



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
FACULDADE DE MEDICINA  
INSTITUTO DO CORAÇÃO EDSON SAAD

**JULIANA DUARTE LOPES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E DAS CÉLULAS PROGENITORAS  
ENDOTELIAIS EM PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA GRAVE**

Rio de Janeiro  
2015

**Juliana Duarte Lopes da Silva**

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E DAS CÉLULAS PROGENITORAS  
ENDOTELIAIS EM PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA GRAVE**

Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina (Cardiologia) do Departamento de Cardiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Título de Mestre em Ciências Cardiovasculares.

Orientadores: Dra. Andrea Rocha de Lorenzo  
Dra. Annie Seixas Bello de Moreira

Rio de Janeiro  
2015

Silva, Juliana Duarte Lopes da

Avaliação da Função Endotelial e das Células Progenitoras Endoteliais em pacientes com hipercolesterolemia grave/ Juliana Duarte Lopes da Silva. Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2015.

XiV, 71f. il. ; 31 cm.

Orientadores: Andrea Rocha de Lorenzo e Annie Seixas Bello de Moreira  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro,  
Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina  
(Cardiologia), 2015.

Referências bibliográficas: f.59.

1. Hipercolesterolemia Grave. 2. Hipercolesterolemia Familiar. 3. Função Endotelial. 4. Células Progenitoras Endoteliais. 5. Cardiologia -  
Dissertação I. Lorenzo, Andrea Rocha de II. Moreira, Annie Seixas Bello de.  
III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Pós-  
Graduação em Medicina (Cardiologia). IV. Título.

**Juliana Duarte Lopes da Silva**

**AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E DAS CÉLULAS PROGENITORAS  
ENDOTELIAIS EM PACIENTES COM HIPERCOLESTEROLEMIA GRAVE**

Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina (Cardiologia) do Departamento de Cardiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Título de Mestre em Ciências Cardiovasculares.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

---

Presidente, Prof. Dra. Glaucia Maria Moraes de Oliveira  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dra. Glorimar Rosa  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Profa. Dra. Márcia Regina Simas Torres Klein  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

## AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus caminhos e ter me permitido chegar até aqui.

Ao meu pai (*in memoriam*) por ser exemplo de superação e sempre me incentivar a aprender mais. Tenho certeza que se estivesse aqui, vibraria com mais essa conquista.

À minha mãe Maria Aparecida e minha irmã Fernanda Duarte por sempre estarem por perto e por todo o apoio em mais essa etapa e à minha afilhada Manuela Duarte por ser tão perfeita e conseguir me alegrar em momentos difíceis.

A todos os meus amigos de longe e de perto pelo carinho, amizade, apoio e por terem compreendido minha ausência em tantos momentos.

À amiga Mariana Castilhos que me estimulou a iniciar o mestrado.

À todos os amigos do mestrado, em especial Mariana, Elizabeth, Carolina e Adriana, por todo o apoio durante esse percurso.

Às minhas queridas orientadoras Annie e Andrea pela confiança, apoio, disponibilidade e todo o aprendizado durante esses dois anos.

Às professoras componentes da banca por aceitarem o convite de participar e contribuírem enormemente para a finalização deste trabalho.

Aos colaboradores do projeto:

Lidiane Cezário, estagiária de iniciação científica que contribui enormemente para a realização do trabalho, superando toda a dedicação e comprometimento esperado. Acompanhou de perto as dificuldades e sempre fez mais do que o necessário para o bom andamento do trabalho. Obrigada pela força e por todo carinho com essa pesquisa e comigo.

Ao professor Eduardo Tibiriçá que disponibilizou seu laboratório e seu conhecimento para essa pesquisa.

Ao Márcio Gonzales, por todo o suporte técnico e por sempre alegrar o ambiente de trabalho com seu bom humor.

À Fabiana Muccilo pelo apoio em toda a realização de quantificação das CPE desde a escolha do método até a realização final. Por sempre esclarecer minhas dúvidas e passar tranquilidade.

À Grazielle Huguenin que me ajudou em todas as análises laboratoriais, por sua paciência e dedicação.

À Ana Catarina por ser sempre tão solícita para auxiliar qualquer tipo de questão.

Aos docentes da Cardiologia que contribuíram de forma significativa para minha formação.

Ao Mario Luiz Tosta da Silva que sempre me auxiliou durante todo esse percurso nas questões burocráticas do curso.

A todos os pacientes que confiaram no nosso trabalho e aceitaram participar da pesquisa.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas do Instituto Nacional de Cardiologia, pela realização das análises de rotina. Aos funcionários do INC que contribuíram de alguma forma para esse trabalho.

À CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro a este projeto.

## RESUMO

Silva, Juliana Duarte Lopes. **Avaliação da função endotelial e das células progenitoras endoteliais, em pacientes com Hipercolesterolemia Grave.** Rio de Janeiro, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Cardiovasculares) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

**Objetivos:** Avaliar a função endotelial microvascular e as células progenitoras endoteliais de pacientes com hipercolesterolemia grave, identificar pacientes com diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar Heterozigótica e comparar parâmetros clínicos e funcionais entre os grupos. **Métodos:** Estudo transversal de pacientes com níveis de LDL-c  $\geq 190$ mg/dL e histórico pessoal ou familiar de hipercolesterolemia e/ou doença cardiovascular. Os critérios clínicos para diagnóstico de HF descritos na I Diretriz Brasileira de HF foram utilizados para definição do grupo com diagnóstico definitivo de HF (Grupo HF) e grupo com diagnóstico possível ou provável de HF (Grupo SD). Foi aplicado um questionário padronizado para obtenção de informações clínicas. A função endotelial microvascular foi avaliada com o sistema de fluxometria Laser Speckle Contrast Imaging durante o teste de hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) e iontoforese com acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS).

A quantificação de células progenitoras endoteliais (CPE) do sangue periférico foi realizada através da citometria de fluxo. Também foram realizadas análises bioquímicas, medidas antropométricas e avaliação por Bioimpedância Elétrica. Os dados foram analisados através do software IBM® SPSS® *Statistics* versão 21.

**Resultados:** Foram avaliados 54 pacientes de ambos os sexos (72,2% mulheres) com idade média de  $54,24 \pm 12,93$  anos. A comorbidade mais prevalente foi a hipertensão (64,8%), seguida da Diabetes Mellitus (24,1%). Quinze pacientes possuíam diagnóstico definitivo de HF. Foi observada uma associação direta entre os níveis de CPE e a concentração plasmática de HDL-c e Apo-A1 e uma relação inversa entre os níveis de CPE e a concentração plasmática de triglicerídeos. Foi observada uma relação direta entre a pontuação do escore de diagnóstico da HF e a área sob a curva da vasodilatação induzida por Ach. Na estratificação entre os grupos foram observados maiores níveis de LDL-c ( $p=0,01$ ) e Apolipoproteína B ( $p=0,01$ ) no grupo HF, e maior prevalência de revascularização do miocárdio ( $p=0,04$ ). Foi observada uma tendência a redução da área sob a curva da vasodilatação induzida por ACh nos pacientes HF, entretanto não foi estatisticamente significativa ( $p=0,07$ ). Não foram encontradas diferenças na quantidade de CPE entre os grupos.

**Conclusão:** Os níveis de HDL-c e Apolipoproteína A1 parecem estar diretamente associados com os níveis de CPE. A pontuação do escore de diagnóstico da HF baseado no histórico clínico e familiar dos indivíduos se relacionou inversamente com a área sob a curva da vasodilatação induzida por Ach. Entre os pacientes avaliados, 15 possuíam diagnóstico clínico de HF e foi observada uma tendência à diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio nestes indivíduos. Não houve diferença significativa na quantificação de CPE entre os grupos. Os resultados sugerem que a resposta vasodilatadora e o número de CPE são similares em pacientes com hipercolesterolemia grave independente da causa.

**Palavras-chave:** Hipercolesterolemia Grave, Hipercolesterolemia Familiar, Função Endotelial, Células Progenitoras Endoteliais

## ABSTRACT

Silva, Juliana Duarte Lopes **Evaluation of endothelial function and endothelial progenitor cells in patients with severe hypercholesterolemia.**

Rio de Janeiro, 2015. Dissertation (Master's degree in Cardiology) - Medical School, Federal University of Rio de Janeiro, 2015.

**Objective:** To evaluate endothelial function and endothelial progenitor cells (EPC) in patients with severe hypercholesterolemia, identify patients with clinical diagnosis of Familial Hypercholesterolemia Heterozygous and compare clinical and functional parameters between groups.

**Methods:** This was a cross-sectional study of patients with LDL-c $\geq$ 190mg/dL and a history of cardiovascular disease or family history of cardiovascular disease. Clinical criteria for FH described in the I Brazilian Guidelines for FH were used to define a group with definitive FH (HF group) or with possible/probable FH (group SD). A standardized questionnaire was used to obtain clinical information. Microvascular function was evaluated with the *Laser Speckle Contrast Imaging* system during post-occlusive reactive hyperemia testing (PORH) as well as iontophoresis with acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (NPS). Quantification of EPC from peripheral blood was performed with flow cytometry. Biochemical, anthropometric and bioelectrical impedance analyses were also performed. Data were analyzed with IBM® SPSS® *Statistics software* version 21

**Results:** Fifty-four patients from both genders were evaluated (72.2% women), with mean age of 54,24 $\pm$ 12,93 years. The most frequent comorbidity was hypertension (64,8%), followed by diabetes mellitus (24,1%). Fifteen patients had a definitive diagnosis of FH. A direct association between EPC levels and plasma HDL-C and Apo-A1 and an inverse relationship between EPC levels and the plasma concentration of triglycerides was observed. A direct relationship between the score of the HF diagnosis score and the area under the curve of the vasodilation induced by ACh was observed. In the comparison between groups, there were higher levels of LDL-c (p=0.01) and apolipoprotein B (p=0.01) in group FH, as well as a higher prevalence of myocardial revascularization (p=0.04). There was a trend towards a reduction of the area under the curve of the ACh-induced vasodilatation in FH patients, which was not statistically significant, though. There was also no difference in EPC number between the groups. **Conclusion:** HDL-C levels and apolipoprotein A1 appear to be directly associated with the CPE levels. The HF diagnostic score based on the clinical and family history individuals was inversely related to the area under the curve for ACh-induced vasodilation. Among the patients, 15 had a clinical diagnosis of HF and had tendency towards decreased endothelium-dependent vasodilation. There was no significant difference in the quantification of EPC between groups. The results suggest that the vasodilator response and the number of EPC are similar in patients with severe hypercholesterolemia regardless of its the cause.

**Keywords:** Severe hypercholesterolemia; Familial hypercholesterolemia; endothelial function; endothelial progenitor cells.



## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1: Fluxograma da pesquisa.	34
Figura 2: O sistema de fluxometria Laser Speckle	41
Figura 3: Fluxograma de Seleção dos pacientes	43
Figura 4: Área sob a curva da resposta vasodilatadora induzida por estímulo farmacológico com acetilcolina e nitroprussiato de sódio	52

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Critérios diagnósticos da Hipercolesterolemia Familiar	36
Tabela 2: Dados demográficos e características clínicas	44
Tabela 3: Medicações utilizadas pelos pacientes no momento da consulta.	46
Tabela 4 : Vasodilatação máxima pelo estímulo da iontoforese com acetilcolina, nitroprussiato de sódio e hiperemia reativa pós oclusiva e área sob a curva da vasodilatação induzida por acetilcolina e nitroprussiato de sódio.	47
Tabela 5: Correlações entre os parâmetros de função endotelial e variáveis clínicas	48
Tabela 6: Correlações entre o número de células progenitoras endoteliais e variáveis clínicas	49
Tabela 7: Dados demográficos e características clínicas, bioquímicas, antropométricas e de composição corporal dos indivíduos com diagnóstico clínico de HF e sem diagnóstico.	50
Tabela 8: Vasodilatação máxima pelo estímulo da iontoforese com acetilcolina, nitroprussiato de sódio e hiperemia reativa pós oclusiva e área sob a curva da vasodilatação induzida por acetilcolina e nitroprussiato de sódio.	51
Tabela 9: Quantificação de Células Progenitoras Endoteliais.	52

## **LISTA DE ANEXOS**

ANEXO I- Questionário padronizado.

ANEXO II- Folha de resultados bioimpedância elétrica

ANEXO III- Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO IV Termo de consentimento livre e esclarecido.

ANEXO V- Produção científica.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ACh	Acetilcolina
Apo A-1	Apolipoproteína A-1
Apo B	Apolipoproteína B
AUC	Área sob a curva
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cm	Centímetro
CPE	Células Progenitoras Endoteliais
CVC	Condutância vascular cutânea
CRVM	Cirurgia de revascularização do miocárdio
CT	Colesterol Total
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
DFM	Dilatação fluxo-mediada da artéria braquial
DLCN	Dutch Lipid Clinic Network
DM	Diabetes Mellitus
DP	Desvio Padrão
eNos	Óxido nítrico sintase endotelial
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HAS	Hipertensão
HDL-c	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HRPO	Hiperemia reativa pós-oclusiva
IAM	Infarto agudo do Miocárdio
IMC	Índice de massa corporal
INC	Instituto Nacional de Cardiologia
kg	Quilograma
LDL-c	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LDL-r	Receptor de LDL-c
LOX-1	Receptor de LDL-oxidada
LSCI	Laser Speckle Contrast Imaging
mcL	Microlitro
mg	Miligrama
mm Hg	Milímetros de mercúrio
NPS	Nitroprussiato de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PC	Perímetro da cintura
PCSK 9	Pró-proteína convertase subutilisina/kexina tipo 9
SPSS	Statistical Package Social Sciences
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UAP	Unidades arbitrárias de perfusão
MEDPED	Make Early Diagnosis Prevent Early Death Program

## Sumário

1-Introdução: .....	15
2-Referencial Teórico.....	17
2.1- Epidemiologia e fatores de risco das doenças cardiovasculares .....	17
2.2.1- Hipercolesterolemia Familiar.....	19
2.3-O endotélio vascular .....	23
2.3.1 Disfunção endotelial.....	24
2.3.2 A Disfunção endotelial na hipercolesterolemia grave.....	25
2.3.3 Sistema de fluxometria por laser-doppler e o sistema de imagem laser speckle de contraste .....	26
2.4.Células progenitoras endoteliais.....	27
2.4.1 Células Progenitoras Endoteliais e Hipercolesterolemia.....	28
3-Justificativa .....	30
4- Objetivos:.....	31
4.1 Objetivo primário .....	31
4.2 Objetivos secundários .....	31
5- Métodos .....	32
5.1. Aspectos éticos.....	32
5.2. Desenho do estudo .....	32
5.3. Critérios de elegibilidade .....	32
5.4. Triagem e seleção dos voluntários: .....	33
5.5 Protocolo do estudo:.....	33
5.6 Definição das variáveis de interesse.....	34
5.7. Avaliação nutricional .....	37
5.8 Avaliação da pressão arterial: .....	38
5.9 Coletas de sangue e análises bioquímicas .....	38
6.0 Quantificação das células progenitoras endoteliais.....	38
6.1 Avaliação da função endotelial microvascular:.....	39
6-Resultados .....	43
7-Discussão .....	53
8-Limitações.....	57

9-Conclusões .....	58
10-Referências Bibliográficas .....	59

## **1-Introdução:**

As doenças cardiovasculares (DCV) constituem a principal causa de morbimortalidade entre homens e mulheres no Brasil e no mundo (MS 2011, ANDRADE et al 2013). Estima-se que ocorram cerca de 16,6 milhões de óbitos ao ano por DCV no mundo todo (OMS 2011). Dados do Ministério da Saúde verificaram a ocorrência, em 2010, de 326 mil mortes por DCV, perfazendo cerca de 1.000 mortes/dia (SIMÃO et al 2014).

A dislipidemia é considerada um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de DCV. Segundo a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, valores de LDL-colesterol (LDL-c) > 190 mg/dL e triglicérides > 800 mg/dL, isoladamente ou associados, caracterizam uma dislipidemia grave (XAVIER et al 2013).

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença genética autossômica caracterizada por altos níveis colesterol total (CT) e LDL-colesterol (LDL-c) e também está associada ao aparecimento de DCV precoce (SANTOS et al 2012). A suspeita clínica da HF deve ser cogitada sempre que exames laboratoriais indicarem LDL-C  $\geq$ 190 mg/dL em indivíduos adultos. Seu diagnóstico é baseado em critérios clínicos e/ou genéticos e deve ser feito de maneira precoce para a instituição de um tratamento otimizado que se baseia na mudança do estilo de vida e medicação hipolipemiante (CIVEIRA et al 2004, SANTOS et al 2012, MATA et al 2013).

A dislipidemia afeta adversamente o sistema cardiovascular atuando, dentre outros aspectos, sobre o endotélio (ROSSI et al 2010). A manutenção da integridade funcional do endotélio é crucial para a prevenção da aterosclerose; tem sido demonstrado que a disfunção endotelial ocorre desde o início do processo aterosclerótico e contribui para a formação, progressão e instabilidade da placa (SITIA et al 2010). A disfunção endotelial está associada com os fatores de risco cardiovascular tradicionais, como diabetes mellitus (DM), dislipidemia, hipertensão arterial sistêmica (HAS), síndrome metabólica, tabagismo e história familiar de doença cardiovascular precoce. Estudos demonstraram que a disfunção endotelial é um preditor independente de eventos cardiovasculares e de pior

prognóstico em longo prazo (TIBIRIÇA et al 2007, DEBBABI et al 2010, SCHACHINGER et al 2000). Além disso, evidências apontam uma associação entre a melhora da função endotelial e aumento da sobrevida em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) (FICHTLSCHERER et al 2004).

A agressão ao endotélio ocasionada pela dislipidemia também pode ser estudada através de alterações nas células progenitoras endoteliais (CPE). Estas são células CD34 circulantes que possuem a capacidade de migrar para lugares de agressão vascular e ajudar no reparo endotelial (HILL et al 2003, URBICHI et al 2004, EGUCHI et al 2007). As CPE têm sido intensamente estudadas devido ao seu potencial prognóstico e terapêutico em indivíduos com DCV (WERNER et al 2005, SCHMIDT-LUCKE et al 2005).

Neste contexto, o objetivo primário deste estudo foi realizar uma caracterização dos pacientes com hipercolesterolemia grave, com foco na avaliação da função endotelial microvascular e das células progenitoras endoteliais. Secundariamente, o trabalho tem como objetivo comparar estes parâmetros entre os pacientes que possuem diagnóstico clínico de HF e os que não possuem, a fim de verificar se os primeiros apresentam maiores anormalidades.



## **2-Referencial Teórico**

### **2.1- Epidemiologia e fatores de risco das doenças cardiovasculares**

A prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) tem aumentado em decorrência da transição demográfica, nutricional e epidemiológica ocorrida nas últimas décadas. As principais DCNT têm em comum alguns fatores de risco modificáveis, dentre os quais se destacam o tabagismo, o excesso de peso e as dislipidemias (MS 2011).

Apesar de se observar nas últimas décadas uma queda na mortalidade por DCV (MANSUR et al 2012), elas ainda são a principal causa de morte no Brasil e no mundo, sendo responsáveis por 17,3 milhões de mortes por ano, um número que deverá crescer para > 23,6 milhões em 2030. (OMS 2011). Além disso, elas constituem uma das principais causas de permanência hospitalar prolongada e respondem pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações no Brasil (CASTRO et al 2004).

As doenças do aparelho circulatório são as principais causas de morte em homens e mulheres no Brasil. Segundo dados divulgados pelo DATASUS, dentre essas doenças, as principais causas de óbito são as doenças isquêmicas do coração e as doenças cerebrovasculares (MANSUR et al 2012).

A aterosclerose associa-se intimamente com determinados fatores de risco cardiovascular, como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, diminuição do HDL-colesterol (HDL-c), HAS, DM e obesidade (SANTOS et al 2012). Já há bastante tempo sabe-se que o controle da dislipidemia, em especial as reduções mais intensivas do LDL-C, tem se associado a importantes benefícios na redução de eventos e mortalidade cardiovascular, sendo observado que a redução de 10% do colesterol sérico em adultos pode reduzir em até 15% as chances de morte cardiovascular (XAVIER et al 2013).

Eventos coronarianos agudos são a primeira manifestação da doença aterosclerótica em pelo menos metade das pessoas com DAC (SANTOS et al 2012), e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que  $\frac{3}{4}$  da mortalidade cardiovascular podem ser diminuídos com adequadas mudanças no estilo de vida (OMS 2012, SIMÃO et al 2014). Assim, é de extrema importância a identificação de fatores de risco na população, para a prevenção primária e secundária de eventos cardiovasculares.

## 2.2 Hipercolesterolemia Grave

O LDL-c tem sido reconhecido como o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana (FERENCE et al 2012, HEIGL et al 2015). Diversos ensaios clínicos e metanálises com o uso de estatinas mostraram uma clara associação entre a redução do LDL-c e a redução do risco cardiovascular (O'KEEFE et al 2004).

O fenótipo de hipercolesterolemia grave inclui todos os indivíduos com LDL-C acima de 190 mg / dl, independentemente da causa (SNIDERMAN et al 2014).

Afastadas as principais causas secundárias da hipercolesterolemia grave, como o hipotireoidismo não tratado, DM descompensada, nefropatia crônica e uso de certas medicações como corticosteroides, deve-se considerar a etiologia genética e de caráter familiar (STONE et al 2013). Entre as dislipidemias de causa genética, a Hipercolesterolemia Familiar se destaca como uma das doenças monogênicas herdadas mais comuns na população em geral estando relacionada com mutações genéticas no gene que codifica os receptores específicos de LDL (LDL-r), ou no gene APOB que codifica a apolipoproteína B-100 (ApoB-100), ou ainda no gene pró-proteína convertase subutilisina/kexina tipo 9 (PCSK-9)(SANTOS et al 2012, MASANA et al 2013).

Entretanto muitos indivíduos com níveis de LDL-C > 190 mg / dl não têm defeitos em qualquer um dos três genes, sugerindo uma provável origem poligênica nesses casos, onde a triagem genética não origina diagnóstico(TALMUD et al 2013). Além disso, como novas mutações relacionadas ao fenótipo da doença são descobertas a todo o momento, a HF não pode ser descartada quando o teste genético não detectar alguma mutação, principalmente se o fenótipo apresentado sugerir fortemente o diagnóstico (VAN AALST-COHEN et al 2006, TALMUD et al 2013). Por outro lado, existe uma porcentagem de indivíduos que não são identificados com base nos questionários clínicos, principalmente crianças e indivíduos com fenótipos moderados (ALVES et al 2010).

