

**CAROLINA PEREIRA**

**Avaliação da medida do índice tornozelo-braquial em portadores de hipercolesterolemia familiar**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Raul Dias dos Santos Filho

São Paulo

2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Carolina

Avaliação da medida do índice tornozelo-braquial em portadores de  
hipercolesterolemia familiar / Carolina Pereira. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.

Orientador: Raul Dias dos Santos Filho.

Descritores: 1.Hipercolesterolemia familiar 2.Doença arterial periférica  
3.Índice tornozelo-braço 4.Aterosclerose 5.Doenças cardiovasculares  
6.Tomografia computadorizada multidetectores

USP/FM/DBD-420/13

**Dedicatória**

---

*Ao meu anjo da guarda, este, mesmo que invisível sempre esteve ao meu lado e sua presença me guiou até aqui mesmo por caminhos completamente desconhecidos...*

*Aos meus pais, Isabel de Oliveira e José Alceu Pereira pela educação, amor e principalmente por acreditarem em mim*

*Aos meus irmãos, Rodrigo Cristo Pereira e José Guilherme Pereira, companheiros especiais para a vida inteira...*

*Aos meus sobrinhos Murilo Henrique Pereira e Leonardo Ichiro Adati Pereira, por toda alegria que sinto quando estou com vocês*

## **Agradecimentos**

---

*Ao meu orientador Prof. Dr. Raul Dias dos Santos Filho, pela inspiração científica e oportunidades de crescimento no meio científico e profissional. Seu exemplo de pessoa, pesquisador e amigo é o que me incentiva a continuar a percorrer as trilhas do caminho acadêmico. Muito obrigada por acreditar em mim e pela confiança depositada!*

*Aos pacientes que contribuíram para essa tese. Cada um com sua história me tornou uma pessoa melhor. Sou eternamente grata a cada um de vocês!*

*À Ana Carolina Moron Gagliardi Miguel, grande inspiradora dessa realização, sem seu incentivo isso não seria possível.*

*Aos queridos amigos Thiago Proença, Flávia Orlandini, Rodrigo Krynicka e Célia Satie Adati, muito obrigada pelo apoio incondicional.*

*Ao Dr. Marcio Hiroshi Miname, pelo apoio importante, sempre presente em todos os momentos na condução dessa tese, nem tenho como lhe agradecer...*

*À Dra. Marcia Regina P. Makdisse, pelo treinamento técnico e importantes considerações na condução desse trabalho.*

*À Carolina Watanabe por seu auxílio e presteza profissional*

*À Marisa Goes, seu carinho e apoio foram essenciais.*

*Às grandes amigas Marcia Carneiro, Débora Pupo, Cristina Cícero, Carolina Piras de Oliveira e Anelise Jabali Barreto, vocês foram verdadeiras amigas nos momentos difíceis.*

*À querida Sueli Stifoni pela ajuda e conselhos cotidianos.*

*À Dra. Viviane Rocha, seu sorriso e sua presença é iluminada!*

*Ao Dr. Wilson Salgado pelo apoio carinhoso de sempre.*

*À Dra. Ana Paula pela grande ajuda, estímulo e amizade.*

*Ao Dr. Marcelo Katz pelo exemplo de seriedade científica e profissional e por todo apoio e compreensão nos momentos difíceis desse trabalho.*

*Ao Rogério Ruscitto do Prado que além de conduzir toda análise estatística desse trabalho com muita competência é um grande amigo.*

*Às funcionárias da pós graduação, Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho, Tatiane Lago e Nathalia Barbosa, pelo carinho e atenção.*

*Aos companheiros da Unidade Clínica de Lípidos, Henrique Staniak, Antonio Laurinavicius, Paulo Harada, Leonardo Mangili, pelo apoio, convívio e amizade.*

**Normatização adotada**



Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).  
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.  
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com Lista of Journals Indexed in Index Medicus.

## **Sumário**

---

**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****RESUMO****SUMMARY**

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Hipercolesterolemia Familiar.....	2
1.2	Aterosclerose em pacientes com HF.....	3
1.3	Doença Arterial Periférica (DAP).....	4
1.4	Índice Tornozelo- Braquial(ITB).....	6
1.5	Calcificação da artéria coronária (CAC) e sua relação com a Aterosclerose .....	9
1.6	Angiotomografia de coronárias.....	11
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1	Desenho do Estudo.....	18
4.2	Aspectos Éticos.....	18
4.3	População do estudo.....	18
4.4	Elegibilidade.....	19
4.5	Diagnóstico de HF.....	20
4.5.1	Diagnóstico Clínico.....	20
4.5.2	Diagnóstico genético molecular.....	22
4.6	Avaliação Clínica população HF heterozigótica.....	26
4.7	Avaliação Laboratorial da população HF heterozigótica.....	28
4.8	Parâmetros clínicos e laboratoriais dos controles normolipidêmicos.....	28
4.9	Definição de Doença Arterial Periférica (DAP).....	29
4.10	Definição de claudicação intermitente.....	29
4.11	Definição de doença cardiovascular clínica.....	30
4.12	Avaliação do Índice Tornozelo-Braquial (ITB).....	30
4.13	Avaliação e análise da placa coronária pela angiotomografia.....	31
4.14	Definição de calcificação e placas coronárias.....	31
4.15	Análise Estatística.....	32

---

<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
5.1	População estudada.....	36
5.2	Perfil clínico e laboratorial de portadores de hipercolesterolemia familiar e normolipidêmicos.....	37
5.3	Associação entre Hipercolesterolemia familiar e Doença Arterial Periférica.....	39
5.4	Determinantes da presença de doença arterial periférica diagnosticada pelo ITB alterado em portadores de hipercolesterolemia familiar.....	42
5.5	Associação entre doença cardiovascular clínica e doença arterial periférica diagnosticada pelo ITB alterado em portadores de hipercolesterolemia familiar.....	45
5.6	Associação entre marcadores de aterosclerose subclínica representada pelos exames de angiotomografia de coronárias e escore de cálcio coronário e valores de ITB em portadores de hipercolesterolemia familiar.....	48
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
6.1	Doença arterial periférica subclínica: importância do diagnóstico da HF.....	51
6.1.1	Doença arterial periférica e HF comparação com a literatura..	52
6.2	Determinantes da DAP em portadores de HF heterozigótica...	53
6.3	Associação entre DAP e manifestação prévia de DCV em portadores de HF heterozigótica.....	54
6.3.1	Há espaço para identificação da DAP na predição de eventos cardiovasculares na HF?.....	55
6.4	Comparação dos valores de ITB e marcadores de aterosclerose subclínica detectados pela angiotomografia e escore de cálcio coronário.....	56
<b>7</b>	<b>LIMITAÇÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

**Listas**

---

<b>HF</b>	Hipercolesterolemia familiar
<b>LDL-c</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LDLR</b>	Receptor de LDL
<b>ApoB</b>	apolipoproteína B
<b>ApoB-100</b>	apolipoproteína B-100
<b>PCSK9</b>	pro-proteína convertasesubtilisina/kexina tipo 9
<b>DAC</b>	doença arterial coronariana
<b>DCV</b>	doença cardiovascular
<b>DAP</b>	doença arterial periférica
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>VLDL</b>	Lipoproteína rica em triglicérides
<b>IDL</b>	Lipoproteína de densidade intermediária
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>PA</b>	pressão arterial
<b>PAS</b>	pressão arterial sistólica
<b>PAD</b>	pressão arterial diastólica
<b>EBT</b>	tomografia de emissão de elétrons
<b>CAVI</b>	índice vascular cardio-tornozelo
<b>HAS</b>	hipertensão arterial sistêmica
<b>CAC</b>	calcificação da artéria coronária
<b>TCMD</b>	tomografia computadorizada com múltiplos detectores
<b>CT</b>	colesterol total
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>TG</b>	Triglicérides
<b>n-HDL</b>	partículas não-HDL
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>ITB</b>	índice tornozelo-braquial
<b>DAP</b>	doença arterial periférica
<b>EIMC</b>	espessura íntima-média das carótidas
<b>Dutch</b>	DutchLipidClinic Network
<b>MEDPED</b>	

<b>mg/dL</b>	miligramas/ decilitro
<b>mmHg</b>	milímetros de mercúrio
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>%</b>	porcentagem
<b>&lt;</b>	menor que
<b>&gt;</b>	maior que
<b>≤</b>	menor ou igual que
<b>=</b>	igual
<b>±</b>	mais ou menos
<b>n</b>	amostra
<b>p</b>	nível descritivo de probabilidade do teste

---

<b>Tabela 1.</b>	Comparação dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre portadores de hipercolesterolemia familiar (HF) e controles normolipidêmicos.....	38
<b>Tabela 2.</b>	Análise dos parâmetros clínicos e laboratoriais segundo alteração dos valores do ITB ( $\leq 0,90$ ) entre os grupos estudados.....	41
<b>Tabela 3.</b>	Parâmetros clínicos e laboratoriais em uma população de indivíduos com hipercolesterolemia familiar (n=212) e normolipidêmicos (n=524) associados significativamente ao diagnóstico de doença arterial periférica (ITB<0,90) conforme resultado do modelo de regressão logística múltipla.....	42
<b>Tabela 4.</b>	Comparação dos valores de ITB com parâmetros clínicos e laboratoriais em portadores de hipercolesterolemia familiar...	43
<b>Tabela 5.</b>	Parâmetros clínicos e laboratoriais em uma população de indivíduos com hipercolesterolemia familiar (n=212) associados significativamente ao diagnóstico de doença arterial periférica (ITB $\leq 0,90$ ) conforme resultado do modelo de regressão logística múltipla.....	45
<b>Tabela 6.</b>	Comparação da presença de doença cardiovascular com parâmetros clínicos e laboratoriais em portadores de hipercolesterolemia familiar.....	46
<b>Tabela 7.</b>	Parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados à presença de doença cardiovascular em indivíduos com hipercolesterolemia familiar (n=212) conforme modelo de regressão logística múltipla.....	48
<b>Tabela 8.</b>	Comparação dos valores de ITB e a presença de placa aterosclerótica e escore de cálcio detectados pela angiotomografia de coronárias em portadores de hipercolesterolemia familiar (n=83).....	49



<b>Figura 1.</b>	Fluxograma de elegibilidade do estudo.....	35
<b>Figura 2.</b>	Comparação da prevalência de doença arterial periférica em portadores de hipercolesterolemia familiar e controles normolipidêmicos.....	40

<b>Anexo 1.</b>	Questionário de claudicação de Edimburgo.....	35
-----------------	---	----

"Quem conhece a sua ignorância revela a mais profunda sapiência. Quem ignora a sua ignorância vive na mais profunda ilusão".

**LAO – TSÉ**



Pereira C. Avaliação da medida do índice tornozelo-braquial em portadores de hipercolesterolemia familiar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 76p.

