253. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31009-1.

27. Cesar LA, et al. Guideline for stable coronary artery disease. Arq Bras Cardiol. 2014 Aug;103(2 Suppl 2):1-56. doi: 10.5935/abc.2014s004.

28. Sprandel MCO, et al. Alterations in lipid transfers to HDL associated with the presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. Cardiovasc Diabetol. 2015 Aug;14:107. doi: 10.1186/s12933-015-0270-8.

29. Martinez LRC, et al. Transfer of lipids to high-density lipoprotein (HDL) is altered in patients with familial hypercholesterolemia. Metabolism. 2013 Aug;62(8):1061-4. doi: 10.1016/j.metabol.2013.02.008.

30. Lo Prete AC, et al. In vitro simultaneous transfer of lipid to HDL in coronary artery disease and in statin treatment. Lipids. 2009 Oct;44(10):917-24. doi: 10.1007/s11745-009-3342-2.

31. Puk CG, et al. Transfer of cholesterol and other lipids from a lipid nanoemulsion to high-density lipoprotein in heart transplant patients. J Heart Lung Transplant. 2009 Oct;28(10):1075-80. doi: 10.1016/j.healun.2009.05.024.

32. Grobe SF, Gowdak LHW. HDL: progresso como alvo terapêutico e esperança além da LDL. In: Sociedade Brasileira de Cardiologia, organizadores. PROCARDIOL Programa de Atualização em Cardiologia: Ciclo 16. Porto Alegre: Artmed Panamericana; 2022.p.73-92. doi.org/10.5935/978-65-5848-624-4.C0005.

33. Liu H, et al. High-density lipoprotein cholesterol levels are associated with coronary severity but not with outcomes in new-onset patients with stable coronary artery disease. Atherosclerosis 2017 Aug;263:104-11. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.013.

34. Barter PJ, Rye KA. Targeting high-density lipoproteins to reduce cardiovascular risk: what is the evidence? Clin Ther 2015 Dec;37(12):2716-31. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.07.021.

35. Leança CC, et al. HDL: o yin-yang da doença cardiovascular. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2010 Dec;54(9):777-84. doi: 10.1590/s0004-27302010000900002.

36. Rader DJ. High-density lipoproteins and atherosclerosis. Am J Cardiol. 2002 Oct;90(8A):62i-70i. doi: 10.1016/s0002-9149(02)02635-8.

37. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. Circ Res. 2005 Jun;96(12):1221-32. doi: 10.1161/01.RES.0000170946.56981.5c.

38. Maranhão RC, Freitas FR. HDL metabolism and atheroprotection: predictive value of lipid transfers. Adv Clin Chem. 2014;65:1-41. doi: 10.1016/B978-0-12-800141-7.00001-2.

39. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. Free Radic Biol Med. 2004 Nov;37(9):1304-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.030. PMID: 15454271.

40. Ben-Aicha S, Badimon L, Vilahur G. Advances in HDL: Much More than Lipid Transporters. Int J Mol Sci. 2020 Jan;21(3):732. doi: 10.3390/ijms21030732.

41. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. FEBS Lett. 1991 Jul;286(1-2):152-4. doi: 10.1016/0014-5793(91)80962-3.

42. Lima ES, Couto RD. Structure, metabolism and physiologic functions of high-density lipoproteins. J Bras Patol Med Lab. 2006 Jun;42(3):169-78. doi: 10.1590/S1676-24442006000300005.

43. Barter PJ, et al. Anti-inflammatory properties of HDL. Circ Res. 2004 Oct;95(8):764-72. doi: 10.1161/01.RES.0000146094.59640.13.

44. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. J Clin Invest. 1992 Sep;90(3):1138-44. doi: 10.1172/JCI115932.

45. Mineo C, et al. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. Circ Res. 2006 Jun;98(11):1352-64. doi: 10.1161/01.RES.0000225982.01988.93.

46. Barter PJ, Rye KA. Targeting high-density lipoproteins to reduce cardiovascular risk: what is the evidence? Clin Ther. 2015 Dec;37(12):2716-31. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.07.021.

47. Nissen SE, et al. Effect of recombinant Apo A-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. JAMA. 2003 Nov;290(17):2292-300. doi: 10.1001/jama.290.17.2292.

48. Smith JD. Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis. Curr Opin Investig Drugs. 2010 Sep;11(9):989-96.

49. Genest J Jr, et al. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. Arterioscler Thromb. 1993 Dec;13(12):1728-37. doi: 10.1161/01.atv.13.12.1728.