Uma vez que o risco de doença vascular é determinado pela exposição à hipercolesterolemia ao longo da vida e não pelo genótipo que a produz, alguns estudos têm sugerido que o foco dos profissionais deve ser a identificação e gestão da

hipercolesterolemia grave, com uma abordagem em cascata fenotípica para identificar os membros da família afetados, sem investir recursos na identificação das causas genéticas (SNIDERMAN et al 2014, STEIN & RAAL 2013). Assim, indivíduos com hipercolesterolemia grave devem ser tratados adequadamente com o objetivo de reduzir o LDL-c independentemente do diagnóstico clínico ou genético de HF.

### **2.2.1- Hipercolesterolemia Familiar**

A hipercolesterolemia familiar é uma doença genética, autossômica dominante, que se caracteriza por níveis elevados de colesterol total (CT) e LDL-c na corrente sanguínea (SANTOS et al 2012). Este aumento geralmente está relacionado com a diminuição ou ausência dos receptores específicos de LDL causado por mutações no gene deste receptor. Outras causas mais raras estão relacionadas com alterações genéticas no gene APOB ou com mutações no gene PCSK-9 (ABIFADEL et al 2003, SANTOS et al 2012, MATA et al 2014, SING et al 2015). A sua forma heterozigótica tem prevalência estimada em 1:500 indivíduos, enquanto a sua forma homozigótica é mais rara atingindo 1:1.000.000 de indivíduos (SANTOS et al 2012, MASANA et al 2013). Assim, acredita-se que cerca de 10 milhões de pessoas possuam HF no mundo e no Brasil estima-se que entre 402.000 e 670.000 pessoas possuam a doença. Entretanto, estudos apontam que menos de 25% dos portadores possuem diagnóstico conhecido e menos de 10% são adequadamente tratados (OMS 1997, SANTOS et al 2012, NORDESTGAARD et al 2013). Em muitos países esse número cai para 1% (JANNES et al 2015).

Dentre as complicações da HF, destaca-se o aparecimento de DCV precoce (em homens abaixo de 55 anos e em mulheres abaixo de 65 anos), reduzindo a expectativa de vida em muitas famílias de portadores de HF (CIVEIRA et al 2008, SANTOS et al 2012). Estima-se que 5-10% dos indivíduos que sofrem um infarto agudo do miocárdio antes dos 55 anos de idade possuam alguma mutação relacionada à HF (BOURBON 2008).

Dentre os sinais para a suspeita da presença de HF na população em geral, a I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar destaca a presença de LDL-c  $\geq 190$  mg/dL em adultos, além da presença de arco corneano, espessamento de tendões e xantelasma. Apesar de os níveis de triglicédeos séricos estarem geralmente na faixa de

normalidade, caracterizando a HF como uma dislipidemia com elevação isolada do LDL-c, cerca de 25% dos pacientes podem apresentar uma dislipidemia mista com elevação de ambos (CIVEIRA et al 2008).

O diagnóstico da HF se baseia em critérios clínicos, bioquímicos e genéticos (CIVEIRA et al 2004), sendo estes o histórico pessoal e familiar de hipercolesterolemia grave, a doença cardiovascular precoce, a presença de sinais clínicos de depósito de colesterol como arco corneano e xantomas tendinosos e a presença de mutação em algum dos 3 genes envolvidos na fisiopatologia da doença (MATA et al 2013).

Ainda que não exista um acordo internacional na definição de critérios clínicos para o diagnóstico de HF, este apresenta a vantagem de ser mais econômico, pois é baseado no fenótipo (AUSTIN et al 2004, DEFESCHE et al 2010). Dentre eles destacam-se os critérios da *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN) os do programa *USA Make Early Diagnosis Prevent Early Death Program* (USAMEDPED) e os do grupo *Simon Broome Register Group*.

O Programa dos Estados Unidos *USA Make Early Diagnosis Prevent Early Death Program* (MEDPED) utiliza critérios baseados na probabilidade do diagnóstico de HF de acordo com os valores de CT e LDL-C, a idade e se o indivíduo possui algum parente de primeiro, segundo ou terceiro grau que possua HF ou não (WENG et al 2015).

Os critérios definidos pelo Grupo Simon Broome no Reino Unido (*Simon Broome Register Group, 1991*) levam em conta os valores de CT e LDL-C com pontos de corte diferenciados para adultos e crianças menores de 16 anos, além da presença de xantomas tendinosos e história familiar de dislipidemia e DAC precoce. De acordo com a combinação destes critérios, os casos são classificados como “definitivo” ou “provável”. A presença de xantoma tendinoso é considerada essencial para o diagnóstico definitivo de acordo com esses critérios. Como eles normalmente não estão presentes em indivíduos antes dos 40 anos de idade, esse método pode limitar o diagnóstico em indivíduos jovens que não tenham acesso ao rastreamento genético (DAMGAARD 2005, MARKS et al 2003).

Uma ferramenta de diagnóstico similar foi desenvolvida pela rede holandesa *Dutch Lipid Clinic Network* que inclui parâmetros semelhantes aos do Grupo Simon Broome, mas inclui a presença de arco corneano e a história pessoal de DCV precoce. Além disso, ela

acrescenta o cálculo de uma pontuação numérica para o diagnóstico. Assim, a avaliação é baseada na história familiar e clínica prematura para DCV; no exame físico a partir da presença de sinais de depósitos extra vasculares de colesterol como xantomas e arco corneano; das concentrações plasmáticas de LDL-c e da determinação da mutação de genes do LDL-r, Apo B-100 ou PCSK9. O diagnóstico de HF é considerado definitivo quando acima de 8 pontos, provável entre 6 à 8 pontos e possível entre 3 à 5 pontos na tabela de classificação (CIVEIRA et al 2008, SANTOS et al 2012, AL-RASADI et al 2014) A Diretriz Brasileira de HF sugere o uso deste critério para diagnóstico clínico.

O rastreamento genético deve incluir o sequenciamento da região codificadora do gene LDL-r, polimorfismos do gene APOB e PCSK9 (LEREN et al 2004, SANTOS et al 2012). Mais de 1.600 mutações do gene LDL-r já foram documentadas como causadoras de HF até o momento, representando cerca de 85%-90% dos casos de HF (LEIGH et al 2008, VILLIGER et al 2002).

O tratamento precoce da HF é altamente benéfico para a prevenção do aparecimento de DCV (ROBINSON et al 2013), diminuindo a morbi-mortalidade nesta população. Ele se baseia nas modificações no estilo de vida e no uso adequado de farmacoterapia (SANTOS et al 2012), com o objetivo de reduzir os eventos cardiovasculares (GENEST et al 2014). Os resultados mais relevantes no acompanhamento de pacientes com HF são os parâmetros bioquímicos, em especial a diminuição nos níveis de LDL-c.

Embora não existam estudos randomizados que comprovem que a redução do LDL-C deva ser o alvo principal tratamento em pacientes com HF, evidências demonstram a eficácia dessa redução no aparecimento de DCV na população em geral (BAIGENT et al 2010). Além disso, já foi observada a diminuição do seu aparecimento em estudos observacionais de pacientes com HF que eram tratados com o uso de estatinas (VERMISSEN et al 2008, MARKS et al 2003).

É recomendada a redução de pelo menos 50% dos níveis basais de colesterol plasmático do indivíduo como meta de valor terapêutico (SANTOS et al 2012, GENEST et al 2014). Além disso, também podem ser utilizados as metas de níveis de LDL-C < 100 mg/dl para indivíduos sem fatores de risco adicionais e níveis de LDL-c < 70 mg/dl para indivíduos que possuam outros fatores de risco (MATA et al 2013).

Sabe-se que medidas dietoterápicas e modificações relacionadas ao estilo de vida devem sempre fazer parte do tratamento e prevenção de dislipidemias e doença cardiovascular (SANTOS et al 2012) , sendo recomendadas para todos os indivíduos com alto risco para DCV(ECKEL et al 2013). Assim, pacientes com HF devem adotar a modificação do estilo de vida como parte primordial do tratamento, incluindo o uso de uma dieta saudável, o controle do peso, a prática regular de atividade física , a cessação do tabagismo, além do controle de comorbidades como HAS e DM (ECKEL et al 2013).

Segundo a diretriz brasileira de HF (SANTOS et al 2012), a indicação de fármacos deve ocorrer em pacientes sem manifestação prévia de DCV mas que permaneçam com concentrações de LDL-c  $\geq 190$  mg/dL após a mudança no estilo de vida e em pacientes que apresentem outros fatores de risco e que permaneçam com concentrações de LDL-c  $\geq 160$  mg/dL após a mudança no estilo de vida.

As estatinas, medicações inibidoras da enzima hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA), são os fármacos de primeira escolha, devendo ser administradas nas doses mais altas toleradas (MATA et al 2013). Apesar de não existirem ensaios clínicos randomizados avaliando o uso de estatinas nestes pacientes por questões éticas, dados de estudos observacionais de duas grandes coortes europeias de pacientes com HF (VERMISSEN et al 2008, MATA et al 2011) demonstraram a eficácia e segurança das estatinas no seu tratamento. Além disso, outros estudos já demonstraram a eficácia e segurança das estatinas na diminuição de eventos cardiovasculares tanto na prevenção primária como secundária (ELIS et al 2011).

Em pacientes intolerantes às estatinas ou que não alcancem a meta terapêutica, outras classes de medicamentos podem ser associados, como a ezetimiba (inibidor de absorção intestinal de colesterol), os sequestrantes de ácidos biliares , o ácido nicotínico (niacina) e os derivados do ácido fíbrico (fibratos) (SANTOS et al 2012, MATA et al 2013, GENEST et al 2014). Em casos mais graves, o uso da aférese de LDL-c e até o transplante hepático podem ser considerados (SANTOS et al 2012).

### **2. 3-O endotélio vascular**

O endotélio vascular não é somente uma monocamada de células que separa o sangue circulante da parede dos vasos, como se imaginava no passado, mas é também um órgão estrategicamente localizado com múltiplas funções endócrinas, autócrinas e parácrinas (BARBATO et al 2004, ROJAS et al 2004 ,GROVER-PAÉZ et al 2009, TEIXEIRA et al 2014) .

O endotélio tem a habilidade de modular tanto o lúmen vascular, pelo controle da dilatação e da contração locais em resposta a alterações do fluxo sanguíneo ou a agentes vasoativos, como o compartimento adjacente da musculatura lisa vascular, pela produção de substâncias antiproliferativas (DAVIGNON et al 2004, FERREIRA et al 2011, MELO et al 2014).

A manutenção do tônus vascular saudável é realizada pela liberação de diversas substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. As principais substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio são o óxido nítrico (ON), a prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio que agem sinergicamente para inibir a agregação plaquetária (GROVER-PAÉZ et al 2009, PROTÁSIO et al 2005). Porém, de todas essas substâncias, o ON é considerado o mais importante, pois produz vasodilatação, inibe a proliferação das células musculares lisas, impede o recrutamento, a adesão e a diferenciação de células inflamatórias, a agregação plaquetária e a produção do fator tecidual trombogênico (TEIXEIRA et al 2014).

O endotélio também produz substâncias vasoconstritoras, como a endotelina (vasoconstritor endógeno mais potente identificado até o momento) e angiotensina II. A angiotensina II não só age como um vasoconstritor, mas também é pró-oxidante e estimula a produção de endotelina. Juntas, as duas substâncias promovem a proliferação de células musculares lisas (CASEY et al 2005).

### **2.3.1 Disfunção endotelial**

A disfunção endotelial é um prejuízo funcional do endotélio caracterizado por produção aumentada ou diminuída de fatores vasodilatadores produzindo um estado anormal de vasoconstrição ou vasodilatação, e aumento da atividade pró-trombótica e / ou pró-coagulante que resulta na expressão de citocinas e moléculas de adesão designadas para interagir com leucócitos e plaquetas, desencadeando mecanismos inflamatórios direcionados a tecidos específicos (HANSSON et al 2005, GIRIBELA et al 2011) e levando ao aumento da permeabilidade endotelial (DAVIGNON et al 2004). No entanto, a alteração da disfunção endotelial mais estudada refere-se a alterações na regulação do lúmen dos vasos e a redução da atividade biológica do óxido nítrico, pois há concordância de que este é o mecanismo de maior relevância no processo multifatorial da disfunção endotelial e na participação das principais disfunções cardiovasculares (PEPINE et al 2009)

A disfunção endotelial apresenta evidente relevância clínica por preceder o desenvolvimento das alterações ateroscleróticas morfológicas e estar associada com fatores de riscos tradicionais como hipercolesterolemia, HAS, obesidade e DM (MELO et al 2014). Além disso, a sua presença pode também contribuir para o desenvolvimento da lesão e das manifestações clínicas finais, contribuindo para formação, progressão e complicações da placa aterosclerótica (SITIA et al 2010, GIRIBELLA et al 2011). Sabe-se que até 70% das mortes por infarto agudo do miocárdio (IAM) ocorrem em decorrência da rotura da placa aterosclerótica, que pode estar relacionada à presença de disfunção endotelial intensa, o que facilita a formação de trombos (NAGHAVI et al 2003, MELO et al 2014).

Sabe-se que o estresse de cisalhamento (*shear stress*) gerado pelo fluxo e pela pressão sanguínea é um dos principais estímulos fisiológicos para a liberação de fatores vasoativos e regulação do tônus vascular (ANDO & YAMAMOTO 2010, BARAC et al 2007, MENEZES et al 2014).

Alguns métodos não invasivos que avaliam a função endotelial se baseiam na resposta vasodilatadora do endotélio através da hiperemia reativa após um período curto de isquemia por oclusão do fluxo sanguíneo. Quando há liberação do fluxo, o estresse de cisalhamento na parede da artéria aumenta e as células endoteliais ativam os canais de potássio levando a hiperpolarização do endotélio com aumento do cálcio intracelular. Este



aumento ativa a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que libera óxido nítrico e leva ao relaxamento do músculo liso com consequente vasodilatação e aumento do diâmetro arterial. O mesmo estímulo pode ser alcançado pelo uso farmacológico de substâncias vasoativas como a acetilcolina (Ach) (PROTÁSIO et al 2005). Para se avaliar a resposta da vasodilatação independente do endotélio e descartar a disfunção do músculo liso vascular como causa da menor resposta vasodilatadora, pode-se usar substâncias doadoras de nitrogênio como a nitroglicerina e o nitroprussiato de sódio (NPS) (PLENTZ et al 2006).

A disfunção endotelial possui caráter sistêmico e por isso pode-se observar a sua presença também em artérias periféricas que possuam aterosclerose (FLAMMER et al 2012). Estudos também têm demonstrado que a microcirculação, composta pelas arteríolas, capilares e vênulas, possui envolvimento importante em eventos cardiovasculares (STRUIJKER-BOUDIER et al 2007). A disfunção microvascular possui importantes implicações na fisiopatologia dos eventos isquêmicos cerebrais, doença arterial coronariana e insuficiência renal (MANCIA et al 2007, LEVY et al 2008). Assim, sua avaliação pode ser utilizada para fornecer informações sobre a função endotelial sistêmica do indivíduo (RIZZONI et al 2003, DE CIUCEIS et al 2007).

### **2.3.2 A Disfunção endotelial na hipercolesterolemia grave**

A vasodilatação cutânea dependente do endotélio está diminuída tanto em indivíduos com hipercolesterolemia clinicamente definida (LDL-c > 160 mg/dL), como em indivíduos com hipercolesterolemia moderada (LDL-c entre 110 e 160mg/dL). Essa redução é mediada por fatores como a regulação da atividade da arginase, que limita a disponibilidade de substrato para a eNOS, além do aumento da oxidação do ascorbato sensível a mecanismos de estresse e a uma redução do cofactor tetrahydrobiopterina (BH4), que é essencial para a eNOS. Tais fatores levam ao desacoplamento da eNOS e a disfunção microvascular cutânea em indivíduos com LDL-c elevado (KENNEY et al 2013).

A presença de LDL na forma oxidada também é capaz de induzir o desacoplamento da eNOS privando o ambiente celular da síntese de ON (PROTÁSIO et al 2005). Ela contribui para o dano endotelial, através da ativação do receptor de Ldl-oxidada-1 (LOX-1) (SITIA et al 2010). Em estados patológicos a LOX-1 se liga a substâncias pró-aterogênicas

levando ao acúmulo de lipídeos, induzindo estado inflamatório, a adesão de monócitos e produção de moléculas de adesão com consequente ativação endotelial (SZMITKO et al 2003).

Nas dislipidemias de origem genética as alterações endoteliais podem estar presentes desde a infância. Em estudo de VLAHOS et al (2014), 30 crianças e adolescentes com idade média de  $12 \pm 2$  anos, com diagnóstico clínico ou genético de HF foram comparadas com um grupo controle constituído por indivíduos da mesma idade e sexo. Foi encontrada uma menor DFM, que estava inversamente associada com os níveis de LDL-c. Entretanto não foram encontradas alterações na espessura médio-intimal da carótida e da rigidez arterial, indicando que a disfunção endotelial pode ser a primeira alteração observada nos indivíduos muito jovens, precedendo as alterações estruturais ateroscleróticas subclínicas.

ZHONG-XUAN YE et al (2007), ao estudar 32 pacientes adultos assintomáticos com diagnóstico genético de HF, encontraram uma menor DFM durante a hiperemia reativa quando comparado com grupo controle de 34 pacientes sem HF. Além disso, foi observado que níveis elevados de proteína C reativa estavam associados com o aparecimento da aterosclerose subclínica detectada pela medida de calcificação das artérias coronárias.

Em metanálise de 2010, MASOURA et al, encontraram piora da função endotelial e maior presença de aterosclerose subclínica avaliada pela espessura médio-intimal da carótida nos pacientes com HF. A medida de DFM foi significativamente relacionada com o nível de CT e LDL-C em pacientes com HF, o que indica que a gravidade da hipercolesterolemia também está associada com o grau de disfunção endotelial.

### **2.3.3 Sistema de fluxometria por laser-doppler e o sistema de imagem laser speckle de contraste**

A fluxometria por *laser doppler* é um método não invasivo, sensível e de fácil realização que fornece avaliação quantitativa do fluxo sanguíneo da microcirculação e se baseia no efeito Doppler de um feixe de raios refletidos por células sanguíneas em movimento (HENRICSON et al 2007). O feixe é refletido pelas hemácias em movimento na microcirculação sofrendo ao mesmo tempo uma modificação do seu comprimento de

onda (*Doppler shift*) e sendo então captado por um sensor e posteriormente analisado (CRACOWISK et al 2006). A sua vantagem é a alta resolução temporal da medida de perfusão e sua grande desvantagem consiste no pequeno tamanho da área de mensuração, apresentando grande variabilidade do sinal de um lugar para outro, o que torna o método pouco reprodutível e limita seu uso em ensaios terapêuticos (MAHÉ et al 2012).

Usando o mesmo princípio da fluxometria por *laser-Doppler*, foi desenvolvido recentemente, o sistema de imagem laser speckle de contraste (*Laser speckle contrast imaging- LSCI*). O LSCI é uma técnica baseada na análise de granulação de contraste (*speckles*) geradas pela luz laser refletida, coletada e transmitida para uma tela. Quando a luz laser incide sobre a superfície da pele, as partículas em movimento levam a flutuações do speckle no detector (MAHÉ et al 2012, CORDOVIL et al 2012) que fornece uma imagem de fluxo sanguíneo microvascular (HUMEAU-HEUTIER et al 2012). A maior fonte de dispersor móvel no tecido biológico são as células sanguíneas dentro do vaso (SENARATHNA et al 2013).

A alta taxa de captura do LSCI permite a avaliação contínua da perfusão da pele em áreas amplas e demonstra excelente reprodutibilidade em indivíduos saudáveis (ROUSTIT et al 2010).

#### **2.4.Células progenitoras endoteliais**

As células progenitoras endoteliais foram descritas pela primeira vez por Asahara et al em 1997, como células progenitoras CD34+ isoladas do sangue periférico de adultos que podiam se diferenciar em um fenótipo endotelial (ASAHARA et al 1997, ASAHARA et al 1999).

As CPE são identificadas como células mononucleares que expressam uma combinação de marcadores endoteliais (VEGFR2) e progenitores (CD34/CD133), com alta capacidade proliferativa, podendo ser isoladas do sangue periférico, medula óssea e sangue do cordão umbilical. Não há um único marcador específico para a identificação destas células, sendo atualmente o mais aceito a co-expressão de marcadores CD133, CD34 e VEGFR2. Embora estes marcadores não sejam exclusivos de CPE, a sua combinação

caracteriza uma célula progenitora específica a um específico estágio de maturação (SEN et al 2011, POAY SIAN et al 2014).

A descoberta das CPE ampliou o entendimento do processo angiogênico, uma vez que evidências demonstraram a sua capacidade em migrar da medula óssea para a circulação periférica, auxiliando no processo do reparo endotelial e na formação de novos vasos ( ASAHARA et al 1999, URBICHI et al 2004, EGUCHI et al 2007, POAY SIAN et al 2014). Além disso, estudos mostraram que as CPE também possuem uma atividade parácrina, sendo capazes de liberar fatores de crescimento para as células endoteliais adjacentes, facilitando a angiogênese e indicando um efeito adicional para o processo de neovascularização e reendotelização (GNECHI et al 2008).

Evidências sugerem o uso das CPE como um marcador de prognóstico. Em um estudo com 44 pacientes com DAC e 33 pacientes com síndrome coronariana aguda, acompanhados por uma média de 10 meses, a presença de menores níveis de CPE foi associada a uma incidência significativamente maior de eventos cardiovasculares (SCHMIDT-LUCKE et al 2005). Em outro estudo maior, com 519 pacientes com DAC estável, o aumento dos níveis de CPE foram relacionados a um risco reduzido de morte por causas cardiovasculares (WERNER et al 2005) . HILL et al (2003), relataram uma correlação negativa entre CPE e escore de Framingham em 45 homens em presença de fatores de riscos cardiovascular. Eles também relataram uma correlação positiva entre CPE e melhor função endotelial medida através da dilatação fluxo-mediada da artéria braquial (DFM).

Outros estudos também já documentaram uma diminuição do número de CPE em pacientes com DAC (EIZAWA et al 2004, WANG et al 2007, LIGUORI et al 2008, BRIGUORI et al 2010).

#### **2.4.1 Células Progenitoras Endoteliais e Hipercolesterolemia**

Os níveis elevados de LDL-c circulantes em animais e em adultos com dislipidemia estão associados com menor número de CPE e sua funcionalidade. ROSSI et al (2010) verificaram em 80 pacientes hipercolesterolêmicos que o número das CPE foi

menor quando comparados aos controles, e os que tinham HDL reduzido apresentavam ainda menor número de CPE.

Também tem sido sugerido que o fenótipo destas células pode ser alterado após a exposição crônica à LDL. IMANISHI et al (2004), observaram que a exposição de CPE isoladas dos sangue periférico de humanos à LDL- oxidada in vitro, acelerou de forma significativa a taxa de senescência destas células. Em outro estudo IMANASHI et al (2003) também observaram uma diminuição da capacidade da formação de túbulos pelas CPE na presença de LDL oxidada.