A hipercolesterolemia familiar (HF) é uma doença de herança genética autossômica dominante caracterizada pela elevação dos níveis séricos de colesterol total e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL- c). Conhecida por estar estreitamente relacionada ao processo aterosclerótico, a HF pode determinar o desenvolvimento de lesões obstrutivas precoces em distintos leitos arteriais. Nesse contexto, a HF também tem sido proposta como um fator de risco para a doença arterial periférica (DAP). Avaliamos assim de forma sistemática por meio de um estudo transversal e observacional, a prevalência de DAP em uma população brasileira de portadores de HF. Estudamos também sua associação com diversos fatores de risco cardiovascular, incluindo sexo, idade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, tabagismo, perfil lipídico, níveis séricos de glicemia e creatinina. Avaliou-se também a associação da DAP com histórico prévio de doença cardiovascular (DCV) bem como sua associação com marcadores de aterosclerose subclínica representados pela angiotomografia coronariana e escore de cálcio coronário. Foram estudados 212 portadores de HF, sendo que em 86% foi comprovada presença de mutação do receptor da LDL e um grupo de comparação composto por 524 indivíduos normolipidêmicos. O rastreamento da DAP foi realizado por dois avaliadores treinados, pela medida do índice tornozelo-braquial (ITB) avaliado em repouso na posição supina, com Doppler vascular portátil. Houve maior prevalência de DAP definida por  $ITB \leq 0,90$  em portadores de HF comparados aos controles (17,5% vs. 2,3%, respectivamente;  $p < 0,001$ ). As variáveis que se associaram independentemente com a alteração dos valores do ITB nos grupos estudados foram, a idade, antecedente prévio de doença cardiovascular e o indivíduo ser portador de HF (OR= 5,77 IC 95% 2,83-11,77,  $p < 0,001$ ). Na população de HF as variáveis que se associaram independentemente à alteração dos valores de ITB foram a idade e a presença de histórico de tabagismo ativo ou passado. Houve uma associação univariada entre o histórico de doença cardiovascular e o diagnóstico de doença arterial periférica nesta população (OR= 3,20 IC 95% 1,53-6,67,  $p = 0,001$ ), porém tal associação não se manteve significativa quando ajustada por variáveis de confusão. Da mesma forma não se encontrou associação entre os valores alterados de ITB e a presença de placa coronariana e sua gravidade, bem como com o escore de cálcio coronário. Os dados sugerem dissociação entre o desenvolvimento da aterosclerose em diferentes leitos arteriais. Em conclusão, nossos resultados indicam que a DAP é mais frequente na HF do que em indivíduos normolipidêmicos e que outros fatores de risco potencializam o colesterol para sua presença. Não foi encontrada associação independente da alteração do ITB com manifestação de DCV prévia e com a aterosclerose coronária subclínica. Contudo, mais estudos são necessários para determinar o papel do uso do ITB como ferramenta para avaliação do risco de eventos cardiovasculares nessa população.

**Descritores:** 1. Hipercolesterolemia Familiar; 2. Doença Arterial Periférica; 3. Índice Tornozelo-braço; 4. Aterosclerose; 5. Doenças Cardiovasculares; 6. Tomografia Computadorizada

**Summary**

---

Pereira C. Assessment of the ankle-brachial index in patients with familial hypercholesterolemia [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013. 76p.

Familial hypercholesterolemia (FH) is a genetic disease of autosomal dominant inheritance characterized by elevated serum levels of total and low density lipoprotein (LDL - c) cholesterol. FH is associated to atherosclerosis and can determine the early development of obstructive lesions in different arterial beds. In this context, FH has also been proposed as a risk factor for peripheral arterial disease (PAD). In a cross-sectional observational study the prevalence of PAD in a Brazilian population of patients with FH was determined. We also study its association with several cardiovascular risk factors, including gender, age, hypertension, diabetes mellitus, smoking, lipid profile, serum glucose and creatinine. The association of PAD with previous manifestations of cardiovascular disease (CVD) and with markers of subclinical coronary atherosclerosis detected by computed tomography coronary angiography and coronary calcium score was also evaluated. We studied 212 patients with FH, of which 86% had a confirmed diagnosis by the presence of LDL receptor mutations, and a comparison group consisting of 524 normolipidemic subjects. PAD diagnosis was made by 2 trained evaluators, by the ankle-brachial index (ABI) measured at rest in the supine position. There was a higher prevalence of PAD defined as  $ABI \leq 0.90$  in patients with FH compared with controls (17.5% vs. 2.3%,  $p < 0.001$ ). The variables that were independently associated with altered ABI values in both groups were age, previous history of CVD and the diagnosis of FH (OR = 5.77 95% CI 2.83 to 11.77,  $p < 0.001$ ). In FH subjects variables independently associated with altered ABI values were age and the presence of current or past smoking history. There was a univariate association between CVD history and the diagnosis of PAD in this population (OR = 3.20 95% CI 1.53 to 6.67,  $p = 0.001$ ), but this association did not remain significant when adjusted for confounders. Likewise, no association was found between the values of altered ABI and the presence of coronary plaque and its severity, as well with the coronary calcium score. The data suggest that there is a dissociation of atherosclerosis development in different arterial beds. In conclusion, our results indicate that PAD is more common in FH than in normolipidemic subjects and that other risk factors potentiate cholesterol to determine its presence. No independent association was found between the alteration of ABI values with manifestations of prior CVD, as well as with the presence of subclinical coronary atherosclerosis. More studies are needed to determine the role of ABI use as a tool for assessing the risk of cardiovascular events in FH.

Descriptors : 1 . Familial Hypercholesterolemia ; 2 . Peripheral Arterial Disease  
3. Ankle- brachial index 4. Atherosclerosis 5. Cardiovascular Diseases ; 6 .  
Computed Tomography



# **1. Introdução**

---

## 1.1. Hipercolesterolemia Familiar

Dentre os principais fatores de risco para a doença cardiovascular, destaca-se com relevante importância clínica e epidemiológica a Hipercolesterolemia Familiar (HF)<sup>[1]</sup>. A HF é uma doença de herança genética autossômica dominante caracterizada pela elevação dos níveis séricos de colesterol total e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL- c)<sup>[2]</sup>. Este aumento decorre geralmente da ausência e ou diminuição dos receptores específicos de LDL (LDL-R), causado por mais de 1.600 mutações descritas até o momento; pode também ser secundário a defeito familiar no gene APOB que codifica a apolipoproteína B-100 (ApoB-100) ou ainda, quando existe catabolismo acelerado do LDL-R, devido a mutações com ganho de função no gene pró-proteína convertasesubutilisina/kexina tipo 9 (PCSK-9), que codifica a proteína NARC-1<sup>[2, 3]</sup>.

O fenótipo e história natural dos três defeitos são muito similares sendo que do ponto de vista clínico os pacientes podem ser agrupados dentro do diagnóstico clínico da HF<sup>[3]</sup>. A forma heterozigótica é um dos distúrbios metabólicos mais freqüentes na população geral (1:500) e a forma homozigótica é rara (1:1.000.000)<sup>[4]</sup>. Atualmente, estima-se que existam 10.000.000 de pessoas portadoras de HF no mundo<sup>[4]</sup>.

Nos indivíduos homozigóticos não há expressão dos receptores hepáticos da LDL, determinando valores de LDL-c acima de 500 mg/dL<sup>[4]</sup>. Nos heterozigóticos ocorre diminuição do número de receptores ou sua disfunção parcial, sendo os valores dessa fração geralmente acima do percentil 95 da população<sup>[4]</sup>. O diagnóstico clínico de HF é realizado por meio do nível sérico

de LDL-c do paciente e de seus parentes de primeiro grau, da história familiar de coronariopatia precoce, da presença de estigmas de depósito de colesterol na pele e tendões<sup>[5]</sup>. Atualmente existe a possibilidade de estabelecer o diagnóstico genético da HF através da detecção de mutações dos 3 genes envolvidos por técnicas de biologia molecular<sup>[5]</sup>. Clinicamente, a HF manifesta-se por xantomas tendinosos, principalmente no tendão de Aquiles, na face extensora das articulações dos dedos das mãos, cotovelos, joelhos e dedos dos pés e às vezes por xantomas tuberosos cutâneos<sup>[2]</sup>. Esses sinais exteriorizam-se na adolescência nos heterozigóticos e entre quatro e seis anos nos homozigóticos. A doença aterosclerótica coronariana manifesta-se de forma precoce e muitas vezes fatal: nos homozigóticos geralmente entre a primeira e segunda década de vida e nos heterozigóticos entre a quarta e quinta década de vida<sup>[2]</sup>.

## **1.2. Aterosclerose em pacientes com HF**

Conhecida por estar associada a níveis elevados de colesterol e estreitamente relacionada ao processo aterosclerótico, a HF pode determinar o desenvolvimento de lesões obstrutivas precoces em distintos leitos arteriais e o aumento substancial do risco relativo de morte por doença coronária<sup>[6]</sup>. A associação entre HF e doença arterial coronária (DAC) está bem estabelecida<sup>[5-7]</sup>. As evidências demonstram que quanto maior o nível do LDL-c, maior o risco de eventos cardiovasculares<sup>[8]</sup>. Por outro lado, para uma dada redução dos níveis de LDL-c, observa-se uma redução proporcional no risco de

eventos coronarianos, qualquer que seja o valor lipídico ou o risco absoluto basal<sup>[8]</sup>.

Existe um risco cumulativo de doença coronária fatal e não fatal na ausência de terapia hipolipemiante na proporção de 50% em homens de 50 anos e de 30% em mulheres de 60 anos em portadores de HF<sup>[9, 10]</sup>. No estudo do Simon Broome Register Group, realizado no período de 1980 até 1995 no Reino Unido, houve um aumento do risco relativo de morte por doença coronária de 50 vezes para homens (IC95: 17-105) e de 125 vezes para mulheres (IC95: 15-140) na faixa etária 20-39 anos<sup>[6]</sup>.

Atualmente mesmo com o advento das estatinas para diminuição do LDL-c a ocorrência de eventos cardiovasculares em homens e mulheres portadores de HF sem manifestação prévia de doença coronária nas faixas etárias dos 15 aos 66 anos de idade são respectivamente 3% e 1,6% ao ano<sup>[11]</sup>. Neste estudo, os portadores de DAC estabelecida apresentaram taxas anuais médias de eventos cardiovasculares de 15% para os homens e 14% para as mulheres. As taxas anuais de mortalidade para portadores de DAC foram respectivamente 1,6% para homens e 0,5% para mulheres, valores considerados muito altos segundo as Diretrizes de Prevenção de Aterosclerose da Sociedade Européia de Cardiologia de 2003<sup>[11]</sup>. Dada a associação entre o aumento dos níveis de colesterol e aterosclerose, a HF também tem sido proposta como um fator de risco para doença aterosclerótica em outros leitos arteriais, como por exemplo, o carotídeo, cerebral e periférico<sup>[4]</sup>. Dentro desse cenário, a detecção da aterosclerose subclínica nessa população, destaca-se de forma importante. Recentemente, Civeira et al. numa diretriz de cuidado de portadores de HF <sup>[4]</sup>, assumiram sem a comprovação de estudos prospectivos,

que a presença de aterosclerose subclínica é um marcador de risco elevado de evento coronário. Essa diretriz recomendou que a sua detecção seja feita de forma ativa considerando-se a alta prevalência de achados nesses indivíduos. Contudo, a importância dessa informação para a estratificação de risco e possíveis benefícios secundários a um tratamento mais agressivo, baseado na identificação da aterosclerose subclínica em portadores de HF ainda necessita ser comprovada<sup>[4]</sup>.