50. Gordon T, et al. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. Am J Med. 1977 May;62(5):707-14. doi: 10.1016/0002-9343(77)90874-9.

51. Ahmed HM, et al. Primary low level of high-density lipoprotein cholesterol and risks of coronary heart disease, cardiovascular disease, and death: Results from the multi-ethnic study of atherosclerosis. Am J Epidemiol. 2016 May;183(10):875-83. doi: 10.1093/aje/kwv305.

52. Ko DT, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cause-specific mortality in individuals without previous cardiovascular conditions: The CANHEART Study. J Am Coll Cardiol 2016 Nov;68(19):2073-83. doi: 10.1016/j.jacc.2016.08.038.

53. Silbernagel G, et al. High-density lipoprotein cholesterol, coronary artery disease, and cardiovascular mortality. Eur Heart J. 2013 Dec;34(46):3563-71. doi: 10.1093/eurheartj/eht343.

54. Kuivenhoven JA, Groen AK. Beyond the genetics of HDL: why is HDL cholesterol inversely related to cardiovascular disease? Handb Exp Pharmacol. 2015;224:285-300. doi: 10.1007/978-3-319-09665-0_8.

55. Ahmadzadeh A, Azizi F. Genes associated with low serum high-density lipoprotein cholesterol. Arch Iran Med. 2014 Jun;17(6):444-50. PMID: 24916532.

56. Brunham LR, Hayden MR. Human genetics of HDL: Insight into particle metabolism and function. Prog Lipid Res. 2015 Apr;58:14-25. doi: 10.1016/j.plipres.2015.01.001.

57. Landmesser U, Hazen S. HDL-cholesterol, genetics, and coronary artery disease: the myth of the 'good cholesterol'? Eur Heart J. 2018 Jun;39(23):2179-2182. doi: 10.1093/eurheartj/ehy299.

58. Liu C, et al. Association between high-density lipoprotein cholesterol levels and adverse cardiovascular outcomes in high-risk populations. JAMA Cardiol. 2022 Jul;7(7):672-80. doi: 10.1001/jamacardio.2022.0912.

59. Verdoia M, et al. Effects of HDL-modifiers on cardiovascular outcomes: A meta-analysis of randomized trials. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2015 Jan;25(1):9-23. doi: 10.1016/j.numecd.2014.09.003.

60. REVEAL Collaborative Group, et al. Randomized evaluation of the effects of anacetrapib through lipid-modification (REVEAL) - A large-scale, randomized, placebo-controlled trial of the clinical effects of anacetrapib among people with established vascular disease: Trial design, recruitment, and baseline characteristics. Am Heart J. 2017 May;187:182-90. doi: 10.1016/j.ahj.2017.02.021.

61. Lincoff AM, et al. Evacetrapib and cardiovascular outcomes in high-risk vascular disease. N Engl J Med 2017 May;376(20):1933-42. doi: 10.1056/NEJMoa1609581.

62. Goldenberg I, et al. Relation of clinical benefit of raising high-density lipoprotein cholesterol to serum levels of low-density lipoprotein cholesterol in patients with coronary heart disease (from the Bezafibrate Infarction Prevention Trial). Am J Cardiol, 2009 Jan;103(1):41-5. doi: 10.1016/j.amjcard.2008.08.033.

63. Maranhão RC, et al. Lipid transfers to HDL are predictors of precocious clinical coronary heart disease. Clin Chim Acta. 2012 Feb;413(3-4):502-5. doi: 10.1016/j.cca.2011.11.011.

64. Tavoni TM, et al. Lipid transfer to HDL, CETP and HDL composition in coronary artery disease patients with or without type 2 diabetes mellitus. Eur J Prev Cardiol. 2020 Dec;27(19):2223-2225. doi: 10.1177/2047487319880364.

65. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972 Jun;18(6):499-502. PMID: 4337382.

66. Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. J Biol Chem. 1982 Jul;257(14):8216-27.

67. Maranhão RC, et al. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. Lipids. 1993 Aug;28(8):691-6. doi: 10.1007/BF02535988.

68. Lima E, Maranhão R. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. Clin Chem. 2004 Jun;50(6):1086-8. doi: 10.1373/clinchem.2004.032383.

69. Faludi AA, et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. Arq Bras Cardiol. 2017 Jul;109(2 Supl 1):1-76. doi: 10.5935/abc.20170121.