Por outro lado, estudos demonstraram que os níveis de CPE podem aumentar após o tratamento com estatinas e redução do colesterol com tratamento não farmacológico (CROCE et al 2006).

Em estudo de FABBRI-ARRIGONI et al 2012, foram observados menores níveis de CPE em crianças com HF quando comparadas com crianças saudáveis, apontando um aumento do risco cardiovascular com a exposição precoce a alterações lipídicas ocasionadas pelo genótipo da HF.

### **3-Justificativa**

Sabendo que a disfunção endotelial está presente desde o início do processo aterosclerótico, é de extrema importância identificar se indivíduos com hipercolestolemia grave possuem alguma alteração na função endotelial microvascular e na capacidade de reparo do endotélio através do número reduzido de CPE, pois tais dados podem trazer nova compreensão para a história natural da doença.

Assim a hipótese deste estudo é de que a hipercolesterolemia grave promove uma diminuição na resposta vasodilatadora endotelial e nos níveis de células progenitoras endoteliais circulantes e que tais efeitos são mais pronunciados em indivíduos com diagnóstico clínico de HF.

## **4- Objetivos:**

### **4.1 Objetivo primário**

-Avaliar as características clínicas, a função endotelial microvascular e o número de células progenitoras endoteliais de pacientes com hipercolesterolemia grave.

### **4.2 Objetivos secundários**

Avaliar associações entre dados clínicos, número de CPE e função endotelial microvascular em pacientes com hipercolesterolemia grave;

-Identificar, dentre pacientes com hipercolesterolemia grave, aqueles com diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar Heterozigótica;

-Avaliar a função endotelial microvascular de pacientes com e sem diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar Heterozigótica;

-Quantificar as células progenitoras endoteliais de pacientes com e sem diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar Heterozigótica;

-Comparar características clínicas, número de CPE e a função endotelial microvascular, entre os grupos com e sem diagnóstico clínico de HF.

## **5- Métodos**

### **5.1. Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado em 24 de junho de 2014 pelo Comitê de Ética em pesquisa do Instituto Nacional de Cardiologia sob protocolo nº 26802514.4.0000.5272 (ANEXO I). Os voluntários da pesquisa foram devidamente informados sobre os procedimentos aos quais seriam submetidos na pesquisa, sendo seu consentimento formalizado através do termo de consentimento livre e esclarecido, conforme a resolução nº196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos, do Conselho de Saúde do Ministério da Saúde (ANEXO II).

### **5.2. Desenho do estudo**

Estudo descritivo observacional e transversal, de uma amostra de conveniência de pacientes adultos e idosos de ambos os sexos com hipercolesterolemia grave do Instituto Nacional de Cardiologia (INC) , realizado no período de julho de 2014 a março de 2015.

### **5.3. Critérios de elegibilidade**

Critérios de inclusão: idade  $\geq$  18 anos, LDL-colesterol  $\geq$  190mg/dL histórico pessoal e/ou familiar de hipercolesterolemia ou doença cardiovascular.

Critérios de exclusão: gestação, aleitamento, síndromes coronarianas agudas, insuficiência cardíaca congestiva, realização de angioplastia coronariana ou qualquer procedimento cirúrgico nos 30 dias anteriores à consulta, doença reumática ou doença sistêmica do tecido conjuntivo, hipotireoidismo não tratado, insuficiência renal crônica, hepatopatia, câncer ou uso de corticosteroides.



#### **5.4. Triagem e seleção dos voluntários:**

A triagem para seleção dos voluntários foi realizada em 3 etapas. Na primeira foi realizada busca ativa no banco de dados informatizado (Sistema MV®) do INC em busca de pacientes que possuísssem exames com valores de LDL-c  $\geq 190$ mg/dL. Na segunda etapa foi realizado um primeiro contato telefônico onde eram feitas perguntas adicionais sobre histórico clínico e familiar. Caso os pacientes atendessem aos critérios de inclusão era feito o convite para a pesquisa na terceira etapa.

#### **5.5 Protocolo do estudo:**

A partir do mês de julho de 2014, os pacientes previamente triados foram convidados através de contato telefônico para participar da atual pesquisa e comparecer ao INC durante o período da manhã para a avaliação.

No primeiro momento do encontro foram explicados os procedimentos da pesquisa, além de serem realizados leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Durante a primeira consulta, foram coletadas informações mais detalhadas sobre história clínica e familiar dos pacientes, através de questionário padronizado (ANEXO III).

Na segunda consulta os pacientes compareceram em jejum para a realização de coleta de sangue, avaliação por bioimpedância elétrica e para o exame de reatividade microvascular.

Os pacientes que possuíam necessidade de acompanhamento cardiológico e/ou nutricional foram incluídos no atendimento de rotina do Ambulatório Multidisciplinar de Aterosclerose e Prevenção Cardiovascular da própria instituição.

A figura 1 resume as etapas de triagem e as duas consultas realizadas durante o estudo.

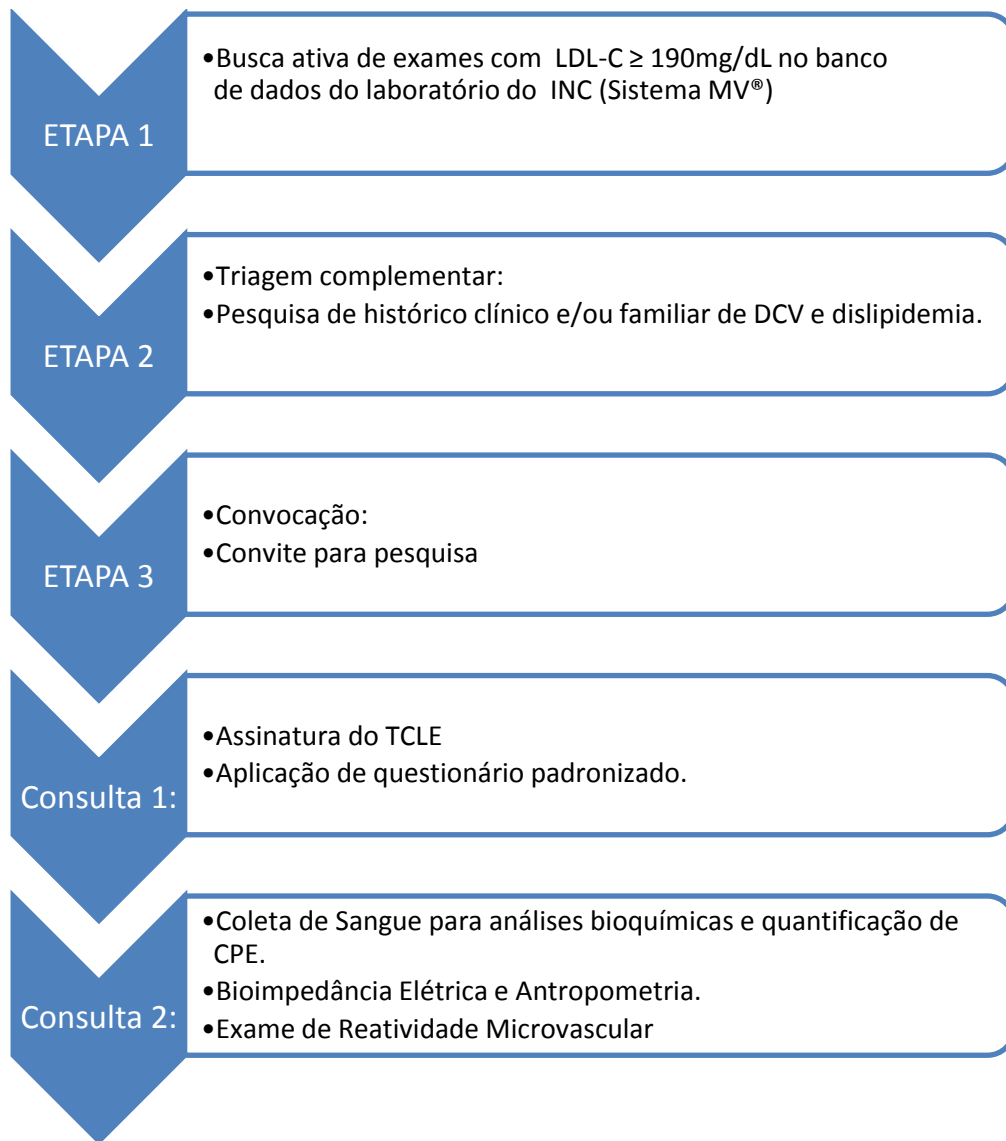


Figura 1: Fluxograma da pesquisa.

## 5.6 Definição das variáveis de interesse

### Variáveis clínicas

As variáveis foram determinadas pela sua presença informada e/ou documentada no prontuário da seguinte forma:

- **Idade:** foi calculada considerando a data de nascimento registrada no documento de identidade e/ou informada pelo próprio paciente.

**-Sexo:** foi registrado de acordo com a informação do paciente.

**-Diabetes mellitus:** Foram considerados diabéticos os indivíduos que utilizavam medicação hipoglicemiante e/ou insulina e sua presença informada e/ou documentada em prontuário médico.

**-Hipertensão arterial sistêmica:** Foram considerados hipertensos os indivíduos que utilizavam medicamento anti-hipertensivo ou que relatavam o diagnóstico médico de HAS.

**-Tabagismo:** Foram considerados tabagistas os pacientes que relataram fumar pelo menos um cigarro por dia por no mínimo um mês antes da consulta, ex-tabagistas os que pacientes que pararam de fumar há pelo menos um ano e não tabagistas, aqueles pacientes que nunca fumaram.

**História de evento cardiovascular:** Foram considerados eventos cardiovasculares a história de angina pectoris, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico ou a realização de angioplastia ou revascularização do miocárdio.

**História de angina:** foi registrado de acordo com a informação do paciente ou informação em prontuário clínico.

**História de Infarto agudo do miocárdio:** foi registrado de acordo com a informação do paciente ou informação em prontuário clínico.

**História de Acidente vascular encefálico:** foi registrado de acordo com a informação do paciente ou informação em prontuário clínico.

**História de angioplastia:** foi registrado de acordo com a informação do paciente ou informação em prontuário clínico.

**Cirurgia de revascularização do miocárdio prévia:** foi registrado de acordo com a informação do paciente ou informação em prontuário clínico.

O diagnóstico clínico de hipercolesterolemia familiar foi realizado de acordo com os critérios descritos pela I Diretriz Brasileira de HF, conforme a tabela a seguir:

**Tabela 1: Critérios diagnósticos da hipercolesterolemia familiar.**

<b>Parâmetro:</b>	<b>Pontos:</b>
<b>História familiar:</b>	
Parente de 1º grau portador de doença vascular/ coronariana prematura (homem < 55 anos , mulher < 60 anos)OU Parente adulto de 1º ou 2º grau com CT >290mg/dL.	1
Parente de 1º grau portador de xantoma de tendinoso e/ou arco corneano OU Parente de 1º grau <16 anos com CT >260mg/dL.	2
<b>História clínica:</b>	
Paciente portador de doença coronariana prematura (homem < 55 anos , mulher < 60 anos).	2
Paciente portador de doença arterial cerebral ou periférica prematura(homem < 55 anos , mulher < 60 anos).	1
<b>Exame físico:</b>	
Xantoma Tendinoso	6
Arco corneano <45 anos	4
<b>Nível de LDL-c (mg/dL)</b>	
Maior que 330 mg/dl	8
250 - 329 mg/dl	5
190 - 249 mg/dl	3
155 - 189 mg/dl	1
<b>Análise do DNA:</b>	
Presença de mutação funcional do gene do receptor de LDL, da apoB100 ou da PCSK9	8
<b>Diagnóstico de HF:</b>	
Certeza se	> 8 pontos
Provável se	6-8 pontos
Possível se	3-5 pontos

## **5.7. Avaliação nutricional**

### **5.7.1 Avaliação antropométrica**

A massa corporal em quilogramas (kg) e estatura em metros (m) foram mensuradas utilizando a balança plataforma digital com estadiômetro acoplado (Filizzola®), com capacidade de 180kg e precisão de 100g, posicionada sobre superfície plana. A estatura foi aferida com o uso de estadiômetro acoplado à balança, com os indivíduos descalços, cabeça posicionada na posição Frankfurt com os braços estendidos ao longo do corpo.

O índice de massa corporal (IMC) foi calculado dividindo-se a medida do peso em quilogramas pela medida da estatura em metros elevada ao quadrado, pacientes adultos foram classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS 2000), e pacientes idosos de acordo com *The American Dietetic Association*, 1994.

O perímetro da cintura (PC) foi medido no ponto médio entre a crista ilíaca e a última costela, utilizando-se fita métrica inelástica (acurácia de 0,1 cm, Standard Sanny), estando o voluntário em posição ortostática, abdômen relaxado, braços ao lado do corpo e os pés juntos. Foram considerados os seguintes pontos de corte para PC aumentado: homens  $PC \geq 102$  cm e mulheres  $PC \geq 88$  cm (OMS,1998).

### **5.7.2. Avaliação de composição corporal:**

Foi utilizada bioimpedância multifrequencial tetrapolar com 8 eletrodos tácteis da marca Bioespace, modelo Inbody 720®, que operou em 6 frequências diferentes ( 1, 5, 50, 250, 500 e 1000 kHz).

A avaliação foi realizada com os pacientes em jejum de pelo menos 4 horas. Para o preparo do exame, os pacientes foram orientados a não praticar atividade física nas 24 horas anteriores, não alterarem o consumo habitual de líquidos, não consumirem bebidas alcoólicas, café, chás ou refrigerantes a base de cola. Além disso, as mulheres em idade fértil deveriam estar fora do seu período menstrual.

Os pacientes foram posicionados no aparelho em posição ortostática, com a cabeça posicionada no plano de Frankfurt, pés alinhados e posicionados sobre os eletrodos. O

paciente foi orientado a segurar os eletrodos manuais com os braços levemente elevados ao lado do corpo, mantendo a posição até o final da avaliação.

### **5.8 Avaliação da pressão arterial:**

A pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) foram aferidas duas vezes, no paciente em decúbito dorsal, com o uso de um esfigmomanômetro, com intervalo de 1min, imediatamente antes da realização do exame da reatividade microvascular. O valor médio entre as duas aferições foi utilizado como a pressão arterial do paciente.

### **5.9 Coletas de sangue e análises bioquímicas**

As amostras de sangue foram coletadas no laboratório do próprio INC, após jejum noturno de 12 horas . As avaliações bioquímicas foram realizadas por meio de método automatizado (ARCHITECT ci8200, Abbott ARCHITECT®, Abbott Park, IL, EUA), utilizando kits comerciais (Abbott ARCHITECT c8000®, Abbott Park, IL, EUA). As concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total, e HDL-c foram determinadas pelos métodos enzimático-colorimétricos: glicerol fosfato oxidase/peroxidase, colesterol oxidase/peroxidase e detergente direto, respectivamente. Os valores de LDL-c foram obtidos de acordo com a fórmula de FRIEDEWALD et al (1972). Quando o valor de triglicerídeos foi superior a 400 mg/dL foi realizada a análise de forma direta do LDL-c. Os níveis séricos de Apolipoproteína A-1 (Apo A-1) e Apolipoproteína B (Apo B) foram mensurados por imunoturbidimetria. A glicemia de jejum foi medida pelo método glicose oxidase / peroxidase.

### **6.0 Quantificação das células progenitoras endoteliais**

As CPE foram definidas como células que possuíam características progenitoras definidas pelos marcadores CD34+ e CD133, características de células endoteliais definidas

pelo marcador CD309, excluindo-se os leucócitos definidos pelo marcador CD45. Assim as CPE foram definidas como células CD34+CD133+CD309+CD45-.

Para a quantificação destas células, foi utilizada amostra de 2mL de sangue integral. Para a marcação dos antígenos de superfície foram adicionados 0,7 ml dos seguintes anticorpos conjugados com fluorocromos: CD45 Percp, CD34 FITC, CD133/2 PE e CD309 (VEGFR-2/KDR) APC(Biotec®).

A amostra foi homogeneizada em agitador de soluções marca Phoenix Lufenco modelo AP56 e colocada em câmara escura por 20 minutos. Após esse intervalo, foram adicionados 200ml de solução BD lise e colocada novamente em câmara escura por 15 minutos para a lise das hemácias. Após este período, a amostra foi lavada com 200 ml de solução salina PBS e centrifugada por 5 minutos a 2000 rotações por minuto.

A amostra com células foi levada para citômetro de Canto da marca BD®, para a obtenção das células marcadas. A quantificação das CPE foi realizada através do software do fabricante e obtida em duplicata para cálculo de média.

O número de CPE foi expresso como percentual do número total de leucócitos do sangue.

### **6.1 Avaliação da função endotelial microvascular:**

A reatividade microvascular cutânea foi avaliada por meio da técnica de *Laser Speckle Contrast Imaging*, com protocolo estabelecido previamente (SOUZA et al 2014). O sistema de fluxometria de laser *speckle* (comprimento de onda de 780 nm; PeriCam PSI-NR, Perimed AB, Järfälla, Suécia) acoplado ao sistema farmacológico de microiontoforese (PeriIont, Perimed AB) foi utilizado para a avaliação não-invasiva e em tempo real das variações da vasodilatação da microcirculação da pele independentes (estímulo nitroprussiato de sódio-NPS) e dependente (estímulo acetilcolina- Ach e hiperemia reativa pós-oclusiva - HRPO) do endotélio.

Os pacientes permaneceram 10min em posição supina em ambiente com temperatura controlada (23°C) antes do início da realização do exame. Os pacientes foram orientados a não consumir alimentos ricos em polifenóis nos 3 dias anteriores da consulta,

não consumirem cafeína, álcool ou alimentos ricos em gordura e não praticarem atividade física intensa no dia anterior da consulta. Caso o indivíduo fosse tabagista, deveria permanecer pelo menos 12 horas sem fumar. As medicações deviam ser ingeridas normalmente.

Foram determinadas três áreas de medida com aproximadamente 80 milímetros na pele na face ventral do antebraço com aproximadamente 5 cm de distância entre eles, evitando-se áreas de pelos, pigmentações alteradas e escoriações. Em duas áreas foram instalados eletrodos para a infusão dos fármacos através de discos adesivos (LI611, Perimed, Jarfalla, Suécia) e a terceira era adjacente aos eletrodos para aferição da HRPO.

Após medir o fluxo em repouso durante 5 minutos, que foram considerados como valores basais, quatro doses de ACh (2% peso/volume, Sigma Chemical CO, USA) foram entregues por meio de iontoforese cutânea utilizando uma corrente anódica. No outro eletrodo aplicado, quatro doses de uma solução de NPS (2% peso/volume, Sigma Chemical CO, USA) foram administrados utilizando uma corrente catódica (com as mesmas taxas e intervalos como para ACh).

O teste de hiperemia reativa pós oclusiva (HRPO) foi realizado com o auxílio de um esfigmomanômetro localizado na porção distal do braço do paciente. Foi realizada a oclusão de fluxo através do aumento da pressão até 50 mm Hg acima da pressão arterial sistólica ao longo de um intervalo de 3 minutos. Imediatamente após a liberação da pressão, o fluxo máximo foi registrado. As imagens foram analisadas pelo software do fabricante (PIMSoft, Perimed, Järfälla, Sweden) por profissional treinado.

As medidas de fluxo microvascular cutâneo em unidades arbitrárias de perfusão (UAP) foram divididas pela pressão arterial média (PAM) para gerar dados de condutância vascular cutânea (CVC) expressas em unidades de UAP/mmHg. A pressão arterial média foi calculada como  $PAD + [(PAS-PAD)/3]$

A figura 2 ilustra a realização do exame.





Figura 2 A:Fluxometria Laser Speckle com transdutor incidindo luz laser sobre a pele. B:Iontoforese com administração da droga na câmara do eletrodo para o teste de reatividade microvascular e esfigmomanômetro posicionado para o teste de hiperemia pós reativa. Núcleo integrado de investigação cardiovascular ( INC).

### 6.3 Recursos financeiros

O projeto contou com o apoio financeiro do programa PPSUS/Faperj (Número do Processo: E-26/110.276/2014.) e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro para compra dos anticorpos necessários para análise de CPE.

Foi concedida uma bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para a aluna de mestrado durante todo o período da pesquisa. Também foi concedida uma bolsa de Pesquisa de Iniciação Científica pelo Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (InCor/HCFMUSP) para uma aluna do curso de graduação em Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, que auxiliou na execução do projeto de pesquisa.

## 6.8 Análise Estatística:

A normalidade das variáveis foi investigada através do teste *Shapiro-Wilk*. Para a comparação entre grupos das variáveis paramétricas foi utilizado o teste *t de Student*. Para a comparação entre grupos das variáveis não paramétricas foi utilizado teste *Mann-Whitney*. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  DP ou mediana (25% - 75%).

As variáveis categóricas foram apresentadas em número e percentual. Para avaliar as diferenças entre os grupos nas variáveis categóricas foi utilizado o teste qui-quadrado.

Para análise de correlação entre as variáveis contínuas foi utilizado o teste de Spearman.

As análises estatísticas foram realizadas no software IBM® SPSS® *Statistics* versão 21. Foi estabelecido um nível de significância de 5%.

## **6-Resultados**

Foram avaliados 4800 exames laboratoriais no sistema informatizado do laboratório do INC, dos quais 4520 exames foram excluídos por não atenderem ao critério de inclusão e foram selecionados 280 pacientes com LDL-c alterado para triagem complementar. Destes, 198 pacientes foram excluídos por não possuírem histórico pessoal e/ou familiar de hipercolesterolemia e/ou doença cardiovasculares. Dentre os pacientes elegíveis, 28 foram excluídos, sendo finalmente avaliados 54 pacientes. A figura 3 demonstra o fluxograma de seleção de pacientes

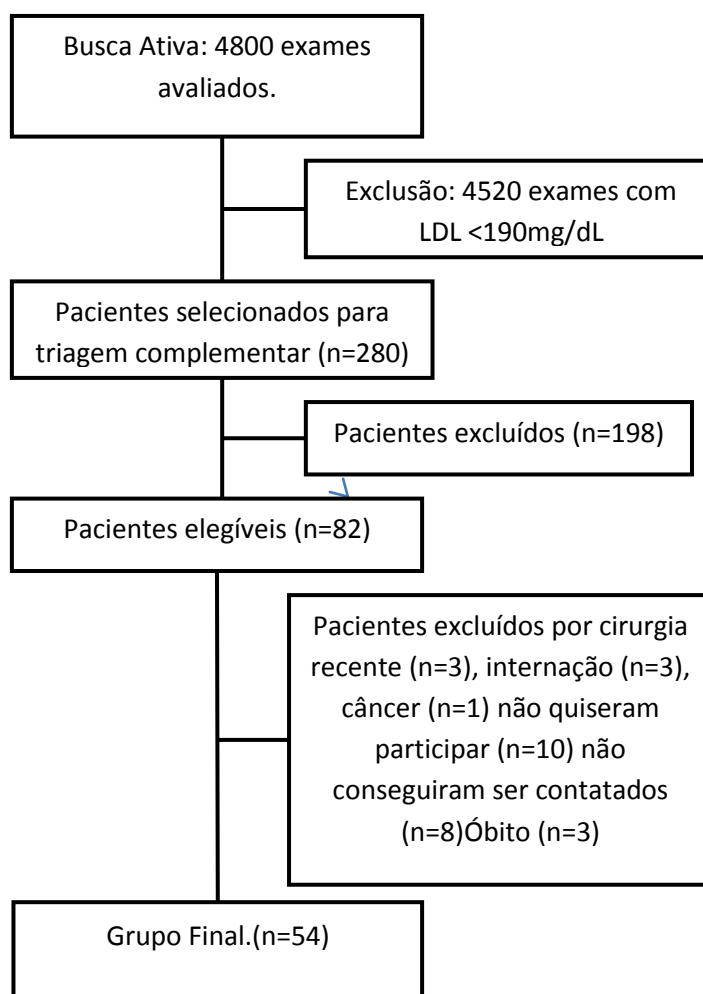


Figura 3 Fluxograma de Seleção dos pacientes.