A IV Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose recomenda que a procura de aterosclerose subclínica seja realizada por intermédio de exames marcadores tais como a angiotomografia de coronárias e pelo escore de cálcio.

Considerando a doença arterial periférica (DAP) como parte do processo de aterosclerose sistêmica<sup>[12]</sup>, muitos autores discutem atualmente a inclusão de seu rastreamento em populações de alto risco cardiovascular, nesse sentido destaca-se o uso do índice tornozelo braquial (ITB) para a detecção dessa importante condição em indivíduos de risco intermediário, sob a condição de agravante de risco e podendo elevar este a uma condição de risco superior.

### **1.3. Doença Arterial Periférica (DAP)**

A doença arterial periférica (DAP) resulta do estreitamento e do enrijecimento da luz das artérias dos membros inferiores, como parte do processo de doença aterosclerótica vascular sistêmica<sup>[13, 14]</sup>. Tem alta prevalência e está associada a elevado risco de eventos cardiovasculares

fatais e não-fatais (morte, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral)<sup>[13, 14]</sup>.

Estima-se que na Europa e América do Norte, 27 milhões de pessoas são portadores de doença arterial periférica e que provavelmente esse número esteja subestimado<sup>[15]</sup>, uma vez que a maioria dos pacientes é assintomático ou não apresenta o sintoma clássico da doença, a claudicação intermitente<sup>[16]</sup>.

A DAP, independente de sintomas, está associada à doença arterial obstrutiva em outros leitos vasculares (coronariano, cerebral, carotídeo) e conseqüentemente a eventos cardiovasculares, numa proporção de 4 a 6% ao ano em portadores da doença<sup>[17-20]</sup>.

Os fatores de risco para DAP são semelhantes aos associados à doença arterial coronária e incluem idade avançada, tabagismo, diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade e hipertensão arterial sistêmica<sup>[21, 22]</sup>. A prevalência de DAP na população geral, em indivíduos acima de 55 anos, é de 19,1%<sup>[23]</sup>, enquanto que em pacientes acima dos 65 anos é de 19,8% e 16,8%, respectivamente, em homens e mulheres<sup>[24]</sup>.

Apesar de alguns desses indicadores serem considerados como fatores de risco, na maioria dos casos a evidência da relação destes com a DAP só aparece quando associados, entretanto a cessação do tabagismo e o tratamento da dislipidemia mostraram-se eficazes na modificação do desenvolvimento da DAP<sup>[16]</sup>.

Dentre os fatores de risco principais para a DAP, destacam-se o tabagismo com um risco relativo (RR) de 3,7, diabetes mellitus (para cada aumento de 1% no valor da hemoglobina glicada (HbA1c) há um aumento de 26% no risco de desenvolvimento de DAP), hipertensão arterial que está

associada ao risco de DAP, porém com um risco relativo menor do que o tabagismo<sup>[16]</sup>.

A associação entre dislipidemia e DAP, foi demonstrada no estudo de Framingham, onde o colesterol total  $\geq 270$  mg/dl está associado com o dobro da incidência de DAP<sup>[16]</sup> porém, o HDL-colesterol (HDL-c) baixo demonstrou-se melhor preditor para a ocorrência de DAP. Em outro estudo, pacientes com DAP apresentaram valores elevados de triglicérides, VLDL colesterol, IDL colesterol e valores baixos de HDL-c quando comparado ao grupo controle<sup>[25]</sup>. Embora alguns estudos demonstrem que o colesterol total é um forte fator de risco independente para a DAP, outros ainda não conseguiram confirmar essa associação<sup>[26]</sup>. Algumas evidências sugerem que o tratamento da hiperlipidemia pode reduzir a incidência e a progressão da DAP<sup>[16]</sup> e que a associação com hipertrigliceridemia pode significar um aumento na progressão e nas complicações sistêmicas da DAP<sup>[16]</sup>

#### **1.4. Índice Tornozelo- Braquial(ITB)**

O ITB é o método padrão de referência para o rastreamento da DAP, uma vez que detecta tanto casos sintomáticos como assintomáticos da doença<sup>[27, 28]</sup>. Quando realizado por pessoas bem treinadas, o ITB possui confiabilidade excelente, possuindo alta sensibilidade ( $\approx 90\%$ ) e especificidade ( $\approx 98\%$ )[29]. Tem como objetivo medir a perviedade da circulação arterial dos membros inferiores. Desta forma, define a gravidade da doença e detecta a presença de obstruções arteriais com repercussão hemodinâmica<sup>[16]</sup>.

Este método se expressa pela razão da medida da pressão sistólica do tornozelo pela pressão sistólica braquial<sup>[30]</sup>. Em condições normais, a pressão sistólica dos membros inferiores é igual ou ligeiramente superior a dos membros superiores<sup>[30]</sup>. Na presença de obstruções arteriais em membros inferiores capazes de provocar redução na pressão nos leitos distais a lesão, há queda na pressão sistólica dos tornozelos e conseqüentemente, redução nos valores do ITB<sup>[30]</sup>.

O ITB é um método não invasivo que pode ser usado freqüentemente na pratica clínica devido ao fácil e rápido manuseio e seu baixo custo. A razão entre as pressões tornozelo braquial varia de 1,0 a 1,4 em indivíduos normais e geralmente é menor que 0,90 em indivíduos com DAP<sup>[27, 29]</sup>.

Dada à coexistência freqüente de processos ateroscleróticos em distintos territórios vasculares, estudos anteriores demonstraram que o ITB apresenta uma forte associação com a presença e a gravidade da aterosclerose nas artérias carótidas e coronárias<sup>[21, 24, 31]</sup>. Em adultos de meia-idade e idosos, um ITB diminuído está associado ao aumento da mortalidade e a elevado risco de doença arterial coronariana e doenças cerebrovasculares<sup>[10, 21]</sup>.

Outros estudos<sup>[18, 32, 33]</sup> relataram que valores reduzidos de ITB podem predizer eventos coronários futuros, DCV total e mortalidade por outras causas. Em um desses estudos<sup>[18]</sup> constatou que o ITB é capaz de detectar DAP em homens e mulheres com idade média de 66 anos e que esses indivíduos teriam um risco aumentado de morte por DCV (risco relativo (RR) 6,3), morte por DAC (RR 4,8) e morte por outras causas (RR 3,1). O risco relativo alto foi encontrado mesmo após da exclusão de indivíduos com DCV conhecida no



início do estudo e após o ajuste de outros fatores de risco para DCV tais como o nível colesterol, idade, sexo, tabagismo, nível de glicose e o alto índice de massa corporal.<sup>[18]</sup>

Foi demonstrado que a prevalência de doença cardiovascular, acidente vascular encefálico e placa de artéria carótida pré-clínica aumenta com a diminuição dos índices de ITB  $\leq 0,90$ <sup>[28]</sup>. Indivíduos com valores de ITB  $\leq 0,90$  têm duas vezes mais chances de desenvolver doença cardiovascular do que aqueles com valor de ITB  $\geq 0,90$ , homens com valores  $\leq 0,90$  tem quatro vezes mais chances de ter algum episódio de acidente vascular encefálico ou ataque isquêmico transitório, em mulheres essa associação foi mais fraca e não estatisticamente significativa, porém em pacientes sem DCV clínica, valores de ITB  $\leq 0,90$  apresentam maior probabilidade de ter placa de carótida pré-clínica comparado com valores  $\geq 0,90$  para ambos os sexos<sup>[28]</sup>.

Uma recente meta-análise avaliou o papel aditivo do ITB sobre a predição do risco de eventos coronários determinada pelos escores de Framingham<sup>[34]</sup>. A medida do ITB melhorou o poder preditor de risco do escore de Framingham em ambos os sexos, sendo mais importante no sexo feminino<sup>[34]</sup>. Isso demonstra que a associação da medida do ITB pode levar a uma reclassificação da categoria do risco cardiovascular e até modificação no tratamento e nas recomendações ao paciente avaliado<sup>[34]</sup>.

Existe evidência da relação da aterosclerose subclínica coronária e carotídea avaliadas respectivamente pela calcificação da artéria coronária (CAC) e pela espessura íntima média carotídea (EIMC) com o ITB em indivíduos sem evidência de doença cardiovascular com idade média de 60 anos<sup>[35]</sup> seguidos no estudo MESA. Valores de ITB menores que 1,10 para

homens e 1,00 para mulheres associaram-se à presença da CAC e aumento na EIMC<sup>[35]</sup>. Contudo, a prevalência de ITB alterado nessa população foi < 4%. Esses achados podem implicar em aumento da prevalência da aterosclerose subclínica em indivíduos com níveis de ITB abaixo de 1,0 a 1,10<sup>[35]</sup>, contudo a sensibilidade do ITB para a detecção da aterosclerose subclínica coronária e carotídea parece ser baixa na população geral.

### **1.5. Calcificação da artéria coronária (CAC) e sua relação com a Aterosclerose**

Desde 1961 conhece-se a relação entre a CAC identificada pela fluoroscopia ou por exame anatomopatológico e a doença arterial coronária (DAC)<sup>[36]</sup>. Pesquisas recentes sugerem que o cálcio já está presente na placa aterosclerótica nos seus primeiros estágios quando a lesão é constituída predominantemente de estrias de gordura<sup>[37]</sup>, porém nesse estágio o cálcio não pode ser identificado por meio dos métodos não invasivos atuais<sup>[37]</sup>. A maior relevância clínica desse fenômeno está em seu potencial de tornar a placa vulnerável e instável<sup>[38]</sup>. A CAC pode ser detectada pela tomografia de emissão de elétrons (EBT), mas também por modernos tomógrafos computadorizados com múltiplos detectores (TCMD). Estudos mais recentes relatam a superioridade do TCMD em relação ao EBT, na melhor precisão em definição de placas de cálcio, devido ao fato da TCMD permitir a aquisição simultânea de até trezentos e vinte cortes, 230ms de rotação do scanner e até 75ms de resolução temporal<sup>[39]</sup>. Existe boa concordância entre o escore de cálcio avaliado por estas duas metodologias<sup>[40]</sup>. Os escores de cálcio fornecidos pela

TCDM, são bons indicadores da presença e gravidade da lesão<sup>[41]</sup>. A presença e a gravidade da CAC são quantificadas pelo escore desenvolvido por Agatston et al, pelo escore de volume ou pela massa de cálcio coronário<sup>[42]</sup>. O escore de Agatston, em valores abaixo de 100, demonstra uma sensibilidade de 94% e especificidade de 95% para estenose de 50% ou mais, e uma sensibilidade de 95% e especificidade de 90% em caso de estenose acima de 50%<sup>[43]</sup>. Estudos epidemiológicos mostram que a CAC apresenta distribuição assimétrica, variando entre zero e algumas centenas de unidades Agatston<sup>[44]</sup>. Devido a essa característica a CAC pode se avaliada como uma variável categórica em uma escala binária (presença versus ausência), ou como variável contínua incluindo-se o logaritmo dos escores de cálcio na formula ' $\log(CAC+1)$ '<sup>[44]</sup>. Por outro lado, estudos angiográficos e com ultra-som coronário demonstraram que a CAC se correlaciona com a carga ou quantidade de placas ateroscleróticas<sup>[45-47]</sup>. A quantidade de placas ateroscleróticas por sua vez se correlaciona diretamente com o risco de eventos coronários<sup>[48, 49]</sup>. Outros estudos onde a CAC foi avaliada pela tomografia computadorizada demonstram que o escore de cálcio é marcador independente de risco de eventos coronários<sup>[50, 51]</sup>.