70. Chaudhary R, et al. HDL_3-C is a Marker of Coronary Artery Disease Severity and Inflammation in Patients on Statin Therapy. Cardiovasc Revasc Med. 2019 Nov;20(11):1001-06. doi: 10.1016/j.carrev.2018.12.019.

71. Garfagnini A, et al. Relationship between HDL-cholesterol and apolipoprotein A1 and the severity of coronary artery disease. Eur Heart J. 1995 Apr;16(4):465-70. doi: 10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a060937.

72. Kurmus O, et al. Discordance of Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol and Coronary Artery Disease Severity. Arq Bras Cardiol. 2020 Mar;114(3):469-475. doi: 10.36660/abc.20190091.

73. Gao P, et al. Which one of LDL-C /HDL-C ratio and non-HDL-C can better predict the severity of coronary artery disease in STEMI patients. BMC Cardiovasc Disord. 2022 Jul 17;22(1):318. doi: 10.1186/s12872-022-02760-0.

74. Serruys PW, et al. Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting for severe coronary artery disease. N Engl J Med. 2009 Mar;360(10):961-72. doi: 10.1056/NEJMoa0804626.

75. Duparc T, et al. Serum level of HDL particles are independently associated with long-term prognosis in patients with coronary artery disease: The GENES study. Sci Rep. 2020 May 18;10(1):8138. doi: 10.1038/s41598-020-65100-2.

76. Alexandre F, et al. Reference values for high-density lipoprotein particle size and volume by dynamic light scattering in a Brazilian population sample and their relationships with metabolic parameters. Clin Chim Acta. 2015 Mar;442:63-72. doi: 10.1016/j.cca.2015.01.006.

77. Cardner M, et al. Structure-function relationships of HDL in diabetes and coronary heart disease. JCI Insight. 2020 Jan;5(1):e131491. doi: 10.1172/jci.insight.131491.

78. Mora S, et al. Lipoprotein particle size and concentration by nuclear magnetic resonance and incident type 2 diabetes in women. Diabetes. 2010 May;59(5):1153-60. doi: 10.2337/db09-1114.

79. Mora S, et al. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. Circulation. 2009 Feb;119(7):931-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816181.

80. 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 Jul 15;90(2):89-94. doi: 10.1016/s0002-9149(02)02427-x.

81. Freedman DS, et al. Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998 Jul;18(7):1046-53. doi: 10.1161/01.atv.18.7.1046.

82. El Harchaoui K, et al. High-density lipoprotein particle size and concentration and coronary risk. Ann Intern Med. 2009 Jan;150(2):84-93. doi: 10.7326/0003-4819-150-2-200901200-00006.

83. Parra ES, et al. HDL size is more accurate than HDL cholesterol to predict carotid subclinical atherosclerosis in individuals classified as low cardiovascular risk. PLoS One. 2014 Dec;9(12):e114212. doi: 10.1371/journal.pone.0114212.

84. Sposito AC. HDL metrics, let’s call the number thing off? Atherosclerosis. 2016 Aug, 251, 525–7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.044.

85. de Macedo Ribeiro FRC, et al. Disturbances of the transfer of cholesterol to high-density lipoprotein (HDL) in patients with peripheral artery disease with or without type 2 diabetes mellitus. Vasc Med. 2021 Dec;26(6):602-607. doi: 10.1177/1358863X211021142.

86. Cavigiolio G, et al. The interplay between size, morphology, stability, and functionality of high-density lipoprotein subclasses. Biochemistry. 2008 Apr 22;47(16):4770-9. doi: 10.1021/bi7023354.

87. Savel J, et al. Very low levels of HDL cholesterol and atherosclerosis, a variable relationship--a review of LCAT deficiency. Vasc Health Risk Manag. 2012;8:357-61. doi: 10.2147/VHRM.S29985.

88. 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. doi: 10.2165/00129784-200404040-00002.

89. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Lack of protection against oxidative modification of LDL by avian HDL. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jun 18;247(2):443-6. doi: 10.1006/bbrc.1998.8803.

90. Tward A, et al. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. Circulation. 2002 Jul 23;106(4):484-90. doi: 10.1161/01.cir.0000023623.87083.4f.

91. Mackness B, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. Circulation. 2003 Jun 10;107(22):2775-9. doi: 10.1161/01.CIR.0000070954.00271.13.

92. Carnuta MG, et al. Dysfunctional high-density lipoproteins have distinct composition, diminished anti-inflammatory potential and discriminate acute coronary syndrome from stable coronary artery disease patients. Sci Rep. 2017 Aug 4;7(1):7295. doi: 10.1038/s41598-017-07821-5.