A tabela 2 mostra as características demográficas e clínicas dos pacientes. O sexo feminino foi o mais frequente (72,2%). A comorbidade mais prevalente foi a hipertensão (64,8%), seguida da diabetes mellitus (24,1%). A maioria dos pacientes era ex-tabagista (51,9%). História de angina instável e infarto agudo do miocárdio foram encontrados em 34,6% e 32,1%, respectivamente. Foi observada uma média de IMC elevada, indicando uma alta prevalência de excesso de peso (64,8%) associada ao aumento da gordura visceral avaliada pela alta prevalência de perímetro da cintura aumentado (86,7% ).

**Tabela 2: Dados demográficos e características clínicas**

<b>Variáveis</b>	<b>Média ou Número Absoluto</b>	<b>Desvio Padrão ou Percentual</b>
<b>Idade (anos)</b>	54,24	±12,93
<b>Sexo Feminino</b>	39	72,2%
<b>Idosos</b>	19	35,2%
<b>Cor- Não Brancos</b>	30	55,6%
<b>Hipertensos</b>	35	64,8%
<b>Tempo de HAS(anos)</b>	7,40	±8,75
<b>PAS (mmHg)</b>	144,11	±24,65
<b>PAD (mmHg)</b>	81,31	±12,22
<b>Diabéticos</b>	13	24,0%
<b>Tempo de DM (anos)</b>	12,21	±8,56
<b>Excesso de Peso</b>	35	64,8%
<b>Tabagistas</b>	5	9,2%
<b>Arco Corneano</b>	6	11,1%
<b>Xantelasmas</b>	4	7,4
<b>História de evento cardiovascular</b>	29	53,7%
<b>História de angina</b>	18	33,3%
<b>História de AVE</b>	1	1,8%

<b>História de IAM</b>	17	31,4%
<b>História de angioplastia</b>	15	27,7%
<b>CRVM prévia</b>	10	18,5%
<b>CT( mg/dL)</b>	244,51	±67,09
<b>LDL-c (mg/dL)</b>	168,23	±52,91
<b>HDL-c(mg/Dl)</b>	49,98	±11,05
<b>Relação LDL/HDL</b>	3,49	±1,30
<b>Triglicerídeos§ (mg/dL)</b>	132	(88,00-177,50)
<b>Glicemia( mg/dL)</b>	111,65	±55,91
<b>Apo A1 (mg/dL)</b>	138,41	±20,44
<b>Apo B (mg/dL)</b>	116,93	±33,52
<b>IMC(Kg/m<sup>2</sup>)</b>	28,00	±5,56
<b>Gordura Corporal (%)</b>	37,21	±9,30
<b>PC (cm)</b>	96,05	±11,62

Os valores são expressos como n (%) ou Média ± DP. § Os valores são expressos Média ± DP, Mediana (25o - 75o percentil); HAS: Hipertensão arterial Sistêmica; PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica; .DM: Diabetes Mellitus; AVE: acidente vascular encefálico, IAM: infarto agudo do miocárdio, CRVM: cirurgia de revascularização do miocárdio, CT: Colesterol Total; LDL-c: Colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: Colesterol da lipoproteína de alta densidade, Apo: Apolipoproteína; IMC: Índice de Massa Corporal, PC: Perímetro da Cintura.

Cinquenta pacientes (92,5%) eram acompanhados por cardiologistas e 47 (87%) faziam uso de medicação hipolipemiante. Apesar de todos os pacientes relatarem estar fazendo uso contínuo da medicação no momento da consulta, metade dos pacientes relataram já ter parado de tomar a medicação hipolipemiante em algum momento do tratamento.

A tabela 3 demonstra as medicações mais utilizadas pelos pacientes.

**Tabela 3: Medicções utilizadas pelos pacientes no momento da consulta.**

<b>Fármaco</b>	<b>Número</b>	<b>Percentual</b>
<b>Estatinas</b>	40	74,1
<b>Ezetimibe</b>	5	9,3
<b>Ezetimibe+ Atorvastatina</b>	3	5,6
<b>Fibratos</b>	9	16,7
<b>Nenhuma droga hipolipemiante</b>	7	13
<b>Associações de drogas hipolipemiantes</b>	10	18,5
<b>Hipoglicemiantes</b>	10	18,9
<b>Inibidor da enzima de conversão da angiotensina</b>	16	29,6
<b>Beta- Bloqueador</b>	27	50
<b>Nitrato</b>	7	13
<b>Antagonista do Receptor de Angiotensina II</b>	14	25,9
<b>Bloqueador de Canal de Cálcio</b>	7	13
<b>Diuréticos</b>	16	29,6
<b>Ácido Acetilsalicílico</b>	17	31,5

Os valores são expressos como n (%).

A tabela 4 descreve os parâmetros funcionais da avaliação da reatividade microvascular no grupo.

**Tabela 4: Vasodilatação máxima pelo estímulo da iontoforese com acetilcolina, nitroprussiato de sódio e hiperemia reativa pós oclusiva e área sob a curva da vasodilatação induzida por acetilcolina e nitroprussiato de sódio.**

<b>Variáveis</b>	<b>Média± Desvio Padrão</b>
<b>Máxima Vasodilatação</b>	
CVC Pico-Basal HRPO (APU/mmHg)	0,38 (0,12)
Incremento CVC Pico-Basal HRPO (%)	192,33 (58,19)
CVC Pico-Basal Ach(APU/mmHg)	0,26(0,18)
Incremento CVC Pico-Basal Ach (%)	229,13(51,29)
CVC Pico-Basal NPS(APU/mmHg)	0,14(0,11)
<b>Área sob a curva</b>	
Acetilcolina (APU/S)	4917,122(3404,3084)
Nitroprussiato(APU/S)	2879,00(2410,823)

Os valores são expressos como Média ± Desvio Padrão. APU: Unidades arbitrárias de perfusão; s: segundos; CVC: condutância vascular cutânea; HRPO: Hiperemia reativa pós-oclusiva; mmHg: milímetros de mercúrio; Ach: Acetilcolina; NPS: Nitroprussiato de Sódio.

Foi observada uma correlação negativa entre a área sob a curva da vasodilatação induzida por acetilcolina e a pontuação do diagnóstico de HF (Tabela 5).

**Tabela 5: Correlações entre os parâmetros de função endotelial e variáveis clínicas.**

	CVC Ach		AUC Ach		CVC NPS		AUC NPS		HRPO	
	r	p	r	p	r	P	r	p	r	p
Idade	-0,096	0,514	0,039	0,791	-0,122	0,405	-0,098	0,504	0,065	0,656
Glicemia	-0,273	0,066	-0,040	0,794	0,146	0,332	0,184	0,220	-0,074	0,627
Triglicerídeos	-0,089	0,557	0,038	0,800	0,117	0,440	-0,037	0,806	-0,059	0,695
HDL	-0,048	0,748	-0,076	0,613	0,032	0,831	0,071	0,635	-0,239	0,105
LDL	-0,028	0,850	-0,108	0,472	0,093	0,536	0,042	0,780	0,101	0,501
Apo-A1	-0,138	0,361	-0,097	0,521	0,062	0,684	0,102	0,502	-0,043	0,787
ApoB	-0,107	0,481	-0,149	0,323	0,013	0,932	-0,073	0,631	0,118	0,436
CPE	0,243	0,126	0,121	0,451	0,018	0,913	0,091	0,573	-0,229	0,150
IMC	0,597	0,211	0,596	0,212	0,208	0,693	0,364	0,478	0,732	0,098
PC	0,058	0,694	0,184	0,206	-0,058	0,693	-0,129	0,377	0,011	0,941
Pontuação do Escore de Diagnostico	-0,150	0,309	<b>-0,294</b>	<b>0,043</b>	-0,095	0,522	0,044	0,764	0,010	0,946

CVC: condutância vascular cutânea; AUC: Área sob a curva ; ACh: Acetilcolina; NPS: Nitroprussiato de Sódio; ; HRPO: Hiperemia reativa pós-oclusiva; LDL-c: Colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: Colesterol da lipoproteína de alta densidade, Apo: Apolipoproteína; CPE: Células progenitoras endoteliais; IMC: Índice de Massa Corporal, PC: Perímetro da Cintura. \*Teste de Spearman

Em relação a quantificação de CPE, 7 amostras do grupo ficaram inviáveis para análise. Entre as amostras analisadas foi encontrado um número médio de  $0,0005 \pm 0,0005\%$  de CPE. O número de CPE se correlacionou positivamente com níveis de HDL-c e Apo A1 e negativamente com níveis de triglicerídeos, conforme demonstrado na tabela 6.



**Tabela 6: Correlações entre o número de células progenitoras endoteliais e variáveis clínicas:**

Variáveis	CPE	
	R	p
Idade	0,217	0,174
Glicemia	-0,195	0,223
Triglicerídeos	<b>-0,428</b>	<b>0,005</b>
CT	0,058	0,719
HDL	<b>0,469</b>	<b>0,002</b>
LDL	-0,003	0,987
Apo-A1	<b>0,392</b>	<b>0,011</b>
ApoB	-0,147	0,359
PAS	-0,179	0,603
PAD	0,359	0,263
PC	0,206	0,197
Pontuação	-0,172	0,289

CPE: Células progenitoras endoteliais; CT: Colesterol total ; HDL-c: Colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: Colesterol da lipoproteína de baixa densidade; Apo: Apolipoproteína; PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica; PC: Perímetro da Cintura. \*Teste de Spearman

### **Resultados estratificados por diagnóstico clínico de HF:**

Quinze pacientes (27,7%) apresentaram diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar, dos quais somente 2 pacientes possuíam diagnóstico prévio.

Os pacientes com HF realizaram mais cirurgias de revascularização do miocárdio ( $p=0,04$ ). Em relação às manifestações clínicas da HF a presença de arco corneano foi superior no grupo HF ( $p=0,05$ ), porém a presença de xantelasma não diferiu entre os grupos. Não foi observada presença de xantomas em nenhum paciente. Também foram observados níveis significativamente maiores de LDL-c e APO-B no grupo HF. A tabela 7 resume a comparação entre as principais variáveis em indivíduos com diagnóstico clínico definitivo de HF e os sem diagnóstico.

**Tabela 7: Dados demográficos e características clínicas, bioquímicas, antropométricas e de composição corporal dos indivíduos com diagnóstico clínico de HF e sem diagnóstico.**

Variáveis	Grupo HF (n=15)	Grupo SD( n=39)	P
<b>Idade (anos)</b>	52,33 (±15,39)	54,97 (±12,00)	0,507
<b>Sexo feminino</b>	11 (73,3)	28 (71,8)	0,910
<b>Hipertensos</b>	8 (53,3)	27 (69,2)	0,384
<b>Diabéticos</b>	3 (20)	10 (25,6)	0,731
<b>Excesso de peso</b>	8 (53,4)	27 (69,2)	0,351
<b>Tabagistas</b>	0 (0)	5 (12,8)	0,334
<b>Arco Corneano</b>	4 (26,7)	2 (5,6)	0,05
<b>Xantelasmas</b>	2 (13,3)	2 (5,6)	0,347
<b>Angina</b>	6 (42,9)	12 (31,6)	0,556
<b>AVE</b>	0 (0)	1 (2,6)	0,664
<b>IAM</b>	7 (46,7)	10(26,3)	0,208
<b>Angioplastia</b>	3 (20)	12(32,4)	0,514
<b>CRVM</b>	6 (40)	4 (10,5)	0,042
<b>CT( mg/dL)</b>	255,64 (± 89,60)	240,30 (± 58,13)	0,478
<b>LDL-c (mg/dL)</b>	196,78 (±51,86)	157,41 (±50,51)	0,018
<b>HDL-c(mg/Dl)</b>	52,07 (±10,49)	49,38 (±11,39)	0,449
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	125,00(85,00-165,50)	134,00 (91,00-200,00)	0,565
<b>Glicemia( mg/dL)</b>	115,92 (±73,62)	109,94 (±48,27)	0,739
<b>Apo A1 (mg/dL)</b>	141,36 (±22,59)	137,22 (±19,74)	0,528
<b>Apo B (mg/dL)</b>	134,55 (±38,52)	109,88 (± 28,98)	0,018
<b>IMC(Kg/m<sup>2</sup>)</b>	27,13(±6,00)	28,34 (±5,42)	0,408
<b>Gordura Corporal (%)</b>	38,21 (±10,03)	36,88 (±9,12)	0,717
<b>PC (cm)</b>	95,45 (±10,36)	96,29 (±12,18)	0,815

Os valores são expressos como n (%), Média ± DP ou , Mediana (25o - 75o percentil). DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão arterial; PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica,;AVE: acidente vascular encefálico, IAM: infarto agudo do miocárdio, CRVM: cirurgia de revascularização do miocárdio.. CT: Colesterol total ; HDL-c: Colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: Colesterol da lipoproteína de baixa densidade; Apo:Apolipoproteína; IMC: Índice de Massa Corporal, PC: Perímetro da Cintura.

Conforme descrito na tabela 8, os parâmetros funcionais da avaliação da reatividade microvascular não demonstraram diferenças significativas entre os grupos. A CVC máxima durante iontoforese de acetilcolina foi de  $0,20 \pm 0,16$  APU/mmHg no grupo HF e de  $0,28 \pm 0,19$  APU/mmHg no grupo SD. Não houve diferença no aumento da CVC induzida pela resposta vasodilatadora da hiperemia reativa pós oclusiva entre os grupos (HF:  $0,36 \pm 0,09$  APU/mmHg ; SD:  $0,38 \pm 0,13$  APU/mmHg).

**Tabela 8: Vasodilatação máxima pelo estímulo da iontoforese com acetilcolina, nitroprussiato de sódio e hiperemia reativa pós oclusiva e área sob a curva da vasodilatação induzida por acetilcolina e nitroprussiato de sódio.**

Variáveis	Grupo HF(n=15)	Grupo SD( n=39)	P
<b>Máxima vasodilatação</b>			
CVC Pico-Basal HRPO (APU/mmHg)	$0,36 \pm 0,09$	$0,38 \pm 0,13$	0,637
CVC Pico-Basal Ach(APU/mmHg)	$0,28 \pm 0,0$	$0,20 \pm 0,0$	0,185
CVC Pico-Basal NPS(APU/mmHg)	$0,16 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02$	0,247
<b>Área sob a curva</b>			
Acetilcolina (APU/S)	$3573,26 \pm 2623,93$	$5431,29 \pm 3702,20$	0,072
Nitroprussiato(APU/S)	$3081 \pm 432,1$	$2832 \pm 600,9$	0,742

Os valores são expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. Teste T Student para comparação entre os grupos. APU: Unidades arbitrárias de perfusão; s: segundos; CVC: condutância vascular cutânea; HRPO: Hiperemia reativa pós-oclusiva; mmHg: milímetros de mercúrio; ACh: Acetilcolina; NPS: Nitroprussiato de Sódio.

Não houve diferença no incremento da CVC durante o estímulo com acetilcolina, porém ao avaliar a área sob a curva da vasodilatação induzida pela acetilcolina, foi observada uma tendência a diminuição deste parâmetro no grupo HF( $p=0,072$ ), o que está relacionado a uma menor resposta do endotélio e pode indicar disfunção endotelial.

A figura 4 ilustra a diferença entre a área sob a curva da vasodilatação induzida por acetilcolina entre os grupos e a área sob a curva da vasodilatação induzida por nitroprussiato de sódio.

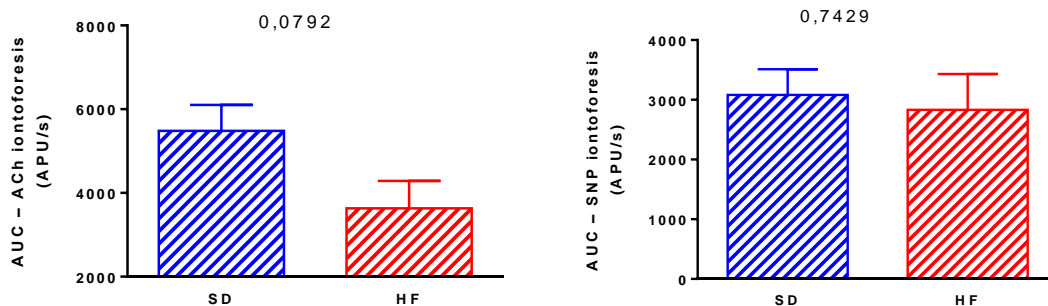


Figura 4: Área sob a curva da resposta vasodilatadora induzida por estímulo farmacológico com acetilcolina e nitroprussiato de sódio.

Em relação à quantificação de CPE, não foram encontradas diferenças significativas nos valores de CPE entre os grupos.

**Tabela 9: Quantificação de Células Progenitoras Endoteliais.**

Variáveis	Grupo HF(n=14)	Grupo SD( n=33)	P
CPE (%/Leucócitos totais)	0,0004 ±0,0001	0,0005 ±0,0005	0,105

Os valores são expressos como Média ± DP. Foi utilizado Teste *t Student* para comparação entre os grupos. Os valores foram expressos em percentual dos leucócitos totais.

## **7-Discussão**

O aumento dos níveis de colesterol é um dos principais fatores responsáveis pela agressão ao endotélio vascular (HOLOWATZ et al 2011) e tem sido apontado como causa de alteração da estrutura e função vascular, uma vez que pode interferir na função endotelial bem como levar ao surgimento de lesões ateroscleróticas; (STAPLETON et al 2010). Nesse contexto, o estudo das alterações microvasculares e das CPE em pacientes com hipercolesterolemia grave, realizado neste trabalho, tem importância no sentido de avaliar mecanismos fisiopatológicos existentes nessa condição, e a comparação entre grupos com ou sem diagnóstico de HF se baseia na possibilidade de maior acometimento dos pacientes com HF, dentre o conjunto de pacientes com hipercolesterolemia grave.

No presente estudo foi observada uma pior função endotelial nos indivíduos com hipercolesterolemia grave em comparação com dados encontrados na literatura em indivíduos saudáveis (SOUZA et al 2014). Em estudo que comparou os parâmetros de função endotelial microvascular utilizando a técnica laser speckle em indivíduos saudáveis com média de idade de  $42,1 \pm 0,6$  anos e indivíduos com DAC precoce com média de idade de  $42,6 \pm 0,5$  anos, a medida da área sob a curva da vasodilatação induzida por acetilcolina foi significativamente maior no grupo controle. Esse valor também foi superior ao encontrado nesse estudo ( $7258 \pm 730$  UAP/s no grupo controle e  $3723 \pm 789$  UAP/s no grupo de pacientes com DAC). Assim o tempo e intensidade da vasodilatação dependente do endotélio parecem também estar diminuídos nos indivíduos com hipercolesterolemia grave, se assemelhando aos resultados encontrados em pacientes com histórico de doença cardiovascular precoce. CORDOVIL et al (2012) também observaram uma menor vasodilatação dependente do endotélio após estímulo com Ach e HRPO em pacientes dislipidêmicos com média de idade de  $62,2 \pm 1,2$  anos quando comparados com indivíduos jovens saudáveis utilizando a técnica de fluxometria LSCI . Enquanto o valor de incremento na condutância vascular cutânea induzida por estímulo de Ach encontrado em nosso estudo se assemelhou ao encontrado no grupo de dislipidêmicos moderados (Incremento de CVC Ach  $143,7 \pm 14,57\%$  ), observamos que o incremento na vasodilatação induzida pela HRPO foi maior no presente estudo quando comparado com os pacientes

hipercolesterolêmicos moderados ( Incremento de CVC HRPO  $123,9\pm 7,47\%$  ) ficando mais próximos aos valores encontrados no grupo controle ( $241,3\pm 25,7\%$ ).

A presença de disfunção endotelial em pacientes com hipercolesterolemia grave já é bem documentada em diversos estudos (AGGON et al 2001, DE JONGH et al 2002, FERREIRA et al 2007, VLAHOS et al 2014). VLAHOS et al 2014 encontraram uma piora na função endotelial de crianças com HF quando comparadas com crianças saudáveis, confirmando a necessidade de acompanhamento e tratamento de indivíduos com dislipidemia grave tão logo o diagnóstico seja realizado. ZHONG-XUAN YE et al (2007), ao estudar 32 pacientes com diagnóstico genético de HF com idade média de  $36,0\pm 17,8$  anos e 34 pacientes com média de idade de  $42,1\pm 17,0$  anos sem HF, observaram que os indivíduos HF possuíam uma menor DFM. Em metanálise de 2010, MASOURA et al, analisaram 51 estudos que avaliaram a função endotelial e a presença de aterosclerose subclínica em 4057 pacientes com HF e 732 pacientes com Hiperlipidemia Familiar Combinada (HFC) e observaram que tanto a vasodilatação dependente do endotélio como a vasodilatação não dependente do endotélio foram significativamente menores nos grupos de pacientes com HF e HFC quando comparados com indivíduos saudáveis. Dentre os mecanismos propostos para a disfunção endotelial na hipercolesterolemia estão o aumento da degradação de ON, a deficiência de L-arginina e de tetrahydrobiopterina (BH4) e o aumento da dimetilarginina assimétrica (ADMA), que é um inibidor endógeno da oxido nítrico sintase. Estudos anteriores demonstraram que a disfunção microvascular induzida por hipercolesterolemia está relacionada com níveis de LDL-c , pela presença de LDL oxidada e ativação do LOX-1 levando a uma redução progressiva da vasodilatação dependente do endotélio (KENNEY et al 2013).