Dados prospectivos mostram que a presença da CAC acrescenta informação de risco aos escores de Framingham para detectar eventos coronários<sup>[52]</sup>. Em nossa população, mostram que portadores de HF apresentam uma maior prevalência e gravidade da CAC quando comparados a indivíduos normais <sup>[53, 54]</sup>. Desse modo, um papel importante da determinação da CAC em populações de risco intermediário é complementar a estratificação de risco baseada nos fatores de risco clássicos<sup>[29]</sup>.

## 1.6. Angiotomografia de coronárias

Com o desenvolvimento da TCMD permitiu-se que além da quantificação da CAC, fosse possível se avaliar a presença de placas ateroscleróticas não calcificadas comprometendo ou não a luz do vaso<sup>[39, 55-59]</sup>. A TCMD procura suprir algumas das limitações da EBT. Em 1998 a TCMD foi introduzida na prática clínica, possibilitando a aquisição simultânea de 4, 8, 16 e 64 cortes<sup>[58]</sup>, atualmente de 320 detectores<sup>[60]</sup>. A detecção simultânea de múltiplos cortes permite a cobertura de todo volume cardíaco em uma única inspiração, e, além disso, apresenta melhor resolução espacial e temporal comparada com a tomografia de corte único<sup>[61]</sup>. A TCMD permite escolher a melhor fase durante o qual a interferência do movimento é menor para adquirir a imagem de determinado segmento coronário<sup>[59]</sup>. Esta técnica permite a reconstrução em duas ou três dimensões de todos os segmentos coronários a partir de uma única aquisição de imagens.

A capacidade da TCMD em diferenciar placas com composições diferentes pode tornar esse método capaz de auxiliar na detecção de tipos de placa associados a eventos cardiovasculares<sup>[62-64]</sup>. Um exemplo desta análise foi feito em trabalho de Pundziute et al<sup>[65]</sup>, onde em seguimento médio de 16 meses de 100 pacientes com doença coronária conhecida ou suspeita submetidos a TCMD, a presença de placas mistas foi uma das variáveis associadas a evento cardiovascular. De fato, a informação de composição de placa fornecida pela TCMD pode agregar valor na estratificação de risco dos pacientes, partindo do conhecimento prévio de que placas pouco obstrutivas, por serem mais freqüentes que as obstrutivas, são as que mais estão

relacionadas a evento isquêmico agudo<sup>[66-68]</sup>. Daí também parte o conceito de “placa vulnerável”. Este termo foi originalmente utilizado por Little<sup>[68]</sup> ao relatar que a placa culpada por um infarto ou angina instável não necessariamente deveria provocar obstrução da luz coronária antes de provocar o evento. Uma placa aterosclerótica apresentaria 2 características importantes: primeiro, pode ser obstrutiva; segundo, pode ser “vulnerável” a medida em que pode ser trombogênica se exposta a um estímulo desencadeante<sup>[68]</sup>. Uma lesão não necessitaria ser obstrutiva para ser trombogênica e também nem todas as lesões obstrutivas seriam trombogênicas.

A identificação de pacientes com HF que apresentem esses tipos de placa aterosclerótica na angiotomografia poderia auxiliar em sua estratificação de risco de forma mais acurada.

## **2. Justificativa**

---

Vários estudos mostram maior prevalência de aterosclerose subclínica em portadores de HF<sup>[53, 54, 69-72]</sup>.

Ponderando a DAP como parte do processo de aterosclerose sistêmica<sup>[12]</sup>, muitos autores discutem atualmente a inclusão de seu rastreamento em populações de alto risco cardiovascular, incluindo portadores de HF. Tal recomendação não é, no entanto, amplamente adotada já que o aumento da prevalência de DAP em portadores de HF ainda é controverso. Além disso, a associação entre a presença de DAP (em muitos casos subclínica) e o aumento no risco de eventos cardiovasculares ainda não foi bem estabelecido.

Considerando que a avaliação da DAP por meio da medida do ITB pode auxiliar na estratificação de risco cardiovascular dos pacientes portadores de HF e conseqüentemente guiar a terapêuticas mais adequadas, faz-se necessário determinar sua prevalência nessa população bem como a sua associação com outros fatores de risco cardiovascular, parâmetros clínicos e laboratoriais e com exames marcadores de risco como o escore de cálcio e a determinação de placas de ateroma em coronárias por meio da angiotomografia coronária,

### **3. Objetivos**

---



- Avaliar a prevalência de doença arterial periférica diagnosticada por meio do ITB na população de indivíduos portadores de HF heterozigótica utilizando como comparação uma população normolipidêmica.
- Identificar quais são os determinantes do diagnóstico de doença arterial periférica em portadores de HF, bem como sua associação com a presença de doença cardiovascular manifesta nessa população.
- Avaliar se a DAP detectada pelo ITB associa-se com a presença de aterosclerose subclínica coronária detectada pela tomografia computadorizada em portadores de HF heterozigótica sem doença cardiovascular manifesta.

## **4. Métodos**

---

#### **4.1. Desenho do Estudo**

Estudo descritivo, de modelo observacional e transversal, realizado no ambulatório da Unidade Clínica de Lípidos do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Brasil, no período de julho de 2009 à julho de 2013.

#### **4.2. Aspectos Éticos**

O projeto que fundamenta este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo número 0030/09, realizado no dia 06 de fevereiro de 2009. Todos os participantes foram orientados quanto aos objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido formulado segundo normas da resolução número 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

#### **4.3. População do estudo**

A população estudada constitui-se de indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar (HF) heterozigótica seguidos no ambulatório da Unidade Clínica de Lípidos do InCor HC-FMUSP e grupo de comparação de indivíduos participantes de um banco de dados retrospectivo do “Projeto Corações do Brasil”- Conjunto dos habitantes das cinco regiões brasileiras com mais de 100.000 habitantes em 2004 com idade  $\geq$  18 anos.<sup>[20]</sup>

#### 4.4. Elegibilidade

Critérios de inclusão:

- Homens ou Mulheres com idades >18 anos com capacidade e disposição para fornecer o termo de consentimento livre e esclarecido e concordar com as avaliações propostas pelo estudo;
- HF heterozigótica diagnosticada segundo critérios do DUTCH MEDPED<sup>[73,74]</sup> ou por determinação de mutação no receptor da LDL, PCSK9 ou ApoB-100.

Critérios de Exclusão

- Quaisquer condições que impeçam a medida do ITB, tais como amputação, ulcerações extensas, fraturas ou revascularização em membros inferiores e superiores;
- Valores de ITB > 1,40

Elegibilidade do Grupo de Comparação:

A seleção do grupo controle foi feita com o objetivo de obter um grupo representativo da população geral, mas que não apresentassem níveis altos de colesterol (> 240 mg/dL) e não fizessem uso de medicação hipolipemiante. Foram excluídos valores de ITB >1,40.

## **4.5. Diagnóstico de HF**

### **4.5.1. Diagnóstico Clínico**

Neste trabalho para o diagnóstico clínico da HF utilizamos critérios da Dutch Lipid Clinic Network (Dutch MEDPED)<sup>[73, 74]</sup>, o qual é baseado na história familiar e clínica prematura para doença vascular/ coronária, exame físico considerando a presença de xantomas e arco corneano, concentrações plasmáticas do LDL-c e determinação da mutação de receptores da LDL, 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.

**Quadro 1:** Critérios diagnósticos da HF baseado nos critérios da Dutch MEDPED<sup>[73]</sup>

Parâmetro	Pontos
<b>História familiar</b>	
Parente de 1º grau portador de doença vascular/coronária prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos) OU Parente adulto de 1º ou 2º grau com colesterol total > 290 mg/dL *	1
Parente de 1º grau portador de xantoma tendinoso e/ou arco corneano OU Parente de 1º grau <16 anos com colesterol total > 260 mg/dL *	2
<b>História clínica</b>	
Paciente portador de doença arterial coronária 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>	
≥ 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

#### **4.5.2. Diagnóstico genético molecular:**

O diagnóstico genético foi realizado em 86,3% da população de portadores de hipercolesterolemia familiar. Os genes seqüenciados foram: LDL-R, APOB e PCSK9. Essa determinação foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do InCor-HCFMUSP, conforme metodologia descrita a seguir:

##### **a) Extração do DNA**

A extração do DNA foi realizada como descrito por Miller e colaboradores<sup>[75]</sup>. O sangue foi hemolisado com tampão contendo NH<sub>4</sub>Cl 0,144M e NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 0,001M. Em seguida os leucócitos foram lisados (soluções Tris 0,01M, NaCl 0,4M, EDTA 0,002M pH 8,0 e EDTA 0,5M, SDS 10% pH 8,0), o DNA foi precipitado (solução NaCl 6M) e ressuspenso em TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8,0). A concentração da solução de DNA obtida foi determinada com leitura em espectrofotômetro a 260nm. A solução de DNA foi diluída em TE (50ng/mL) para uso.

##### **b) Reação em cadeia da polimerase**

Os polimorfismos foram amplificados a partir do DNA genômico com auxílio do método de reação em cadeia da polimerase (PCR). O protocolo

desenvolvido por amostra consta de: 2 $\mu$ L de DNA (20ng/ml) adicionados a 0,02 $\mu$ L da solução de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (10mM), 1 $\mu$ L de 10x Assay Buffer (Ultra Chem®), 2 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 0,4 $\mu$ L de primer senso e 0,4 $\mu$ L de primer antisenso na concentração de 5mM e 0,06 $\mu$ L de enzima Taq polimerase (EasyTaqInvitrogen; 0,625 U) completando com água milliQ para totalizar um volume final de 10 $\mu$ L. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (MiniCycler MJ Research), seguindo as condições especificadas para cada par de primers que foi utilizado. Em seguida as amostras das reações foram visualizadas em gel de agarose 1%.

### **c) Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos de amplificação obtidos pela PCR foram analisados em gel de agarose 1,0%. Para tanto, 1,0g de agarose foi suspensa em 100ml de tampão tris-acetato-EDTA e fervida em forno de microondas até dissolução completa. Brometo de etídeo 25mM foi utilizado na proporção de 50 $\mu$ l/100mL de gel antes de sua polimerização. O tampão utilizado no preparo das amostras foi composto de glicerol 30%, azul de bromofenol 0,05% e xilencianol 0,05%. A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal com tampão tris-acetato-EDTA com aplicação de aproximadamente 120 Volts. O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA "Ladder" de 100 pb (Gibco-BRL). Os fragmentos amplificados foram separados de acordo com o tamanho e visualizados pela exposição do gel à luz ultravioleta no equipamento EagleEye II (Stratagene).



#### **d) Seqüenciamento automático**

Após a realização de um PCR comum para amplificação das amostras foram realizadas as seguintes etapas:

- Purificação das amostras amplificadas por PCR: A purificação foi realizada com o produto ExoSAP-IT (USB Corporation), o qual utiliza duas enzimas hidrolíticas, a Exonuclease I e a ShrimpAlkalinePhosphatase (SAP), para remover sobras de dNTPs e oligonucleotídeos. A Exonuclease I hidrolisa os oligonucleotídeos fita simples residuais e qualquer outra fita simples de DNA “estranha” produzida no PCR. A SAP hidrolisa os dNTPs remanescentes da mistura de PCR que poderiam interferir na reação de seqüenciamento. Adiciona-se a enzima diretamente no produto de PCR em qualquer volume, obedecendo-se sempre a proporção de 2µl de ExoSAP para 5µl de produto. Leva-se a mistura ao termociclador para ativação e ação das enzimas a 37°C por 15 minutos, seguido de um período de inativação a 85°C por 15 minutos. Assim, as amostras ficaram prontas para o seqüenciamento.
- Seqüenciamento do DNA: Todas as amostras purificadas foram, então, submetidas ao seqüenciamento. O equipamento

utilizado foi o ABI-3100 – AppliedBiosystems em conjunto com o kit reagente ABI PRISM BigDyeterminatorcyclesequencing (PE AppliedBiosystems). Amostras de 2,5µl dos DNAs amplificados foram adicionadas a 2,5µl de primers senso ou antisenso (5pmol) juntamente com 1µl do kit big dyeterminator, 3µl de DNA polimerase e tampão de reação 5x BigDye e 1µl de água, totalizando um volume de 10µl. Posteriormente, a mistura de reação foi purificada por precipitação com a adição de 80µl de Isopropanol (Merck) a 75-80% em cada poço, a placa foi coberta com papel alumínio deixando-a em temperatura ambiente por 15 minutos. Após centrifugação (4000rpm por 30 min. a 4°C), o etanol foi desprezado e 150µl de etanol (70%) sendo adicionados em cada poço, e em seguida as amostras foram novamente centrifugadas (4000rpm por 15 min. a 4°C). A placa foi virada cuidadosamente para descartar o etanol. As amostras foram então, centrifugadas com a placa invertida a 4000rpm para a completa evaporação do etanol. As amostras de DNA foram desnaturadas a 96°C por 2 min. e 30 segundos. O precipitado de DNA foi ressuspensão com 10µl de formamida HI-DYE em cada poço. A placa foi homogeneizada e foi feita uma rápida centrifugação na placa. As amostras foram desnaturadas no termociclador por dois minutos e 30 segundos a 96°C. Após a desnaturação, a placa foi acondicionada imediatamente em gelo por 3 a 5 minutos. As amostras foram

depois injetadas no seqüenciador ABI – 3100 conforme os parâmetros recomendados pelo fabricante.

#### **4.6. Avaliação Clínica da população HF heterozigótica**

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- História familiar de DAC precoce: Considerado antecedente familiar de DAC precoce parente de primeiro grau homem com manifestação de doença coronária com menos de 55 anos ou mulher com menos de 65 anos.
- Tabagismo: Considerado tabagista qualquer indivíduo que fuma atualmente ou fumou no passado regularmente.
- Hipertensão Arterial Sistêmica: Considerados hipertensos pacientes em uso de anti-hipertensivo ou aqueles com PAS acima de 140 mmHg e/ou PAD acima de 90 mmHg.
- Diabetes mellitus: Considerados diabéticos aqueles que faziam uso prévio de hipoglicemiante oral e ou insulina, ou com duas dosagens de glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dL .
- Peso, altura e índice de massa corpórea (IMC): peso e altura foram aferidos em balança antropométrica; o IMC foi calculado pela fórmula: peso dividido por altura elevada ao quadrado.

- Aferição de circunferência abdominal: Aferida com uso de fita métrica inelástica, na altura do ponto médio da distância entre a crista íliaca ântero-superior e o rebordo inferior do arco costal (referida como cintura).
- Pressão arterial: A pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica (PAD) braquial foram aferidas com um esfigmomanômetro aneróide, após 5 minutos de descanso, na posição sentada, consideradas fases I e V de sons de *Korotkoff* como PAS e PAD em mmHg respectivamente, e usada média de duas aferições com até cinco minutos de intervalo<sup>[76]</sup>.
- Xantomas e arco corneano: A presença de xantomas foi determinada clinicamente por inspeção e palpação dos tendões de Aquiles, cotovelos, joelhos e tendões extensores das mãos, sendo considerado achado positivo o espessamento difuso e a presença de nodularidades focais<sup>[77]</sup>. Será considerado halo corneano a presença de pigmentação distinta ao redor da córnea (em indivíduos com menos de < 45 anos)<sup>[4]</sup>.

#### **4.7. Avaliação Laboratorial da população HF heterozigótica**

Os dados referentes às dosagens bioquímicas foram coletados retrospectivamente através de pesquisa em prontuários clínicos e no sistema informatizado Si3 pertencente ao Instituto do Coração - HCFMUSP. As amostras foram dosadas no Laboratório de Análises Clínicas do InCor

HCFMUSP. O perfil lipídico (CT, HDL-c, LDL-c, TG) considerado para análise foi referente ao valor basal ou mais alto em uso de medicação hipolipemiante. Foram também incluídos na análise os níveis séricos de glicemia e creatinina coletados retrospectivamente do exame mais atual do paciente em relação à data da avaliação do ITB.

#### **4.8. Parâmetros clínicos e laboratoriais dos controles normolipidêmicos**

Os dados foram coletados retrospectivamente do banco de dados do projeto “Corações do Brasil”. Foram considerados na análise desse estudo parâmetros demográficos (sexo e idade) parâmetros clínicos (diagnóstico de HAS, DM, antecedente de doença cardiovascular, pressão arterial sistêmica, peso, altura, circunferência abdominal) e parâmetros laboratoriais (exames capilares de CT e glicemia, por meio do uso de tecnologia *point-of-care* (Roche Diagnostics, Accu-Check). A metodologia detalhada deste estudo está disponível para consulta em artigo previamente publicado.<sup>[20]</sup>

#### **4.9. Definição de Doença Arterial Periférica (DAP)**

A presença de doença arterial periférica (DAP) foi definida através da medida do ITB. Valores de ITB  $\leq 0,90$  em um ou em ambos os membros inferiores foram considerados diagnósticos de DAP. A ausência da DAP foi

considerada para valores de ITB de 0,91 a 1,40. Os indivíduos com valores de ITB acima de 1,40 foram excluídos da análise, uma vez que esses valores são compatíveis com artérias não compressíveis e, portanto não definem o diagnóstico de DAP.

#### **4.10. Definição de claudicação intermitente**

A presença ou ausência de claudicação intermitente foi avaliada pelos critérios do Questionário de Claudicação de Edimburgo na versão em português validada para a população brasileira (Anexo 1) a fim de identificar a presença desse sintoma em pacientes com queixas de dor ou desconforto em panturrilha, coxa ou região glútea<sup>[78, 79]</sup>.

#### **4.11. Definição de doença cardiovascular clínica**

Foi considerada doença cardiovascular clínica manifestações prévias de : infarto do miocárdio, angina do peito, acidente vascular encefálico isquêmico e revascularização do miocárdio

#### **4.12. Avaliação do Índice Tornozelo-Braquial (ITB)**

O rastreamento da DAP foi realizado por dois avaliadores treinados através da medida do índice tornozelo-braquial após 5 minutos em repouso na posição supina, através do Doppler vascular portátil sem registro gráfico (10 MHz, Medmega, Brasil) e esfigmomanômetro aneróide. Antes do início da avaliação, foi realizada a medida da circunferência braquial (CB) direita, medida no ponto médio entre o acrômio e o olecrano para a seleção do tamanho de manguito adequado para as medidas da pressão, de acordo com a seguinte classificação: CB < 25 cm (pequeno porte), CB 25-32 cm (médio porte), CB 32-42 cm (grande porte) e CB > 42 cm (coxa). O tamanho selecionado para a medida da pressão nos braços foi o mesmo utilizado para os tornozelos, exceto quando houve uma grande desproporção entre o valor da circunferência do braço e do tornozelo. Nesse caso utilizou-se o manguito selecionado pela medida de circunferência para os braços e o manguito adulto para os tornozelos. As pressões sistólicas foram medidas duas vezes em cada artéria, nos braços (artérias braquiais) e tornozelos (artérias pediosas e tibiais posteriores). O cálculo foi feito separadamente para cada perna e braço. Segundo a definição do TASC WORKING GROUP<sup>[16]</sup> é considerado para o cálculo do ITB o maior valor da pressão sistólica do tornozelo (pediosa ou tibial posterior) dividida pela maior pressão dos braços (braquial direita ou esquerda), sendo calculado um valor de ITB para cada membro inferior.

#### **4.13. Avaliação e análise da placa coronária pela angiotomografia**

Os dados referentes aos exames de angiotomografia coronária e escore de cálcio foram coletados retrospectivamente através de pesquisa em prontuários clínicos e no sistema informatizado Si3 pertencente ao Instituto do Coração – HCFMUSP, e foram realizados no Serviço de Tomografia e Ressonância Magnética do InCor – HCFMUSP. A avaliação do escore de cálcio e a angiografia não invasiva foram realizadas em aparelho de tomografia computadorizada com 64 colunas de detectores (*Aquilion<sup>R</sup> 64 – Toshiba Medical System, Otawara, Japão*). As imagens foram analisadas em estação de trabalho da *Toshiba (VITREA 2 Vital Images, Plymouth, EUA)*.

#### **4.14. Definição de calcificação e placas coronárias**

A calcificação da artéria coronária foi avaliada pelo escore de Agatston, onde um valor > 0 determinou a presença de calcificação.

As placas foram definidas como a presença de estruturas na parede da artéria coronária com área >1mm<sup>2</sup>, como definido na literatura<sup>[54, 80]</sup> e classificadas segundo a presença de redução luminal e o seu grau, definido como, estenose luminal menor que 50% ou estenose luminal maior que 50%.

#### **4.15. Análise Estatística**

Sabendo que o percentual de alteração de ITB é de aproximadamente 10% no grupo de comparação estudado <sup>[20]</sup> e que em pacientes HF o percentual esperado de alteração do ITB é de aproximadamente 20%, com



confiança de 95% e poder de 80% a amostra necessária para encontrar esta diferença é de 199 pacientes em cada grupo.