Geralmente indivíduos com dislipidemia de origem genética são cronicamente expostos a concentrações elevadas de colesterol plasmático, sendo propensos a desenvolver disfunção endotelial e aterosclerose de maneira precoce (MASOURA et al 2010). No entanto, a literatura aponta que determinados tipos de mutação genética podem gerar maior gravidade da hipercolesterolemia e suas consequências clínicas (JUNYENT et al 2010) enquanto outros indivíduos com alterações genéticas evoluem com baixos níveis de LDL-c plasmático. Ao separarmos os indivíduos entre os que tinham diagnóstico clínico definitivo de HF e os que tinham suspeita clínica, foi observada uma tendência à redução da área sob

a curva da resposta vasodilatadora ao estímulo farmacológico com acetilcolina no grupo HF ( $p=0,07$ ). Tal resultado poderia estar relacionado com os valores significativamente maiores de LDL-c observados nesses indivíduos, uma vez que diversos estudos já relacionaram a gravidade da hipercolesterolemia com o grau de comprometimento endotelial e aparecimento de DCV (MASOURA et al 2010, LINS et al 2013). Entretanto, como não foi encontrada correlação entre os níveis de LDL-c e os parâmetros de função endotelial microvascular mas sim uma correlação inversa entre a pontuação do escore de diagnóstico utilizado e a área sob a curva da vasodilatação induzida por Ach, pode-se sugerir que quanto maior a associação e intensidade dos fatores de risco como história precoce ou familiar de DCV e níveis elevados de LDL-c, maior a injúria do endotélio com consequente diminuição da sua capacidade de vasodilatação.

Em estudo de LEWANDOWSKI et al (2014), não foi encontrada diferença significativa na DFM de indivíduos com HF detectada geneticamente e indivíduos com suspeita clínica de HF porém sem diagnóstico genético. Entretanto, houve uma diminuição significativa desse parâmetro em ambos os grupos quando comparados com indivíduos saudáveis, o que provavelmente também seria observado caso fosse feita a comparação do grupo avaliado no presente estudo com indivíduos saudáveis. Os autores sugeriram que a DFM poderia ser utilizada para detectar a disfunção das células endoteliais de maneira precoce de forma que antecederesse o processo aterosclerótico tanto em pacientes hipercolesterolêmicos de causa não genética como em pacientes com HF.

No presente estudo, as CPE também foram avaliadas devido à sua capacidade de contribuir para a restauração das células endoteliais e da função endotelial, sendo utilizadas como um indicador da capacidade de reparo endotelial do organismo (LIANG-YU LIN et al 2014, ASAHARA 1997). Foi observada uma relação direta entre o aumento dos níveis de HDL-c e Apolipoproteína A1 e os níveis de CPE no grupo estudado. A mesma relação foi encontrada em estudo de Rossi et al 2010, ao estudar 41 homens e 39 mulheres com LDL-c aumentado e média de idade de  $41,6 \pm 2,2$  anos. Eles observaram que indivíduos com baixos níveis de HDL-c possuíam menores níveis de CPE e menor capacidade de migração destas células em relação aos indivíduos hipercolesterolêmicos com níveis normais de HDL-c, indicando que o número e funcionalidade das CPE são fortemente influenciados pelos níveis de HDL-c. Em outro estudo com 122 indivíduos adultos jovens saudáveis, DEI

CAS et al (2011) também observaram uma relação direta entre os níveis de HDL-c e os níveis de CPE. A mesma relação foi observada em 116 pacientes com DAC onde o HDL-c plasmático se relacionou positivamente com o número de células CD34+KDR+.

Dentre os mecanismos que podem explicar essa relação, PEUTOMENOS et al 2009 observaram in vitro que o HDL-c inibiu a apoptose das CPE, favorecendo a sua diferenciação e proliferação. Inibição da apoptose também foi observada por NOOR et al 2007. Em ratos observou-se que a infusão de HDL-c reconstituída aumentou o número de CPE circulantes (TSO et al, 2006), e promoveu a diferenciação de células mononucleares em CPE e aumentou a sua capacidade angiogênica(SUMI et al, 2007). Em um pequeno estudo com 7 pacientes com DM do tipo 2, VAN OOSTROM et al 2007, observaram aumento na concentração de CPE após 7 dias de uma infusão com HDL reconstituído.

O efeito benéfico do HDL-c sobre o número e função das CPE pode ser uma das explicações para as ações de proteção vascular do HDL-c em situações patológicas.

Apesar de ser esperada uma associação entre os níveis de LDL-c e CPE como o encontrado em alguns trabalhos (CHEN et al 2004, HILL et al 2003) tal resultado não foi observado nos pacientes avaliados. Esse achado provavelmente está relacionado ao fato de todos os indivíduos possuírem altos níveis de CT e LDL-c com pouca diferença nas concentrações de LDL-c devido aos critérios de inclusão. A mesma falta de associação foi encontrada por alguns outros estudos com pacientes hipercolesterolêmicos e com fatores de risco cardiovascular (VASA et al 2001, ROSSI et al 2010).

Não foi observada diferença nos valores de CPE entre os indivíduos que possuíam HF clinicamente definida e os que não possuíam diagnóstico. RAMUNNI et al (2010) também não encontraram diferenças significativas entre os níveis de CPE de pacientes com HF e pacientes com hipercolesterolemia moderada de causa não genética. Entretanto o número de CPE foi significativamente menor em ambos os grupos quando comparados com indivíduos saudáveis assim como em estudo de FABBRI-ARRIGONI et al (2012), que observou níveis de CPE menores em crianças com HF quando comparadas com crianças saudáveis, apontando um aumento do risco cardiovascular com a exposição precoce a alterações lipídicas.

Os resultados encontrados no presente estudo apontam que a gravidade e comprometimento da função endotelial avaliada pela sua capacidade de vasodilatação ou da



sua capacidade de reparo através das CPE, estão mais relacionados com a gravidade da hipercolesterolemia do que com a sua causa, seja ela genética ou ambiental. Assim o tratamento otimizado da hipercolesterolemia deve ser indicado para todos os pacientes que mantenham níveis elevados de LDL-c a fim de reduzir a morbimortalidade nessa população.

### **8-Limitações**

O presente estudo apresenta limitações que podem ter influenciado os resultados encontrados. Por se tratar de uma população que já era acompanhada em um hospital de Cardiologia, a maioria dos pacientes já se encontrava em uso de medicação hipolipemiante, não sendo possível avaliar os valores de CT e LDL-c basais na maioria dos pacientes, o que impediria a inclusão de possíveis pacientes com HF cujos níveis elevados de CT e LDL-c já tivessem sido reduzidos pela medicação. Todavia, esse fato termina por resultar na seleção de uma população realmente grave por manter níveis lipídicos elevados a despeito do uso de hipolipemiantes pela maioria. Além disso, por serem utilizados critérios diagnósticos clínicos para a definição do grupo HF, é possível que alguns pacientes do grupo SD possuíssem diagnóstico genético não detectado. Porém, dada a importância dos efeitos do CT e do LDL-c sobre o endotélio vascular, como anteriormente discutido, a presença de alteração genética subjacente talvez possa ser considerada, isoladamente, um dado menos relevante. Por fim, devido ao pequeno número de pacientes, não foi possível excluir pacientes com outros fatores de risco que poderiam influenciar a função endotelial como HAS, DM e obesidade.

## **9-Conclusões**

- Os pacientes com hipercolesterolemia grave apresentaram alta prevalência de hipertensão arterial sistêmica, excesso de peso, gordura visceral e eventos cardiovasculares prévios.
- Dentre os pacientes com hipercolesterolemia grave, 27,7% possuía diagnóstico clínico definitivo de HF.
- Foi observada uma relação direta entre a pontuação do escore de diagnóstico da HF e a área sob a curva da vasodilatação induzida por Ach.
- Foi observada uma relação direta entre os valores de HDL-c e apolipoproteína A1 e os níveis de CPE, e uma relação inversa entre os níveis de TG e CPE.
- Houve uma tendência a menor resposta vasodilatadora dependente do endotélio de pacientes com diagnóstico clínico de HF
- Não houve diferença entre os valores de CPE nos grupos avaliados.

## **10-Referências Bibliográficas**

ABIFADEL M, VARRET M, RABÈS JP, ALLARD D, OUGUERRAM K, DEVILLERS M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34(2):154-156.

AGGOUN Y, BONNET D, SIDI D, GIRARDET JP, BRUCKER E, POLAK M et al. Arterial mechanical changes in children with familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:2070–2075.

ALLARD MD, SAEEDI R, YOUSEFI M, FROHLICH J. Risk stratification of patients with familial hypercholesterolemia in a multi-ethnic cohort. *Lipids Health Dis.* 2014 ;13:65.

AL-RASADI K, AL-WAILI K, AL-SABTI HA, AL-HINAI A, AL-HASHMI K, AL-ZAKWANI I et al. Criteria for Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia: A Comprehensive Analysis of the Different Guidelines, Appraising their Suitability in the Omani Arab Population. *Oman Med J.* 2014;29(2):85-91.

ALVES AC, MEDEIROS AM, FRANCISCO V, GASPAR IM, RATO Q, BOURBON M. Molecular diagnosis of familial Hypercholesterolaemia: an important tool for cardiovascular risk stratification. *Rev Port Cardiol.* 2010;29(6):907-921.

ANDO J & YAMAMOTO K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2011; 15(5):1389-1403.

ANDRADE JPD, MATTOS LAP, CARVALHO AC, MACHADO CA, OLIVEIRA, GMM. Programa nacional de qualificação de médicos na prevenção e atenção integral às doenças cardiovasculares *Arq. bras. cardiol* 2013;100(3):203-211

ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cell for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-

ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-228.

AUSTIN MA, HUTTER CM, ZIMMERN RL, HUMPHRIES SE. Genetic causes of monogenic heterozygous Familial Hypercholesterolaemia: a huge prevalence review. *Am J Epidemiol.* 2004;160:407-420.

BAIGENT C, BLACKWELL L, EMBERSON J, HOLLAND LE, REITH C, BHALA N et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 2010;376:1670-1681.

BARAC A, CAMPINA U, PANZA JA. Methods for evaluating endothelial function in humans. *Hypertension*. 2007;49(4):748-760.

BARBATO JE, TZENG E. Nitric oxide and arterial disease. *J Vasc Surg* 2004;40: 187-193.

BOURBON, M, Genetic factors and cardiovascular disease. *Rev Port Cardiol*. 2008;27(12): 1559-63.

BRIGUORI C, TESTA U, RICCIONI R, COLOMBO A, PETRUCCI E, CONDORELLI G et al. Correlations between progression of coronary artery disease and circulating endothelial progenitor cells. *Faseb J*. 2010;24:1981–1988.

CASTRO LCV, ; FRANCESCHINISCC; PRIORE SR; PELÚZIO MCG. Nutrição e doenças cardiovasculares: os marcadores de risco em adultos. *Rev. Nutr.* vol.17 no.3 Campinas July/Sept. 2004

CHEN JZ, ZHANG FR, TAO QM, WANG XX, ZHU JH, ZHU JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Sep;107(3):273-80.

CIVEIRA F, International Panel on Management of Familial Hyper-cholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2004; 173(1):55-68.

CIVEIRA F, ESTIBALIZ J, CENARRO A, GARCIA-OTIN AL, TEJEDOR D, ZAMBON et al. Frequency of Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Mutations in Patients With a Clinical Diagnosis of Familial Combined Hyperlipidemia in a Clinical Setting. *JACC*. 2008; 52( 19): 1546–1553.

CORDOVIL I, HUGUENIN G, ROSA G, BELLO A, KÖHLER O, DE MORAES R et al. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvascular Research*. 2012;83(3):376-379.

CRACOWISK JL, MINSON CT, SALVAT-MELIS M, HALLIWILL JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Pharmacological Science*. 2006; 27(9):503-508.

CROCE G, PASSACQUALE G, NECOZIONE S, FERRI C, DESIDERI G. Nonpharmacological Treatment of Hypercholesterolemia Increases Circulating Endothelial Progenitor Cell Population in Adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(5):e38–e39.

DAMGAARD D, MOGENS L, LARSEN PH, NISSEN JM, JENSEN HK, JENSEN VR et al. The relationship of molecular genetic to clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia in a Danish population. *Atherosclerosis*. 2005; 180: 155–160.

DAVIGNON, J, GANZ P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109: III-27-III-32.

DEBBABI H, BONNIN P, DUCLUZEAU PH, LEFTHÉRIOTIS G, LEVY BI. Noninvasive assessment of endothelial function in the skin microcirculation. *American Journal of Hypertens*. 2010;23:541–546.

DEI CAS A, SPIGONI V, ARDIGO D, PEDRAZZI G, FRANZINI L, DERLINDATI E et al. (2011). Reduced circulating endothelial progenitor cell number in healthy young adult hyperinsulinemic men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21: 512–517

DE CIUCEIS C, PORTERI E, RIZZONI D, RIZZARDI N, PAIARDI S, BOARI GEM, et al. Structural Alterations of Subcutaneous Small-Resistance Arteries May Predict Major Cardiovascular Events in Patients With Hypertension. *Am J Hypertens*. 2007;20(8):846-52.

DEFESCHE JC. Defining the challenges of FH screening for familial hypercholesterolaemia. *J Clin Lipidol*. 2010;4:338-341.

DE JONGH S, LILIE MR, BAKKER HD, HUTTEN BA, KASTELEIN JJ, STROES ES. Family history of cardiovascular events and endothelial dysfunction in children with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2002; 163:193–197

DIAS RG, NEGRÃO CE, KRIEGER MH. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(1):68-67.

ECKEL RH, JAKICIC JM, ARD JD, HUBBARD VS, JESUS JM DE, LEE I-M, et al. 2013 AHA/ACC Guideline on Lifestyle Management to Reduce Cardiovascular Risk A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014; 129: S76-S99.

EGUCHI M, MASUDA, H, ASAHARA T. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Clin Exp Nephrol*. 2007;11:18-25.

ELIS A, ZHOU R, STEIN EA. Effect of lipid-lowering treatment on natural history of heterozygous familial hypercholesterolemia in past three decades. *Am J Cardiol*. 2011 Jul 15;108(2):223-6. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.

EIZAWA T, IKEDA U, MURAKAMI Y, MATSUI K, YOSHIOKA T, TAKAHASHI M, MUROI K, SHIMADA K. Decrease in circulating endothelial progenitor cells in patients with stable coronary artery disease. *Heart*. 2004;90:685–686.

FABBRI-ARRIGONI FI, CLARKE L, WANG G, CHARAKIDA M, ELLINS E, HALLIDAY N et al. Levels of circulating endothelial cells and colony-forming units are influenced by age and dyslipidemia. *Pediatr Res*. 2012;72(3):299-304.

FELDMAN DI, BLAHA MJ, SANTOS RD, JONES SR, BLUMENTHAL RS, TOTH PP et al. Recommendations for the management of patients with familial hypercholesterolemia. *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17(1):473.

ERENCE BA, YOO W, ALESH I, MAHAJAN N, MIROWSKA KK, MEWADA A, KAHN J, AFONSO L, WILLIAMS KA SR, FLACK JM. Effect of long-term exposure to lower low-density lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: a Mendelian randomization analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Dec 25;60(25):2631-9.

FERREIRA WP, BERTOLAMI MC, SANTOS SN, BARROS MR, DE MATOS BARRETTO RB, PONTES SC JR et al. One-month therapy with simvastatin restores endothelial function in hypercholesterolemic children and adolescents. *Pediatr Cardiol*. 2007; 28:8-13

FERREIRA LB, ALBUQUERQUE AAS, CELOTTO AC. Fator hiperpolarizante derivado do endotélio e doenças cardiovasculares. *Rev Soc Cardiol*. 2011;21(2):40-45.

FICHTLSCHERER S, BREUER S, ZEIHNER AM. Prognostic Value of Systemic Endothelial Dysfunction in Patients With Acute Coronary Syndromes: Further Evidence for the Existence of the "Vulnerable" Patient. *Circulation*. 2004;110(14):1926.

ERENCE BA, YOO W, ALESH I, MAHAJAN N, MIROWSKA KK, MEWADA A, KAHN J, AFONSO L, WILLIAMS KA SR, FLACK JM. Effect of long-term exposure to lower low-density lipoprotein cholesterol beginning early in life on the risk of coronary heart disease: a Mendelian randomization analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Dec 25;60(25):2631-9.

FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;18(6):499-502

GENEST J, HEGELE RA, BERGERON J, BROPHY J, CARPENTIER A, COUTURE P et al. Canadian Cardiovascular Society position statement on familial hypercholesterolemia. *Can J Cardiol*. 2014;30(12):1471-1481.

GIRIBELA RGC, GENGO R, HONG V, CONSOLIM-COLOMBO FM. Função e disfunção endotelial: da fisiopatologia às perspectivas de uso em pesquisa e na prática clínica. *Rev Bras Hipertens*. 2011;8(1):27-32.

GNECCHI M, ZHANG Z, NI A, DZAU VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103:1204-1219.

GROVER-PÁEZ F. & ZAVALZA-GÓMEZ AB. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk. *Diabetes research and clinical practice*. 2009;84:1-10.

HALCOX JPJ, ANN E, DONALD AVS, ELLINS MA, WITTE DR, SHIPLEY MJ et al. Endothelial Function Predicts Progression of Carotid Intima-Media Thickness. *Circulation*. 2009;119:1005-1012.

HANSSON GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.

HEIGL F, HETTICH R, LOTZ N, REEG H, PFLEDERER T, OSTERKORN D, et al. Efficacy, safety, and tolerability of long-term lipoprotein apheresis in patients with LDL- or Lp(a) hyperlipoproteinemia: Findings gathered from more than 36,000 treatments at one center in Germany. *Atheroscler Suppl*. 2015 May;18:154-62.

HENRICSON J, TESSELAAR E, PERSSON K, NILSSON G, SJOBERG F. Assessment of microvascular function by study of the dose-response effects of iontophoretically applied drugs (acetylcholine and sodium nitroprusside)--methods and comparison with in vitro studies. *Microvasc Res*. 2007;73(2):143-149.

HILL J S, HAYDEN MR, FROHLICH, J, PRITCHARD PH. Genetic and Environmental Factors Affecting the Incidence of Coronary Artery Disease in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1991;11:290-297.

HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWIW MA, QUYYUMI AA et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600.

HOPKINS PN, TOTTH PP, BALLANTYNE CM, RADER DJ. National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia.; Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Clin Lipidol*. 2011;5:S9-17.

HOLOWATZ LA<sup>1</sup>, KENNEY WL. Acute localized administration of tetrahydrobiopterin and chronic systemic atorvastatin treatment restore cutaneous microvascular function in hypercholesterolaemic humans. *J Physiol*. 2011 Oct 1;589(Pt 19):4787-97. doi: 10.1113/jphysiol.2011.212100. Epub 2011 Aug 1.

HUMEAU-HEURTIER A, MAHE G, DURAND S, HENRION D, ABRAHAM P. Laser speckle contrast imaging: multifractal analysis of data recorded in healthy subjects. *Med Phys*. 2012;39(10):5849-5856.

IMANISHI T, HANO T, MATSUO Y, NISHIO I. Oxidised Low-density lipoprotein inhibits vascularendothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003; 30:665-670.

IMANISHI T, HANO T, SAWAMURA T, NISHIO I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2004; 31: 407–413.

JANNES CE, SANTOS RD, SILVA PRS, TUROLLA L GAGLIARDI AC, MARSIGLIA JD, et al. Familial hypercholesterolemia in Brazil: Cascade screening program, clinical and genetic aspects. *Atherosclerosis*. 2015. 238(1):101-107

JUNYENT M, GILABERT R, JARAUTA E, NÚÑEZ I, COFÁN M, CIVEIRA F, et al. Impact of low-density lipoprotein receptor mutational class on carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2010;208(2):437-41.

KENNEY WL, CANNON JG, ALEXANDER LM. Cutaneous microvascular dysfunction correlates with serum LDL and sLOX-1 receptor concentrations. *Microvascular Research*. 2013;85(0):112-117

LEVY BI, SCHIFFRIN EL, MOURAD J-J, AGOSTINI D, VICAUT E, SAFAR ME, et al. Impaired Tissue Perfusion: A Pathology Common to Hypertension, Obesity, and Diabetes Mellitus. *Circulation*. 2008;118(9):968-976.

LEIGH SE, FOSTER AH, WHITTAL RA, HUBBART CS, HUMPHRIES SE. Update an analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia data base. *Ann Hum Genet*. 2008;72 (PT 4):485-98.

LEREN TP, MANSHAUS T, SKOVHOLT U, SKODJE T, NOSSEN IE, TEIE C, et al. Application of molecular genetics for diagnosing familial hypercholesterolemia in Norway: results from a family-based screening program. *Semin Vasc Med*. 2004;4(1):75-85.

LEWANDOWSKI P, ROMANOWSKA-KOCEJKO M, W.GRZYN A, CHMARA M, ZUK M, LIMON J et al. Noninvasive assessment of endothelial function and vascular parameters in patients with familial and nonfamilial hypercholesterolemia. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*. 2014; 124 (10):516-524.

LIGUORI A, FIORITO C, BALESTRIERI ML, CRIMI E, BRUZZESE G, WILLIAMS-IGNARRO S, D'AMORA M, SOMMESE L, GRIMALDI V, MINUCCI PB, et al. Functional impairment of hematopoietic progenitor cells in patients with coronary heart disease. *Eur J Haematol*. 2008;80:258–264.

LIN LY, HUANG CC, CHEN JS, WU TC, LEU HB, HUANG PH, et al Effects of pitavastatin versus atorvastatin on the peripheral endothelial progenitor cells and vascular endothelial growth factor in high-risk patients: a pilot prospective, double-blind, randomized study. *Cardiovasc Diabetol*. 2014 Jul 16;13:111.

MAHÉ G, HUMEAU-HEUTIER A, DUARAND S, LEFTHERIOTIS G, ABRAHAM P. Assesment of skin microvascular function and dysfunction with laser speckle contrast imaging. *Circulation Cardiovascular imaging*. 2012;5:155-163.



MANCIA G, DE BACKER G, DOMINICZAK A, CIFKOVA R, FAGARD R, GERMANO G, et al. Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*. 2007;25(6):1105-1187.

MANSUR ADP, FAVARATO D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99:755-61.

MARKS D, THOROGOOD M, NEIL HA, HUMPHRIES SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*.2003;168:1-14.

MASANA L, CIVEIRA F, PEDRO-BOTET J, CASTRO I, POCOVÍ M, PLANA N et al. Consenso de expertos sobre la detección y el manejo clínico de la hipercolesterolemia familiar. *Clin Invest Arterioscl*. 2013;25(4):182-193.

MASOURA C, PITSAVOS C, AZNAOURIDIS K, SKOUMAS I, VLACHOPOULOS C, STEFANADIS C. Arterial endothelial function and wall thickness in familial hypercholesterolemia and familial combined hyperlipidemia and the effect of statins. A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2011;214:129–138.