O cálculo da amostra segue formulação abaixo <sup>[82]</sup>:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times (p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2))}{(p_1 - p_2)^2}$$

onde:

$p_1$  é a prevalência de alteração do ITB em pessoas normais;

$p_2$  é a prevalência de alteração do ITB em pessoas HF;

Z são os valores da distribuição normal padrão com confiança  $1-\alpha$  e poder  $1-\beta$ .

Foram descritos os grupos de pacientes HF e normais segundo características qualitativas com uso de frequência absoluta e relativa, e verificada a existência de associação entre as características e os grupos com uso de testes qui-quadrado ou testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhanças <sup>[81,82]</sup>. As características quantitativas foram descritas segundo grupos e comparadas entre os grupos com uso de testes t-Student ou testes Mann-Whitney conforme adequado <sup>[81,82]</sup>.

Foi verificada a existência de associações da presença de alteração do ITB com as características qualitativas avaliadas em todos os pacientes e pessoas normais com uso de testes qui-quadrado ou testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhanças e as variáveis quantitativas foram comparadas segundo presença de alteração no ITB com uso de testes t-Student ou testes Mann-Whitney.

Foi criado o modelo de regressão logística múltipla <sup>[82]</sup> para verificar se as características conjuntamente podem influenciar na alteração do ITB, com foco para o grupo, para verificar se após o ajuste dos demais fatores os pacientes HF apresentam maior presença de alteração do ITB.

Nos pacientes HF foram verificadas a existência de associações das características qualitativas com a presença de DCV com uso de testes qui-quadrado ou testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhanças e as variáveis quantitativas foram comparadas segundo presença de DCV com uso de testes t-Student ou testes Mann-Whitney. O modelo de regressão logística múltipla foi ajustado para verificar se após controle das demais variáveis que influenciam na presença de DCV, a alteração do ITB influencia na presença de DCV.

Associação da alteração do ITB com presença de placas obstrutivas CAC e grau de obstrução foi verificada com uso de teste qui-quadrado, teste exato de Fisher e teste da razão de verossimilhanças respectivamente.

As análises foram realizadas com uso do *software* SPSS versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

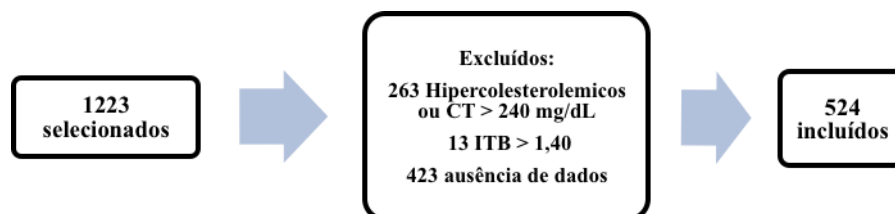
## **5. Resultados**

---

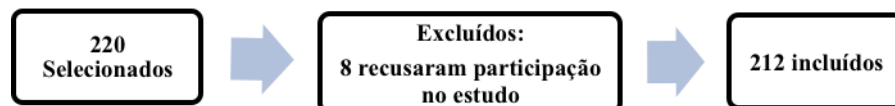
## 5.1 População estudada

Do total de 1.443 indivíduos selecionados entre os grupos, 736 foram submetidos ao exame de ITB, sendo eles, 212 portadores de HF e 524 controles normolipidêmicos. O fluxograma (Figura 1) a seguir representa o esquema de elegibilidade dos grupos:

### Controles Normolipidêmicos



### Hipercolesterolemia Familiar:



**Figura 1:** Fluxograma de elegibilidade do estudo

Na seleção dos portadores de HF, foram incluídos somente indivíduos que preencheram os critérios de HF da Dutch MEDPED, ou por ou por determinação de mutação no receptor da LDL, PCSK9 ou ApoB-100. Desses, 195 (92%) tiveram o diagnóstico confirmado com certeza, 7 (3%) provável e 10 (5%) possível. A presença de mutações no receptor do LDL foi encontrada em

183 pacientes (86,3%). Não foram encontradas mutações na PCSK9 ou ApoB-100.

## **5.2 Perfil clínico e laboratorial de portadores de hipercolesterolemia familiar e normolipidêmicos**

A tabela 1 mostra os critérios clínicos e laboratoriais dos grupos HF e normolipidêmico. Os indivíduos portadores de HF eram mais velhos, predominantemente do sexo feminino, com maior prevalência de hipertensão, diabetes, e apresentavam maior prevalência de manifestação clínica prévia de doença cardiovascular. Além disso, tinham maiores valores da glicemia de jejum e como esperado, maiores níveis de colesterol total. Por outro lado, no grupo normolipidêmico houve maior prevalência de tabagismo e de carga tabágica, representada pela variável anos/maço. Não houve diferença entre os grupos em relação a sedentarismo, índice de massa corporal e valores de pressão arterial sistólica e diastólica. Em relação ao resultado do exame de índice tornozelo-braquial, houve maior alteração na média dos valores nos indivíduos portadores de HF do que em indivíduos normolipidêmicos ( $1,04 \pm 0,14$  e  $1,10 \pm 0,10$ , respectivamente;  $p < 0,001$ ).

**Tabela 1.** Comparação dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre portadores de hipercolesterolemia familiar (HF) e controles normolipidêmicos.

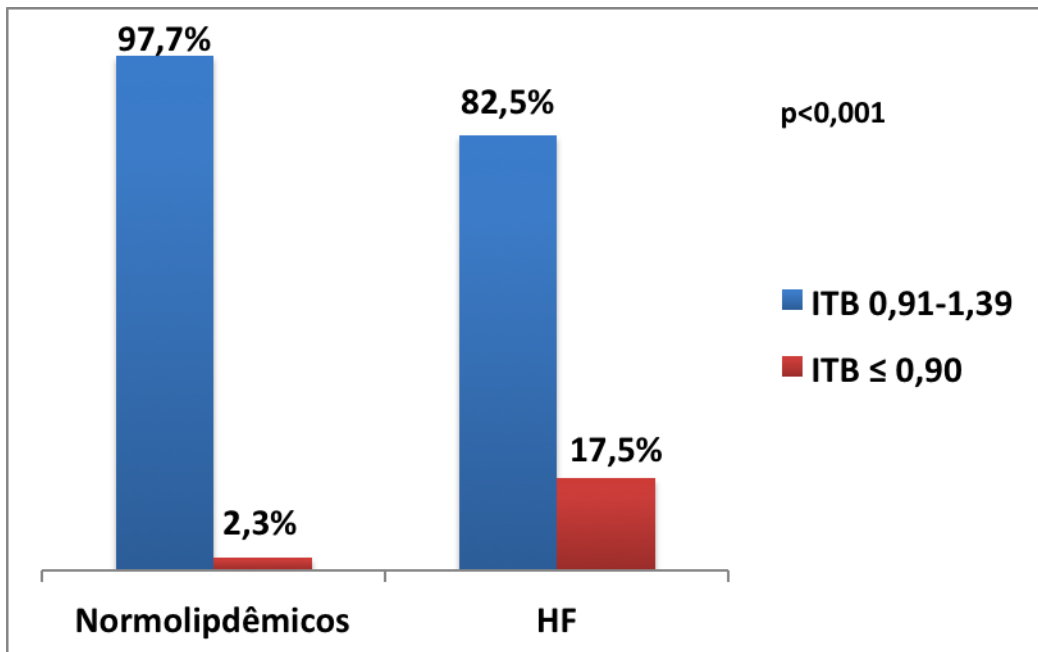
Variável	Tipo Paciente		Total (n = 736)	p
	HF (n = 212)	Controles (n = 524)		
<b>Sexo, n (%)</b>				<b>&lt;0,001</b>
Masculino	74 (34,9)	259 (49,4)	333 (45,2)	
Feminino	138 (65,1)	265 (50,6)	403 (54,8)	
<b>Idade, anos</b>				<b>&lt;0,001</b>
media (DP)	51 ± 14	44 ± 13	-	
mediana (min.;máx.)	52 (18; 85)	42 (18; 78)	-	
<b>Tabagismo, n (%)</b>				<b>&lt;0,001</b>
Não	137 (64,6)	264 (50,4)	401 (54,5)	
Ex-tabagista/Tabagista	75 (35,4)	260 (49,6)	335 (45,5)	
<b>Sedentarismo, n (%)</b>				0,11
Não	81 (38,2)	168 (32,1)	249 (33,8)	
Sim	131 (61,8)	356 (67,9)	487 (66,2)	
<b>HAS, n (%)</b>				<b>&lt;0,001</b>
Não	108 (50,9)	364 (69,5)	472 (64,1)	
Sim	104 (49,1)	160 (30,5)	264 (35,9)	
<b>DM, n (%)</b>				<b>&lt;0,001</b>
Não	172 (81,1)	498 (95)	670 (91)	
Sim	40 (18,9)	26 (5)	66 (9)	
<b>DCV, n (%)</b>				<b>&lt;0,001</b>
Não	154 (72,6)	491 (93,7)	645 (87,6)	
Sim	58 (27,4)	33 (6,3)	91 (12,4)	
<b>ITB</b>				<b>&lt;0,001</b>
media (DP)	1,04 ± 0,14	1,1 ± 0,1	-	
mediana (min.;máx.)	1,05 (0,39; 1,39)	1,09 (0,73; 1,36)	-	
<b>PAS, mmHg</b>				0,359
media (DP)	130 ± 21	128 ± 25	-	
mediana (min.;máx.)	128 (80; 212)	125 (74; 302)	-	
<b>PAD, mmHg</b>				0,595
media (DP)	80 ± 12	81 ± 18	-	
mediana (min.;máx.)	80 (40; 120)	79 (52; 275)	-	
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup></b>				0,655
media (DP)	27 ± 5	27 ± 5	-	
mediana (min.;máx.)	26,4 (18,4; 44,3)	26,4 (8,0; 50,1)	-	
<b>Colesterol total mg/dL</b>				<b>&lt;0,001</b>
media (DP)	334 ± 86	182 ± 26	-	
mediana (min.;máx.)	330 (101; 679)	178 (90; 239)	-	
<b>Glicemia mg/dL</b>				<b>&lt;0,001</b>
media (DP)	104 ± 32	85 ± 25	-	

mediana (min.;máx.)	98 (79; 382)	84 (20; 302)	-	
<b>Anos /Maço, anos</b>				0,587*
media (DP)	18 ± 19	20 ± 20	-	
mediana (min.;máx.)	11 (0; 129)	14(0; 106)	-	

Resultado do teste t-Student; \* Resultado do teste Mann-Whitney; Legenda: HAS (hipertensão arterial sistêmica); DM (diabetes mellitus); DCV (doença cardiovascular); PAS (pressão arterial sistólica); PAD (pressão arterial diastólica); IMC (índice de massa corporal); ITB (índice tornozelo-braquial)

### 5.3 Associação entre hipercolesterolemia familiar e doença arterial periférica

A tabela 2 mostra parâmetros clínicos e laboratoriais dos indivíduos com ou sem alteração no ITB. Houve maior prevalência de alteração nos valores de ITB (sendo  $ITB \leq 0,90$  definido como indicativo da doença arterial periférica) em portadores de HF comparados aos controles (17,5% vs. 2,3%, respectivamente;  $p < 0,001$ , Figura 2). No geral (ambos os grupos agrupados), os indivíduos com alterações do ITB ( $\leq 0,90$ ) eram mais velhos, predominantemente do sexo feminino, com maior prevalência de antecedente prévio de doença cardiovascular, hipertensão, diabetes e possuíam maiores níveis de colesterol total e de glicemia. A tabela 3 mostra os dados por meio da análise de regressão logística múltipla das variáveis que se associaram independentemente como preditoras de alteração dos valores do ITB nos grupos estudados: idade, antecedente prévio de doença cardiovascular e presença de HF (OR= 5,77 IC 95% 2,83-11,77,  $p < 0,001$ ).



**Figura 2.** Comparação da prevalência de Doença Arterial Periférica em portadores de hipercolesterolemia familiar e controles normolipidêmicos



**Tabela 2.** Análise dos parâmetros clínicos e laboratoriais segundo alteração dos valores do ITB ( $\leq 0,90$ ) entre os grupos estudados

Variável	Valor ITB		OR	IC (95%)		Total	p
	0,91-1,39 (n = 687)	$\leq 0,90$ (n = 49)		Inferior	Superior		
<b>Tipo Paciente, n (%)</b>							<b>&lt;0,001</b>
Normolipidêmicos	512 (97,7)	12 (2,3)	1,00			524	
HF	175 (82,5)	37 (17,5)	9,02	4,60	17,69	212	
<b>Sexo, n (%)</b>							<b>0,033</b>
Masculino	318 (95,5)	15 (4,5)	1,00			333	
Feminino	369 (91,6)	34 (8,4)	1,95	1,04	3,65	403	
<b>Idade, anos</b>							<b>&lt;0,001</b>
media (DP)	45 $\pm$ 14	55 $\pm$ 15				-	
mediana (min.;máx.)	44 (18;85)	56 (20;79)	1,051	1,029	1,074	-	
<b>Tabagismo, n (%)</b>							0,272
Não	378 (94,3)	23 (5,7)	1,00			401	
Ex-tabagista/Tabagista	309 (92,2)	26 (7,8)	1,38	0,77	2,47	335	
<b>Sedentarismo, n (%)</b>							0,081
Não	238 (95,6)	11(4,4)	1,00			249	
Sim	449 (92,2)	38 (7,8)	1,83	0,92	3,65	487	
<b>HAS, n (%)</b>							<b>&lt;0,001</b>
Não	452 (95,8)	20 (4,2)	1,00			472	
Sim	235 (89)	29 (11)	2,79	1,54	5,04	264	
<b>DM, n (%)</b>							<b>0,033*</b>
Não	630 (94)	40 (6)	1,00			670	
Sim	57 (86,4)	9 (13,6)	2,49	1,15	5,38	66	
<b>DCV, n (%)</b>							<b>&lt;0,001</b>
Não	617 (95,7)	28 (4,3)	1,00			645	
Sim	70 (76,9)	21 (23,1)	6,61	3,57	12,26	91	
<b>PAS, mmHg</b>							0,536
media (DP)	129 $\pm$ 24	127 $\pm$ 23				-	
mediana (min.;máx.)	126 (74;302)	120 (80;185)	0,996	0,983	1,009	-	
<b>PAD, mmHg</b>							0,076
media (DP)	81 $\pm$ 16	76 $\pm$ 12				-	
mediana (min.;máx.)	79 (40;275)	75 (55;102)	0,975	0,951	1,000	-	
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup></b>							0,875
media (DP)	27 $\pm$ 5	27 $\pm$ 5				-	
mediana (min.;máx.)	26,3 (8;50)	26,4 (18;40)	0,995	0,937	1,057	-	
<b>CT, mg/dl</b>							<b>&lt;0,001</b>
media (DP)	220 $\pm$ 80	311 $\pm$ 116				-	

mediana (min.;máx.)	191 (90;679)	301 (124;629)	1,009	1,006	1,011	-	
<b>Glicemia, mg/dl</b>							<b>0,005</b>
media (DP)	90 ± 29	102 ± 27				-	
mediana (min.;máx.)	89 (20;382)	99 (42;210)	1,010	1,002	1,017	-	
<b>Anos /Maço, anos</b>							0,203*
media (DP)	19 ± 20	21 ± 17				-	
mediana (min.;máx.)	13 (0; 129)	17 (1; 63)	1,01	0,99	1,02	-	

Resultado do teste t-Student; \* Resultado do teste Mann-Whitney. Legenda: ITB (índice tornozelo-braquial); OR (*oddsratio* - razão das chances); IC (intervalo de confiança); HF (hipercolesterolemia familiar); HAS (hipertensão arterial sistêmica); DM (diabetes mellitus); DCV (doença cardiovascular); DP (desvio padrão); PAS (pressão arterial sistólica); PAD (pressão arterial diastólica); CT (colesterol total)

**Tabela 3.** Parâmetros clínicos e laboratoriais em uma população de indivíduos com hipercolesterolemia familiar (n=212) e normolipidêmicos (n=524) associados significativamente ao diagnóstico de doença arterial periférica (ITB<0,90) conforme resultado do modelo de regressão logística múltipla.

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
<b>Idade, anos</b>	1,028	1,003	1,053	0,026
<b>DCV Clínica</b>				
Não	1,00			
Sim	2,90	1,47	5,74	0,002
<b>Tipo Paciente</b>				
Normal	1,00			
HF	5,77	2,83	11,77	<0,001

Legenda: DCV (doença cardiovascular); HF (hipercolesterolemia familiar)

#### 5.4 Determinantes da presença de doença arterial periférica diagnosticada pelo ITB alterado em portadores de hipercolesterolemia familiar

Para identificar as variáveis associadas ao diagnóstico de DAP pelo ITB em portadores de hipercolesterolemia familiar, comparamos parâmetros clínicos e laboratoriais dessa população em indivíduos com valores normais ou alterados ( $\leq 0.90$ ) de ITB. Na análise univariada, portadores de HF com

alteração nos valores de ITB eram mais velhos, hipertensos e possuíam histórico de tabagismo ativo ou passado (Tabela 4). A tabela 5 mostra o teste de regressão logística múltipla, e as variáveis que se associaram independentemente à alteração dos valores de ITB foram a idade e a presença de histórico de tabagismo ativo ou passado.

**Tabela 4.** Comparação dos valores de ITB com parâmetros clínicos e laboratoriais em portadores de hipercolesterolemia familiar

Variável	ITB		OR	IC (95%)		Total	p
	0,91-1,39	≤0,90		Inferior	Superior		
	(n = 175)	(n = 37)					
<b>Sexo, n (%)</b>							0,268
Masculino	64 (86,5)	10 (13,5)	1,00			74	
Feminino	111 (80,4)	27 (19,6)	1,56	0,71	3,42	138	
<b>Idade, anos</b>							<b>0,025</b>
media (DP)	49,3 ± 14	58 ± 11					
mediana (min.;máx.)	51 (18;75)	57 (35;79)	1,05	1,02	1,08		
<b>Tabagismo, n (%)</b>							<b>0,042</b>
Não	119 (86,9)	18 (13,1)	1,00			137	
Ex-tabagista/Tabagista	56 (74,7)	19 (25,3)	2,24	1,09	4,60	75	
<b>Anos /Maço, anos</b>							<b>0,257*</b>
media (DP)	17 ± 21	20 ± 15				-	
mediana (min.;máx.)	10 (0;129)	18 (1;44)	1,01	0,98	1,03	-	
<b>Sedentarismo, n (%)</b>							0,056
Não	72 (88,9)	9 (11,1)	1,00			81	
Sim	103 (78,6)	28 (21,4)	2,17	0,97	4,88	131	
<b>HAS, n (%)</b>							0,013
Não	96 (88,9)	12 (11,1)	1,00			108	
Sim	79 (76,0)	25 (24,0)	2,53	1,20	5,36	104	
<b>DM, n (%)</b>							0,650
Não	141 (82,0)	31 (18,0)	1,00			172	
Sim	34 (85,0)	6 (15,0)	0,80	0,31	2,08	40	
<b>Claudicação, n (%)</b>							<b>&lt;0,001</b>
Não	157 (88,2)	21 (11,8)	1,00			178	
Sim	18 (52,9)	16 (47,1)	6,65	2,95	14,98	34	
<b>Xantomas, n (%)</b>							0,398
Não	143 (83,6)	28 (16,4)	1,00			171	
Sim	32 (78,0)	9 (22,0)	1,44	0,62	3,34	41	

<b>Arco Corneano, n (%)</b>							0,069
Não	130 (85,5)	22 (14,5)	1,00			152	
Sim	45 (75,0)	15 (25,0)	1,97	0,94	4,12	60	
<b>PAS, mmHg</b>							0,542
media (DP)	130 ± 20	128 ± 23				-	
mediana (min.;máx.)	128 (91;212)	128 (80;185)	0,994	0,977	1,012	-	
<b>PAD, mmHg</b>							0,179
media (DP)	80 ± 12	77 ± 11				-	
mediana (min.;máx.)	80 (40;120)	78 (57;102)	0,979	0,949	1,010	-	
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup></b>							0,387
media (DP)	27 ± 5	26 ± 5				-	
mediana (min.;máx.)	26,3 (18; 44)	26,5 (19;38)	0,964	0,888	1,047	-	
<b>CT, mg/dL</b>							0,106
media (DP)	330 ± 83	355 ± 98				-	
mediana (min.;máx.)	330 (101;679)	330 (206;629)	1,003	0,999	1,007	-	
<b>HDL, mg/dL</b>							0,849
media (DP)	46 ± 12	46 ± 13				-	
mediana (min.;máx.)	46 (19;83)	44 (10;98)	0,997	0,968	1,027	-	
<b>LDL, mg/dL</b>							0,192
media (DP)	252 ± 81	272 ± 98				-	
mediana (min.;máx.)	255 (54;611)	248 (111;545)	1,003	0,999	1,007	-	
<b>TG, mg/dL</b>							0,248
media (DP)	137 ± 65	151 ± 52				-	
mediana (min.;máx.)	134 (43;437)	139 (77;262)	1,003	0,998	1,01	-	
<b>Colesterol não HDL, mg/dL</b>							0,100
media (DP)	284 ± 82	309 ± 99				-	
mediana (min.;máx.)	284 (75;643)	282 (154;589)	1,003	0,999	1,01	-	
<b>Glicemia, mg/dl</b>							0,614
media (DP)	104 ± 33	107 ± 24				-	
mediana (min.;máx.)	97 (79;382)	101 (80;210)	1,003	0,993	1,01	-	
<b>Creatinina, mg/dl</b>							0,993
media (DP)	0,93 ± 0,33	0,93 ± 0,27				-	
mediana (min.;máx.)	0,93 (0,62;4,78)	0,88 (0,56;2,25)	1,000	0,894	1,12	-	

OR calculado para aumento de 0,1 mg/dL. Resultado do teste t-Student; \* Resultado do teste Mann-Whitney. Legenda: ITB (índice tornozelo-braquial); OR (*oddsratio* - razão das chances); IC (intervalo de confiança); HF (hipercolesterolemia familiar); HAS (hipertensão arterial sistêmica); DM (diabetes mellitus); DCV (doença cardiovascular); DP (desvio padrão); PAS (pressão arterial sistólica); PAD (pressão arterial diastólica).