MATA N, ALONSO R, BADIMÓN L, PADRÓ T, FUENTES F, MUÑIZ O. Clinical characteristics and evaluation of LDL-cholesterol treatment of the Spanish Familial Hypercholesterolemia Longitudinal Cohort Study (SAFEHEART). *Lipids in Health and Disease*. 2011; 10:94.

MATA P, ALONSO R, RUIZ A, GONZALEZ-JUANATEY JR, BADIMÓN L, DÍAZ-DÍAZ JL et al. Diagnóstico y tratamiento de la hipercolesterolemia familiar en España: documento de consenso. *Aten Primaria*. 2014; 47:56-65.

MELO JB, NETO JAF, CAMPOS RCA, MEIRELES MF, COSTA ECC, LEAL MCM . Estudo da Função Endotelial no Brasil: Prevenção de Doenças Cardiovasculares. *Rev Bras Cardiol*. 2014;27(2):616-623.

MENEZES IAC, SANTOS MRV, CUNHA CLP. O Índice de Perfusão da Oximetria de Pulso na Avaliação da Função Endotelial na Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2014; 102(3):237-244.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil 2011-2012. Brasília; 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria-Executiva. Subsecretaria de Planejamento e Orçamento.. Plano Nacional de Saúde- PNS 2012-2015. Brasília: Ministério da Saúde (Série B. Textos Básicos de Saúde). 2011. p. 114

MULLEN MJ, KHARBANDA RK, CROSS J, DONALD AE, TAYLOR M, VALLANCE P et al. Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. *Circulation Research*. 2001; 88: 145-151.

NAGHAVI M, LIBBY P, FALK E, WARD CASSCELLS S, LITOVSKY S, RUMBERGERJ. From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part I. *Circulation*. 2003;108:1664-1672.

NOOR R, SHUAIB U, WANG CX, et al. High density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis*.2007; 192: 92–9.

NORDESTGAARD BGC, HUMPHRIES MJ, GINSBERG SE, MASANA HN, DESCAMPS L, WIKLUND OS, et al. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J*. 2013. 34(45): 3478-3490.

PEPINE CJ. The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. *Am J Med*. 2009; 122 (5 Suppl): S10-5.

PETOUMENOS V1, NICKENIG G, WERNER N. High-density lipoprotein exerts vasculoprotection via endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2009 Nov-Dec;13(11-12):4623-35.

PLENTZ RD, IRIGOYEN MC, MULLER AS, CASARINI DE, RUBIRA MC, MORENO JUNIOR H et al. Venous endothelial dysfunction in Chagas' disease patients without heart failure. *Arq Bras Cardiol*. 2006 Jun;86(6):466-71

POAY SIAN SL, KIAN KP. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem Cells*. 2014 ; 26(3): 355-366.

PROTASIO LDL, LAURINDO RM, CHAGAS ACP. Endotélio & doenças cardiovasculares. Ed Atheneu 2005

PYKE KE, TSCHAKOVSKY ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol*. 2005; 15:357-369.

RAMUNNI A, BRESCIA P, DAMBRA P, CAPUZZIMATI L, RIA R, DE TULLIO G et al. Effect of low-density lipoprotein apheresis on circulating endothelial progenitor cells in familial hypercholesterolemia. *Blood Purif*. 2010;29(4):383-389.

RIZZONI D, PORTERI E, BOARI GEM, DE CIUCEIS C, SLEIMAN I, MUIESAN ML, et al. Prognostic Significance of Small-Artery Structure in Hypertension. *Circulation*. 2003;108(18):2230-2235.

ROBINSON, JG. Management of Familial Hypercholesterolemia: A Review of the Recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *J Manag Care Pharm.* 2013 ;19 (2) :139-149.

ROJAS RUBIO A, MORALES-SEGURA A. Nitric Oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. *Arch Med Res.* 2004;35:1-11.

ROSSI F, BERTONE C, MONTANILE F, MIGLIETTA F, LUBRANO C, GANDINI L et al. HDL cholesterol is a strong determinant of endothelial progenitor cells in hypercholesterolemic subjects. *Microvasc Res.* 2010;80(2):274-279.

ROUSTIT M, MILLET C, BLAISE S, DUFOURNET B, CRACOWSKI JL. Excellent reproducibility of laser speckle contrast imaging to assess skin microvascular reactivity. *Microvascular Research.* 2010;80(3):505-511.

SANTOS RD, GAGLIARDI ACM., XAVIER HT, CASELLA A, ARAÚJO DB, CESENA FY et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). *Arq Bras Cardiol.* 2012;99(2 Supl. 2):1-28

SCHACHINGER V, BRITTEN MB, ZEIHNER AM. Prognostic Impact of Coronary Vasodilator Dysfunction on Adverse Long-Term Outcome of Coronary Heart Disease. *Circulation.* 2000;101(16):1899-906.

SCHMIDT-LUCKE C, RÖSSIG L, FICHTLSCHERER S, VASA M, BRITTEN M, KÄMPER U, DIMMELER S et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111:2981-2987.

SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE; SCIENTIFIC STEERING COMMITTEE ON BEHALF OF THE SIMON BROOME REGISTER GROUP. Risk of fatal coronary heart disease in familial. *BMJ.* 1991;303(6807): 893–896.

SEN S, MCDONALD SP, COATES PT, BONDER CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond).* 2011;120(7):263-283.

SENARATHNA, J, REGE, A LI, N, THAKOR N .Laser Speckle Contrast Imaging: Theory, Instrumentation and Applications. *Biomedical Engineering, IEEE .* 2013 ;6 :99-110.

SIMÃO AF, PRÉCOMA DB, ANDRADE JP, CORREA FILHO H, SARAIVA JFK, OLIVEIRA GMM et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 2013; 101 (6Supl.2): 1-63.

SINGH S, BITTNER V. Familial hypercholesterolemia--epidemiology, diagnosis, and screening. *Curr Atheroscler Rep.* 2015;17(2):482.

SITIA S, TOMASONI L, ATZENI F , AMBROSIO G, CORDIANO C, CATAPANO A et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews*. 2010; 9: 830-4.

STEIN EA, RAAL FJ. Polygenic familial hypercholesterolaemia: does it matter? *Lancet* 2013;381:1255–7.

STONE NJ, ROBINSON JG, LICHTENSTEIN AH, BAIREY MERZ CN, BLUM CB, ECKEL RH et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014 .

STRUIJKER-BOUDIER HA, ROSEI AE, BRUNEVALL P, CAMICI PG, CHRIST F, HENRION D, et al. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2007;28(23):2834-2840.

SNIDERMAN AD, TSIMIKAS S, FAZIO S. The severe hypercholesterolemia phenotype: clinical diagnosis, management, and emerging therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1935–47

SOUZA EG, DE LORENZO A, HUGUENIN G, OLIVEIRA GMM, TIBIRIÇÁ E. Impairment of systemic microvascular endothelial and smooth muscle function in individuals with early-onset coronary artery disease: studies with laser speckle contrast imaging. *Coronary Artery Disease*. 2014;25(1):23-28.

STAPLETON PA, GOODWILL AG, JAMES ME, BROCK RW, FRISBEE JC. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *J Inflamm*. 201;18(7):54.

SUMI M, SATA M, MIURA S, ET AL. Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 813–8

SZMITKO PE, WANG CH, WEISEL RD, DE ALMEIDA JR, ANDERSON TJ, VERMA S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation*. 2003;108:1917-1923.

TALMUD PJ, SHAH S, WHITTALL R. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolemia: a case-control study. *Lancet*. 2013;381:1293–301.

TEIXEIRA BC , A LOPES AL , MACEDO RCO , CORREA CS , RAMIS TR, RIBEIRO JL , et al. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. *J. vasc. bras*. 2014;13:2 .

THE AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. NATIONAL COUNCIL ON AGING The Nutrition Screening Initiative. *Incorporating nutrition screening and interventions into medical practice. a monograph for physicians*. Washington, D.C. US: American Academy of Family Physicians; 1994.

TIBIRIÇÁ E, RODRIGUES E, COBAS RA, GOMES MB. Endothelial function in patients with type 1 diabetes evaluated by skin capillary recruitment. *Microvasc Res*. 2007; 73:107-112.

TSO C, MARTINIC G, FAN WH, et al. Highdensity lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 1144–9.

URBICH C, DIMMELER S. Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-53.

VAN AALST-COHEN ES, JANSEN AC, TANCK MW. Diagnosing familial hypercholesterolaemia: the relevance of genetic testing. *Eur Heart J*. 2006;27:2240–2246.

VAN OOSTROM O, NIEUWDORP M, WESTERWEEL PE, et al. Reconstituted HDL increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27:1864–5.

VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, ADLER K, URBICH C, MARTIN H et al. Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate with Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Circ Res* 2001; 89:E1-E7

VERSMISSEN J, OOSTERVEER DM, YAZDANPANA M, DEFESCHE JC, BASART DCG, LIEM AH et al. Efficacy of statins in familial hypercholesterolaemia: a long term cohort study. *BMJ*.2008;337:a2423

VLAHOS AP, NAKA KK, BECHLIOULIS A, THEOHARIS P, VAKALIS K, MOUTZOURI E et al. Endothelial dysfunction, but not structural atherosclerosis, is evident early in children with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Pediatr Cardiol*. 2014;35(1):63-70.

VILLEGER L, ABIFADEL M, ALLARD D, RABES J P, THIART R, KOTZE M J et al. The UMD-LDLR database: additions to the software and 490 new entries to the database. *Hum Mutat*. 2002; 20(2): 81-87.

WANG HY, GAO PJ, JI KD, SHEN WF, FAN CL, LU L, ZHU DL. Circulating endothelial progenitor cells, C-reactive protein and severity of coronary stenosis in Chinese patients with coronary artery disease. *Hypertens Res*. 2007;30:133–141.

WENG SF, KAI J, NEIL HA . HUMPHRIES SE , QURESHI N. Improving identification of familial hypercholesterolaemia in primary care: Derivation and validation of the familial

hypercholesterolaemia case ascertainment tool (FAMCAT). *Atherosclerosis*. 2015;238 : 336-343

WERNER N, KOSIOL S, SCHIEGL T, AHLERS P, WALENTA K, LINK A et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005;353:999-1007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 65th World Health Assembly closes with new global health measures. [Access in 2015 Mar 1]. Available from: [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/what65\\_closes\\_20/20526/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/what65_closes_20/20526/en/)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Familial hypercholesterolemia (FH). Report of a WHO consultation. Paris: WHO: Human Genetic Programme; 1997.

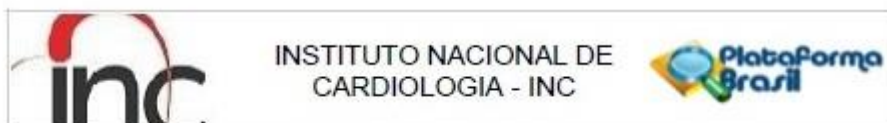
WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. Geneva: World Health Organization, 2000. p. 256. WHO Obesity Technical Report Series, n. 284.

XAVIER HT, IZAR MC, FARIA NETO JR, ASSAD MH, ROCHA VZ, SPOSITO AC, et al. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol*. 2013;101:1-20.

YE, HAO-MING CHENG, KUAN-RAU CHIOU, PO-HSUN HUANG, SHING-JONG LIN, MIN-JI CHARNG. Relation of Coronary Artery Calcium to Flow-Mediated Dilation and C-Reactive Protein Levels in Asymptomatic Patients With Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 2007;100(7):1119-1123.

ZHONG-XUAN Y, HAO-MING C, KUAN-RAU C, PO-HSUN H , SHING-JONG L, MIN-JI C. Relation of Coronary Artery Calcium to Flow-Mediated Dilation and C-Reactive Protein Levels in Asymptomatic Patients With Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 2007 1;100(7):1119

# ANEXO I



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR, ESTADO NUTRICIONAL, CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS E REATIVIDADE MICROVASCULAR EM PACIENTES COM SUSPEITA DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.

**Pesquisador:** Annie Seixas Bello Moreira

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 26802514.4.0000.5272

**Instituição Proponente:** Instituto Nacional de Cardiologia - INC

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 605.596

**Data da Relatoria:** 24/06/2014

#### **Apresentação do Projeto:**

A aterosclerose é a base de uma série de doenças crônicas que acometem o sistema cardiovascular e constituem atualmente a principal causa de morte em todo o mundo. A hipercolesterolemia familiar (HF) heterozigótica é uma das formas mais comuns de dislipidemia de base genética sendo caracterizada por concentrações elevadas de LDL-C e alta prevalência de aterosclerose prematura. As células progenitoras endoteliais (EPC), células CD34+ circulantes capazes de se diferenciarem em células com características

endoteliais, tem sido intensamente estudadas pela sua capacidade de auxiliar no reparo endotelial contínuo e na vasculogênese. A Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença

genética do metabolismo das lipoproteínas cujo modo de herança é autossômico codominante e que se caracteriza por níveis muito elevados do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), e pela presença de sinais clínicos característicos, como xantomas tendíneos e risco aumentado de doença arterial coronariana prematura. O ponto de partida para se considerar a possibilidade diagnóstica de HF é a concentração de LDL-c 190 mg/dL

em adultos. Sinais clínicos, como a presença de algum grau de arco corneal, ocorre em 50% dos indivíduos com HF entre 31-35 anos. Já o arco corneal completo está presente em 50% dos portadores de HF aos 50 anos. Não existe, no entanto, correlação entre o grau do arco corneal e as

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



manifestações de DAC. Espessamento dos tendões ocorre em 63% dos portadores de HF; alterações na ecogenicidade dos tendões estão presentes em 90% dos portadores de HF; xantomas são detectados em 68% dos portadores de HF com mutações do gene LDLR20.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar o consumo alimentar, estado nutricional, a quantificação de células progenitoras endoteliais (EPC) e a função endotelial através da reatividade microvascular de pacientes com e sem diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar;

**Objetivos Específicos (ou secundário):**

Identificar pacientes que possuam diagnóstico clínico de Hipercolesterolemia Familiar;

Caracterizar o estado nutricional e o consumo alimentar destes pacientes;

Quantificar o número de EPC, a reatividade microvascular e avaliar os biomarcadores de função endotelial destes pacientes;

Comparar o número de EPC, a função endotelial, o estado nutricional e o consumo alimentar entre os pacientes com Hipercolesterolemia Familiar e os pacientes sem diagnóstico de HF.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O presente projeto de pesquisa não envolve a realização de procedimentos novos que possam trazer risco para os pacientes. A coleta de sangue não envolve riscos, todos os materiais utilizados serão descartáveis, o paciente poderá sentir um leve desconforto no local da retirada do sangue. O teste de reatividade microvascular é um teste não invasivo que não oferece riscos para o paciente. O paciente poderá sentir um leve desconforto(formigamento) no lugar do laser. Em caso de alguma complicação com os procedimentos da pesquisa, a assistência médica é garantida.

**Benefícios:**

Este estudo trará benefícios à comunidade científica, uma vez que identificadas características específicas dos pacientes com Hipercolesterolemia Familiar, novas formas de intervenção e tratamento podem ser estudadas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto de pesquisa foi atualizado com todas as sugestões e a seguir responderemos a pendência:

Pendência - Esclarecimentos sobre como e em qual local se dará o acompanhamento nutricional após término da pesquisa.

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





INSTITUTO NACIONAL DE  
CARDIOLOGIA - INC



Continuação do Parecer: 695/96

Resposta - Todos os pacientes serão encaminhados para realizar o acompanhamento médico no ambulatório de tratamento de dislipidemia e prevenção de aterosclerose e acompanhamento nutricional no ambulatório de nutrição de dislipidemia e prevenção de aterosclerose, que funciona toda terça-feira pela parte da manhã no Instituto Nacional de Cardiologia.

Será realizada abertura de prontuário, caso algum paciente não possua matrícula no INC. A maior parte dos pacientes já realiza acompanhamento médico e nutricional no ambulatório de aterosclerose do INC, sendo assim mantido o acompanhamento durante e após o término da pesquisa, para estes e para os pacientes novos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

**Apresentados:**

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

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

RIO DE JANEIRO, 24 de Junho de 2014

---

**Assinado por:**  
**monica moura de vasconcellos**  
**(Coordenador)**

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

Página 03 de 04

## ANEXO II

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA  
ENSINO E PESQUISA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa – **AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR, ESTADO NUTRICIONAL, CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS E REATIVIDADE MICROVASCULAR EM PACIENTES COM SUSPEITA DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL NO INC: Annie Seixas Bello Moreira**

**ENDEREÇO:** Rua das Laranjeiras, 374 – Laranjeiras- Rio de Janeiro, 22240-006, telefone (21) 3037-2288

**PESQUISADORES PARTICIPANTES no INC:** Annie Moreira: (21) 3337-2431; Andrea Lorenzo (21); 3037-2288 Juliana Duarte (21)995487142

**Comitê de Ética em Pesquisa INC:** (21) 3037-2307; Contato por e-mail: [cepinclaranjeiras@gmail.com](mailto:cepinclaranjeiras@gmail.com)

**COMO É O ESTUDO:** O senhor (a) será atendido por equipe multiprofissional onde será realizada avaliação nutricional e clínica e também serão aplicados questionários para avaliar seu consumo alimentar, qualidade de vida e prática de exercícios físicos. Será efetuada coleta de 10ml de sangue em tubo com EDTA. A coleta deve seguir todas as normas de higiene e segurança estabelecidas para este fim. Esta será efetuada por profissionais enfermeiros treinados e participantes do projeto. Além disso será realizado um exame para investigar a sua função endotelial. Para a realização deste exame, o senhor (a) ficará deitado em uma maca, permanecendo imóvel durante o tempo do exame de aproximadamente 20 minutos. Será aplicado um “eletrodo” no seu braço direito, onde serão colocadas substâncias que entrarão em contato com a sua pele. Um feixe de luz será direcionado para este local com o intuito de visualizar a resposta dos pequenos vasos do seu braço, aos estímulos. O senhor (a) poderá sentir um pequeno formigamento no local em que o eletrodo é afixado.

**CUSTO:** O (a) senhor (a) receberá um auxílio para passagem e um lanche no dia da pesquisa. Assim não haverá nenhum custo por participar da pesquisa.

**RISCO:** Não sofrerá nenhum risco em participar, o exame é indolor e não invasivo. Em caso de alguma complicação com os procedimentos da pesquisa, a assistência médica é garantida.

**BENEFÍCIOS:** o senhor(a) poderá ajudar a descoberta de novas possibilidades de tratamento para redução do colesterol e terá acompanhamento nutricional durante e após a pesquisa.

**Sua participação é totalmente voluntária** e o (a) senhor (a) pode desistir e retirar seu consentimento em qualquer momento durante o decorrer da pesquisa, sem que isso prejudique sua assistência pela equipe de saúde. Em caso de danos ocasionados pelos procedimentos da pesquisa, o senhor (a) poderá requerer indenização por meios legais.

**Seus dados são secretos e sigilosos** de acordo com as normas brasileiras. Os resultados desta pesquisa poderão ser publicados em revistas científicas, mas a sua identidade será preservada. A qualquer momento o(a) senhor(a) poderá esclarecer dúvidas.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia ficará com o senhor (a) e a outra será arquivada pelo pesquisador responsável. Tanto o pesquisador como o senhor (a) deverão rubricar e assinar as duas vias.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo no termo de consentimento livre e esclarecido e aceito participar voluntariamente desse estudo.

**Nome do Paciente:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

(ou representante legal)

**Assinatura do Paciente:** \_\_\_\_\_

**Nome do Pesquisador:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_\_

**Assinatura do Pesquisador:** \_\_\_\_\_

### ANEXO III

## UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - FACULDADE DE MEDICINA

### INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA

#### **Avaliação da função endotelial, células progenitoras endoteliais e perfil nutricional de pacientes com Hipercolesterolemia Familiar Heterozigótica.**

#### *Identificação*

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Código \_\_\_\_\_ Registro INC: \_\_\_\_\_

Nome completo: \_\_\_\_\_

Gênero \_\_\_ feminino (1) \_\_\_ Masculino (2) Estado civil: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Raça (auto relato): \_\_\_\_\_

Data de nascimento \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ Cidade de nascimento \_\_\_\_\_

Email: \_\_\_\_\_

Telefones: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Grau escolaridade (1) não sabe ler ou escrever (2) sem estudos 3) Ensino fundamental (4) Ensino médio (5) formação profissional (6) Superior incompleto (7) Superior completo (8) outros: \_\_\_\_\_

Situação profissional(1) ativo empregado (2) ativo desempregado (3) inativo (estudante, aposentados, incapacitados de trabalhar, trabalhadores domésticos)

Profissão: \_\_\_\_\_

#### *História Clínica*

Tem/ já teve diagnóstico médico de alguma das patologias abaixo? (Atenção critérios de exclusão)

					Observações
Hipotireoidismo	sim		não	Não sei	

Hipertireoidismo	sim	não	Não sei	
Insuficiência renal e/ou síndrome nefrótica	sim	não	Não sei	
Hepatopatia crônica	sim	não	Não sei	
Insuficiência cardíaca	sim	não	Não sei	
câncer	sim	não	Não sei	
Enfermidade psiquiátrica (depressão)	sim	não	Não sei	
Passou por alguma cirurgia nos últimos 30 dias?	sim	não	Não sei	
Doença do Tecido Conjuntivo	sim	não	Não sei	
Doença Reumática	sim	não	Não sei	
Angina de peito	sim	não	Não sei	Ano: Idade
Infarto agudo do miocárdio	sim	não	Não sei	Ano: Idade:
AVC	sim	não	Não sei	Ano: Idade
RVM	sim	não	Não sei	Ano: Idade
Cateterismo/ Angioplastia	sim	não	Não sei	Ano: Idade
DAP	sim	não	Não sei	Ano: Idade

**Dislipidemia:**

Valor mais alto de colesterol total encontrado? \_\_\_\_\_mg/dl(qual mais alto valor de colesterol que já teve?)

Faz acompanhamento com médico?

( ) Sim, com especialista (cardiologista)(1) ( ) Sim, com Clínico Geral. (2) ( ) Não(3) ( )  
(4) Outros, especifique: \_\_\_\_\_

Data do início do acompanhamento: \_\_\_\_\_

Este valor foi encontrado antes ou depois do tratamento? \_\_\_\_\_

Já teve diagnóstico médico de hipercolesterolemia familiar?

( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

Ano de diagnóstico: \_\_\_\_\_ ( ) Genético ( ) Clínico

Recebe tratamento medicamentoso?

Data do início do tratamento medicamentoso: \_\_\_\_\_

Medicações em uso:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Já houve troca da medicação durante o tratamento? (Anotar se houve aumento ou diminuição na dosagem de hipolipemiante ou troca de hipolipemiante **recentemente** e quando foi a última troca)

---

---

---

Desde o início do tratamento, já parou de tomar medicação? (1 ) Sim ( 2 ) Não

Faz acompanhamento nutricional? ( 1 ) Sim ( 2 ) Não ( 3 ) Já fiz mas parei.

Segue as orientações? ( 1 )Sim ( 2 )Não ( 3 )Às vezes.

**Diabetes mellitus:**

Tem/ já teve o diagnóstico médico de diabetes mellitus?

(1 )Sim ( 2 )Não (3 )Não sei

Ano do diagnóstico: \_\_\_\_\_

**Hipertensão arterial**

Tem/ já teve o diagnóstico médico de hipertensão arterial?

( 1 )Sim ( 2 )Não ( 3 )Às vezes

Ano do diagnóstico: \_\_\_\_\_

**Tabagismo**

Fuma ou já fumou cigarros ou cachimbos? ( 1 )Sim ( 2 )Não ( 3 )Ex-fumante(\* aquele que não fumou no último ano.)

Se a resposta for afirmativa, especifique: ( 1 ) Fumante diário ( 2 )Fumante ocasional

Que idade tinha quando começou a fumar regularmente? \_\_\_\_\_ anos

Quantos cigarros fuma ou fumava, ao dia, habitualmente? \_\_\_\_\_ cigarros

Há quantos anos é/foi fumador habitual? \_\_\_\_\_ anos

Se parou de fumar, com que idade parou? \_\_\_\_\_ anos

**Somente para mulheres:**

É menopausada? \_\_\_\_\_

Com que idade teve a última menstruação: \_\_\_\_\_ anos

Atualmente utiliza algum tratamento hormonal (oral/ injetável)

(1 )Sim (2 )Não (3 )Não sei

Desde quando utiliza: \_\_\_\_\_

**Exames Laboratoriais:**

Data: \_\_\_\_\_

Col total: _____	TG: _____	HDL: _____	LDL: _____	PCR: _____
Apo A1: _____	ApoB: _____	Lp(a): _____	TSH: _____	Glicose: _____
TGO: _____	TGP: _____	CPK: _____	Leucócitos: _____	ácido úrico: _____
Outros:				
_____				
_____				
_____				
_____				

Média PAD: \_\_\_\_\_ mmHg

Frequência cardíaca: 1ª medida: FC \_\_\_\_\_ l/m

**Sinais Clínicos de HF:**

Arco corneano: ( 1 )Sim ( 2 )Não

Xantomas tendinosos: (1 )Sim ( 2 )Não

Xantelasma: (1 )Sim ( 2 )Não

**Antropometria:**

Peso Habitual: \_\_\_\_\_ Peso atual: \_\_\_\_\_

Altura: \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_ kg/m<sup>2</sup>

Circunferência da Cintura: Medida 1: \_\_\_\_\_ Medida 2: \_\_\_\_\_ Média: \_\_\_\_\_

Circunferência da Panturrilha: \_\_\_\_\_ Circunferência do Pescoço: \_\_\_\_\_

Circunferência do Quadril: \_\_\_\_\_ Circunferência Braquial: \_\_\_\_\_

RCest: \_\_\_\_\_ IAC: \_\_\_\_\_ Índice de

Conicidade: \_\_\_\_\_



# ANEXO IV

## Análise da Composição Corporal

Compartimentos	Valores	Água Corporal Total	Massa Magra	Massa Livre de Gordura	Peso	Faixa normal
AIC	(l) 16,5	26,7	34,2	36,5	51,4	18,0 ~ 22,0
AEC	(l) 10,2					11,1 ~ 13,5
Proteína	(kg) 7,1	<small>Não ósseo: 2,23</small> <small>Ósseo: 2,23</small>				7,8 ~ 9,6
Mineral	(kg) 2,74					2,69 ~ 3,29
Massa de Gordura	(kg) 14,9					11,4 ~ 18,2

▶ Mineral estimado

## Análise Músculo-Gordura

	Abaixo	Normal	Alto	Unidade%	Faixa normal
Peso (kg)	55 70 85	100	115 130 145 160 175 190 205	51,4	48,5 ~ 65,7
MME (kg)	70 80 90	100	110 120 130 140 150 160 170	19,5	21,7 ~ 26,6
Massa de Gordura (kg)	40 60 80	100	160 220 280 340 400 460 520	14,9	11,4 ~ 18,2

## Diagnóstico da Obesidade

	Abaixo	Normal	Alto	Unidade%	Faixa normal
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	10 15 18,5 21 25,0 30 35 40 45 50 55	19,3			18,5 ~ 25,0
PGC (%)	8 13 18 23 28 33 38 43 48 53 58	29,1			18,0 ~ 28,0
RCQ	0,65 0,70 0,75 0,80 0,85 0,90 0,95 1,00 1,05 1,10 1,15	0,82			0,75 ~ 0,85

## Balanceamento de Massa Magra

	Abaixo	Normal	Alto	Unidade%	Edema segmentar	Edema
Braço direito (kg)	40 60 80 100 120 140 160 180	1,50		79,9	0,330	0,377
Braço esquerdo (kg)	40 60 80 100 120 140 160 180	1,51		80,4	0,332	0,379
Tronco (kg)	70 80 90 100 110 120 130 140	15,7		81,8	0,336	0,383
Perna Direita (kg)	70 80 90 100 110 120 130 140	5,89		99,1	0,337	0,384
Perna esquerda (kg)	70 80 90 100 110 120 130 140	5,91		99,5	0,338	0,385

A gordura segmentar é estimada.

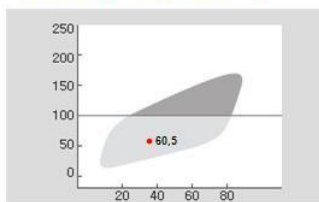
## Controle de peso

Peso Meta	57,1kg
Controle de peso	5,7kg
Controle de gordura	-1,8kg
Controle de músculo	7,5kg
Pontuação de fitness	71Pontos

## Grau de Obesidade

90,0% (90~110)	
MCC	23,6kg (25,8 ~ 31,6)
CMO	2,23kg (2,21 ~ 2,71)
TMB	1158kcal (1139~1310)
CB	25,6cm
CMB	20,3cm

## Área de Gordura Visceral



## Impedância

Z	BD	BE	TR	PD	PE
1kHz	530,6	520,7	32,3	345,1	341,3
5kHz	520,6	511,7	31,8	339,7	335,1
50kHz	476,0	472,7	28,2	307,4	304,6
250kHz	436,1	434,9	24,5	278,5	276,2
500kHz	421,3	420,7	22,9	271,0	268,9
1MHz	407,7	407,6	20,8	266,5	264,1

## Avaliação Nutricional

Proteína	<input type="checkbox"/> Normal	<input checked="" type="checkbox"/> Deficiente	
Mineral	<input type="checkbox"/> Normal	<input checked="" type="checkbox"/> Deficiente	
Gordura	<input checked="" type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Deficiente	<input type="checkbox"/> Excessivo

## Administração do peso

Peso	<input checked="" type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Abaixo	<input type="checkbox"/> Alto
MME	<input type="checkbox"/> Normal	<input checked="" type="checkbox"/> Abaixo	<input type="checkbox"/> Forte
Gordura	<input checked="" type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Abaixo	<input type="checkbox"/> Alto

## Diagnóstico da Obesidade

IMC	<input checked="" type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Abaixo	<input type="checkbox"/> Alto	<input type="checkbox"/> Muito Alto
PGC	<input type="checkbox"/> Normal	<input checked="" type="checkbox"/> Alto	<input type="checkbox"/> Muito	
RCQ	<input checked="" type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Alto	<input type="checkbox"/> Muito	

## Balanceamento do Corpo

Superior	<input checked="" type="checkbox"/> Balanceado	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desbalanceado	<input type="checkbox"/> Muito desbalanceado
Inferior	<input checked="" type="checkbox"/> Balanceado	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desbalanceado	<input type="checkbox"/> Muito desbalanceado
Superior-inferior	<input checked="" type="checkbox"/> Balanceado	<input type="checkbox"/> Ligeiramente desbalanceado	<input type="checkbox"/> Muito desbalanceado

## Força do corpo

Superior	<input checked="" type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Desenvolvido	<input type="checkbox"/> Fraco
Inferior	<input checked="" type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Desenvolvido	<input type="checkbox"/> Fraco
Músculo	<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Muscular	<input checked="" type="checkbox"/> Fraco

## Diagnóstico de saúde

Água Corporal	<input type="checkbox"/> Normal	<input checked="" type="checkbox"/> Abaixo		
Edema	<input checked="" type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Ligeiro edema	<input type="checkbox"/> Edema	
Estilo de vida	<input checked="" type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Alerta	<input type="checkbox"/> Arriscado	<input type="checkbox"/> Alto risco

## ANEXO V

### **Apresentações em Congressos e Resumos publicados:**

**Silva, JDL, Cezario LA, Assad MHV, Lorenzo AR, Moreira ASB. Inadequação do consumo alimentar e estado nutricional de pacientes com suspeita de Hipercolesterolemia Familiar.** In: XXXIV Simpósio do Instituto Nacional de Cardiologia, 2013, Rio de Janeiro.

**Cezario LA, Silva, JDL, Assad MHV, Lorenzo AR, Moreira ASB. Inadequação dietética e baixo consumo de alimentos funcionais hipocolesterolêmicos em pacientes com dislipidemia grave.** In: XIV Jornada de Nutrição em Cardiologia- SOCERJ, 2014, Rio de Janeiro.

**Silva, JDL, Cezario LA, Assad MHV, Lorenzo AR, Moreira ASB. Diferenças na distribuição de gordura corporal em pacientes com hipercolesterolemia familiar e na dislipidemia grave.** In: 31º Congresso de Cardiologia- SOCERJ, 2014 Rio de Janeiro.

**Silva, JDL, Cezario LA, Assad MHV, Lorenzo AR, Moreira ASB. Excesso de gordura visceral em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar.** In: XXIII Congresso Brasileiro de Nutrição- CONBRAN, 2014 Vitória.

**Silva, JDL, Cezario LA, Assad MHV, Lorenzo AR, Moreira ASB. Inadequação do consumo alimentar e do estado nutricional em pacientes do Programa de Rastreamento de Hipercolesterolemia Familiar do Rio de Janeiro (RJ).** In: 32º Congresso de Cardiologia- SOCERJ, 2015, Rio de Janeiro

**Cezario LA, Silva, JDL, Assad MHV, Lorenzo AR, Moreira ASB. Impacto do tratamento multidisciplinar no perfil lipídico de pacientes acompanhados no Ambulatório de Aterosclerose e Prevenção de Doença Cardiovascular do Instituto Nacional de Cardiologia.** In: 32º Congresso de Cardiologia- SOCERJ, 2015, Rio de Janeiro

## Artigo submetido com dados da Tese

Revista da Associação Médica Brasileira - Artigo Submetido SGP/ RAMB



sgpramb@sgponline.com.br (sgpramb@sgponline.com.br) Adicionar aos contatos 18:41

Para: juliduarte17@hotmail.com



### Revista da Associação Médica Brasileira

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA  
Rua São Carlos do Pinhal, 324 CEP: 01333-903 - Caixa Postal: 8904 - São Paulo SP - Brasil  
Tel.: (11) 3178-6800 - Email: ramb@amb.org.br

São Paulo, quarta-feira, 8 de julho de 2015

Ilmo(a) Sr.(a)

Prof(a), Dr(a) Juliana Duarte Lopes da Silva

Referente ao código de fluxo: **3266**

Classificação: **Artigos de Revisão**

Informamos que recebemos o manuscrito **Influência da dieta sobre as células progenitoras endoteliais: Uma Revisão Sistemática**, será enviado para apreciação dos revisores para possível publicação/participação na Revista da Associação Médica Brasileira. Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número de referência apresentado acima.

Obrigado por submeter seu trabalho à Revista da Associação Médica Brasileira.

Atenciosamente,

**Dr. Carlos Vicente Serrano Jr**  
Editor

«« Favor não responder esta mensagem pois ela foi gerada automaticamente pelo SGP »»

Artigo: “Influência da dieta sobre as células progenitoras endoteliais: Uma Revisão Sistemática.”

Objetivo: Investigar se há evidências do efeito da dieta sobre os níveis e/ou funcionalidade das Células Progenitoras Endoteliais.

Influência da dieta sobre as células progenitoras endoteliais: Uma Revisão Sistemática.

Influence of diet on endothelial progenitor cells: A Systematic Review.

Título resumido: Influência da Dieta nas CPE.

Autores:

Juliana Duarte Lopes da Silva, Nutricionista Mestranda em Medicina- Cardiologia na Universidade Federal do Rio de Janeiro . Rua Rodolpho Paulo Rocco, 255 - Cidade Universitária Ilha do Fundão, Rio de Janeiro - RJ

Lidiane Araujo Cezário, Graduanda em Nutrição na Universidade do Estado do Rio de Janeiro R. São Francisco Xavier, 524 - Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - Cep 20550-900

Andrea Rocha de Lorenzo Instituto Nacional de Cardiologia R. das Laranjeiras, 374 - Laranjeiras, Rio de Janeiro - RJ, CEP 22240-006

Dra. Annie Seixas Bello Moreira Doutora em Fisiopatologia Clínica e Experimental e Pesquisadora do Instituto Nacional de Cardiologia Instituto Nacional de Cardiologia R. das Laranjeiras, 374 - Laranjeiras, Rio de Janeiro - RJ, CEP 22240-006

Este artigo faz parte da dissertação de Mestrado da aluna Juliana Duarte Lopes da Silva na Universidade Federal do Rio de Janeiro que será apresentada em 2015.

**Resumo:**

As células progenitoras endoteliais são um subtipo de célula progenitora hematopoética derivada da medula óssea, capazes de se diferenciar em células com características endoteliais, contribuindo para o reparo e regeneração vascular. Os efeitos de um estilo de vida saudável sobre a mobilização e melhora funcional das células progenitoras endoteliais são cada vez mais reconhecidos. O objetivo desta revisão sistemática foi investigar se há evidências do efeito da dieta sobre os níveis e/ou funcionalidade das células progenitoras endoteliais.

A busca bibliográfica foi realizada durante os meses de outubro de 2013 a fevereiro de 2014 por meio de fontes de dados eletrônicas.

Cinco artigos foram selecionados com base nos critérios de inclusão. Três estudos avaliaram somente a dieta e dois estudos avaliaram dieta e exercício físico estruturado. Os estudos demonstraram que os indivíduos que alcançaram redução do peso corporal após a intervenção apresentaram melhora nos níveis de células progenitoras endoteliais. Nos estudos que associaram dieta e exercício, o aumento dos níveis de células progenitoras endoteliais foi mais evidente nos grupos que praticaram atividade física. Também foi observada associação entre a dieta do mediterrâneo e aumento nos números dessas células.

Apesar da escassa literatura encontrada, as evidências sugerem que uma dieta saudável associada à atividade física, manutenção do peso ideal ou perda de peso em pacientes com sobrepeso ou obesidade, tem efeito positivo sobre os níveis e funcionalidade das células progenitoras endoteliais.

**Palavras-chave:** Dieta/Diet; Células Progenitoras Endoteliais/ Endothelial Progenitor Cells ; Doenças Cardiovasculares/ Cardiovascular Diseases.

**Abstract:**

Endothelial progenitor cells are a subtype of hematopoietic progenitor cells derived from bone marrow, capable of differentiating into cells with endothelial characteristics, contributing to vascular repair and regeneration. The effects of a healthy lifestyle on mobilization and functional improvement of EPCs are increasingly recognized. The aim of this systematic review was to investigate whether there is evidence of the effect of diet on the levels and / or functionality of Endothelial progenitor cells. The literature search was conducted during the months of October 2013 to February 2014 through electronic data sources. Only clinical trials were included.

Five articles were selected based on inclusion criteria. Three studies evaluated the diet and only two studies assessed diet and structured exercise. Studies have shown that individuals who have achieved weight reduction after the intervention showed improvement in the levels of Endothelial progenitor cells. In studies that combined diet and exercise, increased levels of Endothelial progenitor cells was more evident in groups that practiced physical activity. Association was also observed between the Mediterranean diet and increased numbers of these cells. Despite the limited literature found, evidence suggests that a healthy diet combined with physical activity, maintenance of ideal weight or weight loss in overweight or obese patients, has a positive effect on the levels and function of E Endothelial progenitor cells.

## **Introdução:**

Atualmente, as doenças cardiovasculares (DCV) são a causa mais comum de morbidade e a principal causa de mortalidade em todo mundo<sup>1</sup>. A disfunção endotelial ocorre desde o início do processo aterosclerótico e contribui para a formação, progressão e instabilidade da placa<sup>2</sup>.

Apesar dos mecanismos da disfunção endotelial não serem ainda completamente conhecidos, um desequilíbrio entre o dano vascular e a capacidade de reparo parece ter um papel importante. Evidências sugerem que as células progenitoras endoteliais (CPE), que são um subtipo de célula progenitora hematopoética derivada da medula óssea, capazes de se diferenciarem em células com características endoteliais, contribuem para o reparo e regeneração vascular<sup>3-5</sup>.

As CPE podem ser utilizadas como marcador de saúde cardiovascular<sup>6,7</sup>. Já foi demonstrado que pacientes com DCV e maiores níveis de CPE circulantes, apresentam melhor prognóstico em relação aos pacientes que possuem menores níveis de CPE<sup>8</sup>. O uso de drogas hipolipemiantes, como as estatinas, também aumenta os níveis de CPE<sup>9</sup>.

Os efeitos de um estilo de vida saudável sobre a mobilização e melhora funcional das CPE, são cada vez mais reconhecidos<sup>10</sup>. O tratamento não farmacológico com o uso de uma dieta saudável e modificações no estilo de vida como prática de exercícios físicos, interrupção do tabagismo e manutenção de um peso corporal saudável, é a base para a prevenção e tratamento das DCV<sup>11</sup>. Revisões sistemáticas recentes<sup>12-14</sup> apontam o efeito do exercício físico no aumento do número de CPE.

A hipótese de que nutrientes contidos na dieta também possam influenciar diretamente os níveis e funcionalidade das CPE tem sido investigada, tanto em ensaios clínicos como em estudos observacionais<sup>15-17</sup>. Porém não há um consenso sobre o efeito de diferentes dietas para melhora dos níveis e funcionalidade das CPE.

O objetivo desta revisão foi investigar se há evidências do efeito da dieta sobre os níveis e/ou funcionalidade das CPE.

## **Métodos:**

Foi realizado um estudo de revisão sistemática de ensaios clínicos, sendo toda a busca, seleção e análise dos artigos realizados por dois pesquisadores. A pergunta que direcionou essa revisão foi: “Existe relação entre a dieta e os níveis e/ou funcionalidade das células progenitoras endoteliais? ”

A busca bibliográfica foi realizada durante o meses de outubro de 2013 a fevereiro de 2014 por meio de 7 fontes de busca: *Pubmed, Scielo, Lilacs, Trip DataBase, Scopus, Web of Science e Cochrane Library*.

Os limites de busca foram: estudos em humanos, realizados com adultos ou idosos, publicados em inglês, português ou espanhol, a partir do ano de 1997, ano da descoberta das CPE. O desfecho clínico avaliado foi: A avaliação quantitativa ou funcional das CPE. Só foram incluídos ensaios clínicos (randomizados ou não, controlados ou não).

Na estratégia de busca, foram pesquisados, primeiramente, os descritores através do site da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), nos idiomas inglês, português e espanhol das seguintes palavras-chave em português: “células progenitoras endoteliais”, “células angiogênicas circulantes”, “dieta”, “alimento”, “alimentação e “nutrientes”. Somente foram encontrados os descritores para “dieta”, “alimentos”, “alimentação” e “nutrientes”, os outros termos foram utilizados como palavras-chave. Os termos foram combinados da seguinte forma: “células progenitoras endoteliais” e “dieta”; “células progenitoras endoteliais” e “alimentos”; “células progenitoras endoteliais” e “alimentação”; “células progenitoras endoteliais” e “nutrientes; “células angiogênicas circulantes” e “dieta”; “células angiogênicas circulantes” e “alimento”; “células angiogênicas circulantes” e “alimentação” e “células angiogênicas circulantes” e “nutrientes”; A busca foi realizada com os descritores em português, inglês e espanhol em cada base de dado.

A triagem e extração de dados dos artigos foi feita por dois pesquisadores, sendo elaboradas tabelas para o catálogo dos artigos encontrados através da combinação de descritores, *MESH Terms* e palavras-chave. A primeira triagem era realizada através do título, seguido pelo resumo e metodologia do estudo, caso os estudos atendessem aos critérios de inclusão previstos, era obtido o texto completo para determinar a sua inclusão ou não na revisão. Também foi realizada uma busca adicional na referência bibliográfica dos artigos selecionados.



Para a análise da qualidade dos artigos selecionados, foi utilizada a escala Consort<sup>18</sup> como parâmetro.

Em decorrência da heterogeneidade das características das populações e das intervenções testadas, não foi possível realizar a síntese por metanálise.

### **Resultados:**

Seguindo a estratégia definida, a busca bibliográfica resultou em 427 artigos. De acordo com os objetivos do estudo e critérios de inclusão, 5 artigos foram selecionados.

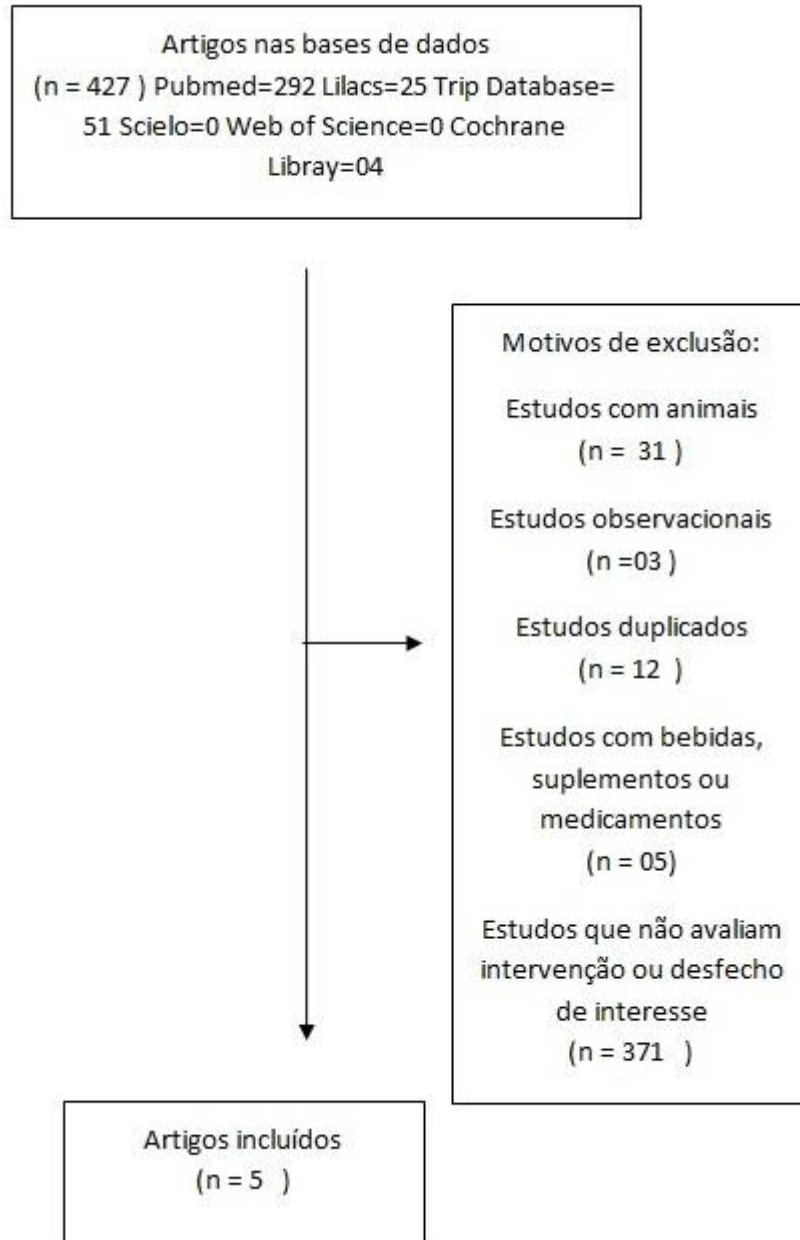


Figura 1: Fluxograma de seleção do estudo.

Em relação a intervenção, três estudos<sup>19-21</sup> avaliaram somente a dieta e dois estudos<sup>22,23</sup> avaliaram a dieta e exercício físico estruturado. Entre as dietas avaliadas, estavam dietas reduzidas em calorias<sup>19,20,22</sup>, a dieta do Mediterrâneo<sup>21,22</sup>, dieta para dislipidemia seguindo as orientações de tratamento não farmacológico<sup>23</sup> do National Cholesterol Education Program<sup>24</sup> e dieta rica em gordura saturada<sup>21</sup>.

O desfecho avaliado na maioria dos estudos foi a quantificação de CPE. Somente um estudo<sup>19</sup> avaliou as CPE qualitativamente com ensaios de migração, capacidade angiogênica e adesão. A quantificação por citometria de fluxo através de marcadores de antígenos foi a técnica mais utilizada<sup>19-22</sup>, seguida da contagem de unidades formadoras de colônia de célula endotelial (UFC-CE) em cultura celular<sup>19,20,23</sup>. A Figura 1 resume os critérios de exclusão dos artigos encontrados.

Três estudos<sup>19,20,22</sup> utilizaram diferentes dietas hipocalóricas como intervenção nutricional. Heida e cols.<sup>19</sup> utilizou dieta industrializada hipolipídica predominante líquida nas primeiras 12 semanas de estudo, seguida por dieta com consistência sólida até completar os 6 meses de intervenção. Foi observada melhora na funcionalidade das CPE nos indivíduos que tiveram perda significativa de peso (10% do peso inicial ou diminuição do IMC).

Fernandez e cols.<sup>22</sup> utilizaram dieta hipocalórica (com restrição de 40% do consumo habitual) baseada na dieta do mediterrâneo (tendo na sua composição 20% de ácidos graxos monoinsaturados, 5 % de poli-insaturados e 5% de ácidos graxos saturados) por 4 meses associada ou não à atividade física de resistência com intensidade de moderada a alta, três vezes por semana. Ambos os grupos apresentaram melhora no níveis de CPE (definidas como células CD34/KDR) e de células CD34, sendo significativamente maior no grupo que realizou atividade física.

Muller-Ehmsen e cols.<sup>20</sup> fizeram acompanhamento nutricional de 149 indivíduos em programa de perda de peso, por 6 meses, e reavaliaram 86 pacientes, observando aumento significativo no número de células CD34 e CD117/CD34 nos pacientes que diminuíram a partir de 2,5kg/m<sup>2</sup> do seu IMC inicial.

Marin e cols.<sup>21</sup> em estudo crossover com 20 idosos, estudaram os efeitos de 3 tipos de dieta por 4 semanas cada: dieta do Mediterrâneo (tendo 15% de proteínas, 47% de carboidratos e 38% de gordura, sendo 24% de gordura monoinsaturada.), dieta rica em gordura saturada (15% de proteínas, 17% de carboidratos e 38% de gorduras, sendo 22% de gordura saturada), e uma terceira dieta com composição de 15% de proteínas, 55% de carboidratos e 30% de gordura, sendo 10% saturados, 12% monoinsaturadas e 8% poli-insaturadas. Todas as dietas possuíam o mesmo teor de colesterol. Foi encontrado aumento nos níveis de CPE somente quando os indivíduos utilizavam a dieta do mediterrâneo.

Croce e cols<sup>23</sup> avaliaram a influência do tratamento não farmacológico sobre os níveis de CPE em pacientes dislipidêmicos que não utilizavam medicação hipolipemiante. Estes pacientes foram randomizados para receber orientação nutricional associada ou não à 30 minutos de atividade física diariamente. Após 4 semanas, observou-se um acréscimo significativo no número de CPE, em ambos os grupos sendo mais evidente no grupo que associou a atividade física.

A Tabela 1 apresenta as principais características dos artigos selecionados e a Tabela 2 apresenta uma síntese dos resultados encontrados pelos estudos.

**Tabela 1: Características Gerais dos artigos avaliados**

Referência do estudo	Intervenção	Duração	Desfecho	Resultados
Nana-Maria Heida, MD et al 2010 <sup>(19)</sup>	Dieta hipocalórica	6 meses.	Funcionalidade	↑ funcionalidade das CPE quando perda de peso >10%
Fernández et al 2012 <sup>(22)</sup>	G1: Dieta do mediterrâneo hipocalórica G2: Dieta do mediterrâneo hipocalórica+ exercício físico.	4 meses.	Número de EPC	G1: ↑ das CPE G2: ↑↑ das CPE
Muller-Ehsem et al, 2008 <sup>(20)</sup>	Dieta hipocalórica	6 meses	Número de EPC	Perda de peso >2,5Kg/m <sup>2</sup> : ↑ das CPE Mantiveram peso: ↔ CPE
Marin et al 2011 <sup>(21)</sup>	Dieta 1: Dieta com alto teor de gordura saturada Dieta 2: Dieta hipolipídica e hiperglicídica Dieta 3: Dieta do Mediterrâneo	3 meses.	Número de EPC	Intervenção 1: ↔ CPE Intervenção 2: ↔ CPE Intervenção 3: ↑ das CPE
Croce et al 2006 <sup>(23)</sup>	G1: Orientações Nutricionais - "NCEP-ATP III" G2: Orientações Nutricionais - "NCEP-ATP III" + exercício físico	1 mês	Número de EPC	G1: ↑ das CPE G2: ↑↑ das CPE

CPE- Células Progenitoras endoteliais; G1- Grupo 1; G2- Grupo 2; NCEP-ATPIII- National

**Tabela 2:Características Gerais dos artigos avaliados**

Referência do estudo	Local	Delineamento	População: Total Intervenção/ Controle	Média de idade (anos)	Média de IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Características dos indivíduos
Nana-Maria Heida, MD et al 2010 <sup>(19)</sup>	Alemanha	Ensaio clínico não controlado.	N=49	42,0 ± 14,0	42,0 ±7,0	Obesos mórbidos
Fernández et al 2012 <sup>(22)</sup>	Espanha	Ensaio clínico randomizado e controlado	N= 40 (20/20)	57,9 ± 5,0	G1:38,4 ± 1,4* G2:37,0 ± 0,7*	Síndrome Metabólica
Muller-Ehsem et al, 2008 <sup>(20)</sup>	Alemanha	Ensaio clínico não controlado.	N=149	52,5 ± 12,0	31,6 ± 5,1	Eutróficos e obesos em programa de perda de peso.
Marin et al 2011 <sup>(21)</sup>	Espanha	Ensaio Clínico Crossover.	N=20 (10/10)	67,1 ± 4,5	31,9 ± 5,5	Idosos saudáveis.
Croce et al 2006 <sup>(23)</sup>	Itália	Ensaio clínico randomizado e controlado	N=38 (20/18)	G1:46,8±8,3* G2:47,8±6,2*	N.I.	Hipercolesterolêmicos não tratados

IMC- Índice de Massa Corporal; G1- Grupo 1; G2- Grupo 2; N.I.- Não informado.

\* Os estudos não informaram a média de idade e IMC da amostra total de participantes.

## **Discussão:**

Apesar da escassa literatura encontrada, estudos incluídos nesta revisão<sup>19–23</sup>, apontam a influência positiva da dieta sobre os níveis e funcionalidade das células progenitoras endoteliais, que contribuem nos processos de neovascularização e de reparo endotelial melhorando a função endotelial<sup>7</sup>.

O uso da dieta do mediterrâneo, que é rica em nutrientes antioxidantes, tem sido associado com uma redução na incidência de doença arterial coronária, câncer e mortalidade geral<sup>25</sup>. Fernandez e cols<sup>22</sup> identificaram aumento nos níveis de CPE circulantes em todos os pacientes que consumiram a dieta do mediterrâneo, e no estudo de Marin e cols<sup>21</sup> além do aumento das CPE foi observada diminuição nos marcadores de estresse oxidativo. O estresse oxidativo e a diminuição de enzimas antioxidantes têm sido associados com a diminuição dos níveis e funcionalidade das CPE<sup>26,27</sup>. Uma hipótese

demonstrada in vitro é de que as CPE apresentam altos níveis de enzimas antioxidantes que são essenciais para manter a sua sobrevivência durante a regeneração dos tecidos em condições de injúria, e precisam de cofatores em níveis adequados para garantir sua funcionalidade<sup>27</sup>. Por outro lado, estudos observacionais já relacionaram o maior consumo de flavonoides na dieta <sup>15,28,29</sup> e consumo de vinho tinto, que é rico em resveratrol, com maiores níveis de CPE <sup>17,30</sup>. Assim, o uso de uma dieta rica em alimentos antioxidantes pode influenciar diretamente a capacidade de reparo endotelial, através do aumento destas células e melhora na sua funcionalidade.

A partir do estudo de Marin e cols <sup>21</sup>, sugere-se que o alto teor de ácidos graxos monoinsaturados (24%) seja outra explicação sobre o efeito da dieta do mediterrâneo no aumento das CPE, já que a ingestão dos outros dois tipos de dieta com variação na quantidade de lipídios insaturados e no teor de gordura saturada não promoveu aumento no número dessas células. Os autores sugerem que a gordura monoinsaturada presente no azeite de oliva extra-virgem (fonte de 80% dos ácidos graxos monoinsaturados das dietas do estudo), que foi consumida em maior quantidade na dieta do mediterrâneo, esteja associada com essa melhora nos níveis das CPE, possivelmente devido à redução da liberação de radicais livres e do estresse oxidativo decorrentes do efeito protetor dos componentes antioxidantes do azeite de oliva.

A literatura sugere que o excesso de peso está relacionado com menores níveis e funcionalidade de CPE de indivíduos obesos<sup>19,20,31</sup> e que a perda de peso decorrente do uso de uma dieta hipocalórica, <sup>19,20,32</sup> está relacionada com a melhora destes parâmetros, o que poderia contribuir para redução do risco cardiovascular nestes indivíduos. No estudo de Muller-Ehmsen e cols <sup>20</sup>, foi observado aumento do número de CPE nos indivíduos que apresentaram perda de peso superior a 2,5 kg/m<sup>2</sup>, enquanto nos que não apresentaram perda de peso ou a mesma foi inferior a esse limiar, não se demonstrou alteração nos níveis das CPE. Heida e cols <sup>19</sup> também encontraram aumento da funcionalidade das CPE em indivíduos que apresentaram perda de peso superior a 10% do peso corporal. Tais achados confirmam a contribuição da redução do peso nos níveis das CPE.

Sabe-se que a habilidade das CPE de conferir proteção vascular depende não só da sua concentração, como também da sua capacidade funcional. As CPE atuam tanto se diferenciando em células endoteliais como na estimulação parácrina da angiogênese<sup>19,33</sup>. Suas características funcionais podem ser avaliadas através de ensaios específicos em

laboratório. Heida e cols <sup>19</sup> analisaram a capacidade funcional das CPE, com resultados satisfatórios na melhora da capacidade angiogênica in vitro e in vivo das CPE de pacientes que perderam peso. Entretanto este foi o único estudo que avaliou estes parâmetros, o que limita a avaliação dos resultados nos outros estudos.

Recentemente tem sido demonstrado que a funcionalidade das CPE pode ser modulada pela atividade física. Diversos ensaios clínicos e revisões sobre o tema <sup>12-14</sup>, apontam que o exercício físico atua no aumento dos níveis e funcionalidade das EPCS, mobilizando as CPE para a circulação periférica. Dois estudos <sup>22,23</sup> incluídos nesta revisão investigaram além da dieta, o efeito da associação de exercício físico e encontraram um aumento mais acentuado das CPE nos grupos que realizaram a atividade física.

É importante frisar que os artigos avaliados utilizaram diferentes protocolos para caracterização e quantificação das CPE, sendo este um fator limitante para a comparação entre os resultados. A caracterização das CPE se baseia na identificação de marcadores de superfície através da citometria de fluxo ou através da contagem de unidades formadoras de colônia em meio específico para crescimento de CPE; no entanto, não há um protocolo único definido para essa técnicas, o que já levou a resultados discrepantes entre estudos<sup>34</sup>.

Na literatura<sup>35,36</sup> são descritos dois tipos de CPE, as chamadas CPE “precoces” ou “células angiogênicas circulantes” e as denominadas CPE “tardias” ou “formadoras de colônias de células endoteliais”, que possuem algumas características distintas. Assim, a identificação inequívoca e padronização de técnicas quantitativas e qualitativas são necessárias para a validação dos resultados encontrados.

Outra limitação é referente à intervenção com dieta. Destaca-se a possibilidade de não adesão ao tratamento nutricional recomendado, o que dificulta a análise correta da intervenção, bem como do não controle sobre o consumo de outros alimentos que poderiam influenciar no resultado, além do tempo pequeno de seguimento. Podem ser gerados ainda alguns fatores de confundimento, como por exemplo, a perda de peso, favorecida por ingestão de dieta hipocalórica, e o aumento do número de CPE. São necessários estudos complementares onde se possam investigar se o aumento nos níveis das células foi alcançado em virtude da terapia nutricional adequada ou da perda de peso obtida.

Por fim, o foco desta revisão foi selecionar estudos que utilizaram dieta como intervenção, porém há outros estudos na literatura que pesquisaram sobre nutrientes específicos<sup>15,29</sup>, em cápsulas<sup>37</sup> ou uso de bebidas<sup>17,30,38</sup> e sua influência sobre as CPE, com resultados interessantes. De todo modo, o que se tem demonstrado é que os nutrientes e a dieta do indivíduo são fatores de grande influência sobre os níveis e funcionalidade das CPE.

### **Conclusões:**

Não há um consenso sobre uma dieta padrão que influencie a função endotelial através do aumento de CPE ou de sua funcionalidade. Entretanto, as evidências apontam que uma dieta saudável associada à manutenção do peso ideal ou perda de peso em pacientes com sobrepeso ou obesidade, tem efeito positivo sobre as CPE e o endotélio. Esta revisão sistemática demonstra a escassez na literatura de estudos bem controlados que avaliem a associação da dieta com os níveis e funcionalidade das CPE, havendo necessidade da realização de estudos com tal objetivo e com um maior número de pacientes, buscando assim ampliar os conhecimentos que fundamentem a prática clínica baseada em evidências.

### **Agradecimentos:**

Este trabalho teve o apoio financeiro das seguintes instituições: Capes, Faperj e InCor/FMUSP-HCFMUSP



## **Referências Bibliográficas**

1. WHO | Strategy documents [Internet]. WHO. [citado 2 de maio de 2014]. Recuperado de: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/en/>
2. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010 Oct;9(12):830-4 2010.
3. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85(3).
4. Donahue M, Quintavalle C, Chiariello GA, Condorelli G, Briguori C. Endothelial progenitor cells in coronary artery disease. *Biol Chem.* 2013;394(10).
5. Shantsila E, Watson T, Lip GYH. Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Disorders. *J Am Coll Cardiol.* 20 de fevereiro de 2007;49(7):741–52.
6. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89(1):e1–e7.
7. Balbarini A, Barsotti MC, Di Stefano R, Leone A, Santoni T. Circulating endothelial progenitor cells characterization, function and relationship with cardiovascular risk factors. *Curr Pharm Des.* 2007;13(16):1699–713.
8. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med.* 2003;348(7):593–600.
9. Pirro M, Schillaci G, Romagno PF, Mannarino MR, Bagaglia F, Razzi R, et al. Influence of Short-term Rosuvastatin Therapy on Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2009;14(1).
10. Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: Focus on lifestyle. *Microvasc Res.* 2010;79(3):184–92.
11. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, Hubbard VS, Jesus JM de, Lee I-M, et al. 2013 AHA/ACC Guideline on Lifestyle Management to Reduce Cardiovascular Risk A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 12 de novembro de 2013;01.cir.0000437740.48606.d1.
12. Da Silva JFR, Rocha NG, Nóbrega ACL. Mobilização de células progenitoras endoteliais com o exercício em sadios: uma revisão sistemática. *Arq Bras Cardiol.* 2012;98(2).
13. De Biase C, De Rosa R, Luciano R, De Luca S, Capuano E, Trimarco B, et al. Effects of physical activity on endothelial progenitor cells (EPCs). *Vasc Physiol.* 2014;4:414.
14. Ribeiro F, Ribeiro IP, Alves AJ, do Céu Monteiro M, Oliveira NL, Oliveira J, et al. Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in cardiovascular disease: a

systematic review. *Am J Phys Med Rehabil Assoc Acad Physiatri*. novembro de 2013;92(11):1020–30.

15. Chan YH. Dietary intake of phytoestrogen is associated with increased circulating endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2011;18(3):360–8.

16. Mano R, Ishida A, Ohya Y, Todoriki H, Takishita S. Dietary intervention with Okinawan vegetables increased circulating endothelial progenitor cells in healthy young women. *Atherosclerosis*. 2009;204(2).

17. Hamed S, Alshiek J, Aharon A, Brenner B, Roguin A. Red wine consumption improves in vitro migration of endothelial progenitor cells in young, healthy individuals. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(1).

18. Dainesi SM, Aligieri P. Como as recomendações “CONSORT” podem assegurar a qualidade dos relatos de estudos clínicos? *Rev Assoc Médica Bras*. abril de 2005;51(2):66–66.

19. Heida N-M, Müller J-P, Cheng I-F, Leifheit-Nestler M, Faustin V, Riggert J, et al. Effects of Obesity and Weight Loss on the Functional Properties of Early Outgrowth Endothelial Progenitor Cells. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(4).

20. Muller-Ehmsen J, Braun D, Schneider T, Pfister R, Worm N, Wielckens K, et al. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction. *Eur Heart J*. 3 de janeiro de 2008;29(12):1560–8.

21. Marin C, Ramirez R, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Carracedo J, et al. Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. *Am J Clin Nutr*. 1 de fevereiro de 2011;93(2):267–74.

22. Fernández JM, Rosado-Álvarez D, Da Silva Grigoletto ME, Rangel-Zúñiga OA, Landaeta-Díaz LL, Caballero-Villarraso J, et al. Moderate-to-high-intensity training and a hypocaloric Mediterranean diet enhance endothelial progenitor cells and fitness in subjects with the metabolic syndrome. *Clin Sci Lond Engl* 1979. setembro de 2012;123(6):361–73.

23. Croce G, Passacuale G, Necozone S, Ferri C, Desideri G. Nonpharmacological Treatment of Hypercholesterolemia Increases Circulating Endothelial Progenitor Cell Population in Adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 5 de janeiro de 2006;26(5):e38–e39.

24. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA J Am Med Assoc*. 16 de maio de 2001;285(19):2486–97.

25. Knoops KTB, de Groot LCPGM, Kromhout D, Perrin A-E, Moreiras-Varela O, Menotti A, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA J Am Med Assoc*. 22 de setembro de 2004;292(12):1433–9.

26. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. julho de 2004;31(7):407–13.
27. Groleau J, Dussault S, Turgeon J, Haddad P, Rivard A. Accelerated vascular aging in CuZnSOD-deficient mice: impact on EPC function and reparative neovascularization. *PloS One*. 2011;6(8):e23308.
28. Felice F, Zambito Y, Di Colo G, D'Onofrio C, Fausto C, Balbarini A, et al. Red grape skin and seeds polyphenols: Evidence of their protective effects on endothelial progenitor cells and improvement of their intestinal absorption. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV*. janeiro de 2012;80(1):176–84.
29. Heiss C, Jahn S, Taylor M, Real WM, Angeli FS, Wong ML, et al. Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 13 de julho de 2010;56(3):218–24.
30. Huang P-H, Chen Y-H, Tsai H-Y, Chen J-S, Wu T-C, Lin F-Y, et al. Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. abril de 2010;30(4):869–77.
31. Tsai TH, Chai HT, Sun CK, Yen CH, Leu S, Chen YL, et al. Obesity suppresses circulating level and function of endothelial progenitor cells and heart function. *J Transl Med*. 2012;10.
32. Mikirova NA, Casciari JJ, Hunninghake RE, Beezley MM. Effect of Weight Reduction on Cardiovascular Risk Factors and CD34-positive Cells in Circulation. *Int J Med Sci*. 1 de agosto de 2011;8(6):445–52.
33. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 4 de março de 2003;107(8):1164–9.
34. George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng*. fevereiro de 2006;12(2):331–5.
35. Van Craenenbroeck EM, Van Craenenbroeck AH, van Ierssel S, Bruyndonckx L, Hoymans VY, Vrints CJ, et al. Quantification of circulating CD34+/KDR+/CD45dim endothelial progenitor cells: analytical considerations. *Int J Cardiol*. 1 de setembro de 2013;167(5):1688–95.
36. Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative Stress Impairs Endothelial Progenitor Cell Function. *Antioxid Redox Signal*. novembro de 2008;10(11):1895–907.
37. Mikirova NA, Jackson JA, Hunninghake R, Kenyon J, Chan KWH, Swindlehurst CA, et al. Nutraceutical augmentation of circulating endothelial progenitor cells and hematopoietic stem cells in human subjects. *J Transl Med*. 2010;8.

38. Kim W, Jeong MH, Cho SH, Yun JH, Chae HJ, Ahn YK, et al. Effect of green tea consumption on endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in chronic smokers. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* agosto de 2006;70(8):1052–7.