**Tabela 5.** Parâmetros clínicos e laboratoriais em uma população de indivíduos com hipercolesterolemia familiar (n=212) associados significativamente ao diagnóstico de doença arterial periférica (ITB $\leq$  0,90) conforme resultado do modelo de regressão logística múltipla

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
Idade (anos)	1,05	1,02	1,09	0,004
Tabagismo				
Não tabagista	1,00			
Ex-tabagista	1,76	0,65	4,74	0,263
Tabagista	3,83	1,42	10,32	0,008
Claudicação	6,61	2,78	15,73	<0,001

### 5.5 Associação entre doença cardiovascular clínica e doença arterial periférica diagnosticada pelo ITB em portadores de hipercolesterolemia familiar

Avaliamos a associação potencial entre a presença de doença cardiovascular clínica e alterações no ITB nos portadores de HF. A tabela 6 mostra as características clínico laboratoriais dos portadores de HF com ou sem manifestação de DCV prévia. Indivíduos com histórico de DCV eram mais velhos, predominantemente do sexo masculino, tabagistas ativos ou não ativos, hipertensos, com maior prevalência de arco corneano, maiores valores de pressão arterial diastólica, menores níveis sanguíneos de HDL-c e maiores níveis séricos de creatinina. Houve uma associação significativa entre histórico de doença cardiovascular e o diagnóstico de doença arterial periférica nesta população (OR= 3,20, IC 95% 1,53-6,67, p=0,001), porém tal associação não se manteve significativa no teste de regressão logística múltipla (tabela 7). As variáveis que se associaram independentemente à presença de doença



media (DP)	81 ± 12	77 ± 11				-	
mediana (min.;máx.)	80 (40;120)	78 (58;116)	0,973	0,948	1,000	-	
<b>IMC, kg/m<sup>2</sup></b>							0,846
media (DP)	27 ± 5	27 ± 5				-	
mediana (min.;máx.)	26,47 (18; 42)	26,27 (19;44)	0,993	0,929	1,062	-	
<b>Anos /Maço, anos</b>							0,053*
media (DP)	16 ± 22	20 ± 15				-	
mediana (min.;máx.)	9 (0;129)	16,8 (1;51)	1,009	0,985	1,034	-	
<b>CT, mg/dL</b>							0,709
media (DP)	336 ± 79	330 ± 103				-	
mediana (min.;máx.)	330 (101;679)	326,5 (137;539)	0,999	0,996	1,003	-	
<b>HDL-c, mg/dL</b>							<b>0,001</b>
media (DP)	48 ± 12	42 ± 12				-	
mediana (min.;máx.)	46 (22;98)	39,5 (19;82)	0,953	0,925	0,982	-	
<b>LDL-c, mg/dL</b>							0,893
media (DP)	256 ± 76	254 ± 103				-	
mediana (min.;máx.)	255 (54;611)	246 (82;466)	1,000	0,996	1,003	-	
<b>TG, mg/dL</b>							0,347
media (DP)	137 ± 60	146 ± 70				-	
mediana (min.;máx.)	136 (43;437)	134 (54;437)	1,002	0,998	1,007	-	
<b>Colesterol não HDL, mg/dL</b>							0,981
media (DP)	288 ± 79	288 ± 102				-	
mediana (min.;máx.)	284 (75;643)	280 (111;487)	1,000	0,997	1,004	-	
<b>Glicose, mg/dL</b>							0,054
media (DP)	101 ± 22	114 ± 48				-	
mediana (min.;máx.)	96 (79;259)	101 (80;382))	1,012	1,001	1,023	-	
<b>Creatinina, mg/dL</b>							<b>0,015</b>
media (DP)	0,88 ± 0,12	1,07 ± 0,56				-	
mediana (min.;máx.)	0,93 (0,56;1,33)	0,93 (0,68;4,78)	1,536	1,230	1,916	-	

OR calculado para aumento de 0,1 mg/dL. Resultado do teste t-Student; \* Resultado do teste Mann-Whitney. Legenda: ITB (índice tornozelo-braquial); OR (*oddsratio* - razão das chances); IC (intervalo de confiança); HF (hipercolesterolemia familiar); HAS (hipertensão arterial sistêmica); DM (diabetes mellitus); DCV (doença cardiovascular); DP (desvio padrão); PAS (pressão arterial sistólica); PAD (pressão arterial diastólica); CT (colesterol total)

**Tabela 7.** Parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados à presença de doença cardiovascular em indivíduos com hipercolesterolemia familiar (n=212) conforme modelo de regressão logística múltipla.

Variável	OR	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
<b>Idade (anos)</b>	1,05	1,01	1,08	0,007
<b>HDL</b>	0,95	0,91	0,99	0,006
<b>Tabagismo</b>				
Não	1,00			
Ex-tabagista	1,95	0,80	4,75	0,139
Sim	3,31	1,22	9,00	0,019
<b>HAS</b>				
Não	1,00			
Sim	3,25	1,40	7,55	0,006
<b>Claudicação</b>				
Não	1,00			
Sim	2,74	1,08	6,91	0,033
<b>Creatinina (0,1mg/dL)</b>	1,62	1,25	2,11	<0,0001

Legenda: HDL (Lipoproteína de alta densidade); (HAS (hipertensão arterial sistêmica)

### 5.6 Associação entre marcadores de aterosclerose subclínica representada pelos exames de angiotomografia de coronárias e escore de cálcio coronário e valores de ITB em portadores de hipercolesterolemia familiar

Foi avaliada a associação de valores alterados de ITB ( $\leq 0,90$ ) em portadores de HF e a presença de placa aterosclerótica coronária detectados pela angiotomografia e escore de cálcio (n=83). O escore de cálcio foi  $> 0$  em 44 pacientes (53%) havendo obstrução luminal em 24 casos (28%). A tabela 8 mostra que não houve qualquer associação do ITB com a presença de placas obstrutivas ou não e com o escore de cálcio.



**Tabela 8.** Comparação dos valores de ITB e a presença de placa aterosclerótica e escore de Cálcio detectados pela angiotomografia de coronárias em portadores de hipercolesterolemia familiar (n=83).

Variável	ITB		OR	IC (95%)		Total	p
	0,91-1,39 (n = 71)	≤0,90 (n = 12)		Inferior	Superior		
<b>Angiotomografia Coronária</b>							
Sim, n (%)	71 (85,5%)	12 (14,5%)					
<b>Redução luminal coronária</b>							
Não, n (%)	49 (83,1%)	10 (16,9%)	1,00			59	0,494*
Sim, n (%)	22 (91,7%)	2 (8,3%)	0,45	0,09	2,21	24	
<b>Grau de redução luminal</b>							
Discreto (<50%), n (%)	10 (100%)	0,00	1,00	-	-	10	0,272**
Moderado (≥50- 69%), n (%)	1 (100%)	0,00	#	-	-	1	
Grave (≥70%), n (%)	11 (84,6%)	2 (15,4)	#	-	-	13	
<b>Escore de cálcio (Agatston)</b>							
0	34 (87,2%)	5 (12,8%)	1,00	-	-	39	0,690
> 0	37 (84,1%)	7 (15,9%)	1,29	0,37	4,44	44	
media (DP)	50 ± 117	33,67 ± 58	-	-	-	-	>0,999
Mediana (min.;máx.)	1 (0;825)	1,5 (0;170)	-	-	-	-	

\* Teste exato de Fisher; \*\* Razão de Verossimilhança; Legenda: ITB (índice tornozelo braquial); OR (*oddsratio* - razão das chances); IC (intervalo de confiança); DP (desvio padrão)

## **6. Discussão**

---

Neste estudo avaliamos a prevalência da DAP diagnosticada pelo ITB alterado em portadores de HF em comparação com uma população normolipidêmica. Foram estudados também parâmetros clínicos e laboratoriais que se associaram com o ITB alterado na HF e finalmente se a presença da DAP associava-se com a doença cardiovascular previamente manifesta e com a aterosclerose subclínica determinada pela angiotomografia de coronárias.

### **6.1 Doença arterial periférica subclínica: importância do diagnóstico da HF**

Encontramos uma prevalência de DAP cerca de 7 vezes maior em portadores de HF (17.5%) comparados a população de controles normolipidêmicos (2.3%). Esses resultados são mais significativos devido a predominância do sexo feminino na população de HF. Característica esta que usualmente associa-se a menor prevalência de aterosclerose em idades mais precoces<sup>[83]</sup>. A presença de HF foi mais importante do que a de fatores classicamente associados à DAP como o diabetes e o tabagismo. Isso pode ser decorrente da exposição precoce dos portadores de HF a valores elevados de colesterol, certamente exposição esta mais longa do que ao diabetes e ao tabagismo. Nosso estudo confirma achados prévios que se associam a valores alterados do ITB como o aumento da idade e presença de DCV prévia. Contudo, é importante salientar que embora tenha havido ajuste dos achados na análise multivariada os portadores de HF eram mais velhos e tinham maior prevalência de fatores de risco para aterosclerose do que os controles. Da mesma forma, este estudo apresenta um provável viés por ter excluído da população controle indivíduos com possível hipercolesterolemia poligênica.

Contudo é importante enfatizar que o colesterol elevado não se associou com a presença da DAP na análise multivariada. Embora isso pareça paradoxal, já que a HF caracteriza-se por hipercolesterolemia, é importante frisar que o diagnóstico clínico e molecular da HF, este último realizado em 86% da população, implicam em um estado de exposição crônica e precoce à hipercolesterolemia. Consideramos que o diagnóstico da HF é muito mais fidedigno do que uma simples dosagem isolada de colesterol por mais elevada que ela seja. Esse fato corrobora com a importância do diagnóstico da HF e sua implicação com risco cardiovascular elevado.

#### **6.1.1. Doença arterial periférica e HF comparação com a literatura**

Pelo que sabemos, esse é o maior estudo que avaliou de forma sistemática a associação da HF com a DAP. Aqui, demonstramos a alta prevalência de DAP em portadores de HF em comparação com controles normolipidêmicos. Tal prevalência também é substancialmente maior que a prevalência de DAP na população geral, com a mesma faixa etária do nosso grupo estudado conforme demonstrado em uma recente meta-análise. Nesse estudo a prevalência de DAP foi de 7,08% e 6,38% respectivamente em mulheres e homens<sup>[84]</sup>. Nossos resultados são consistentes com os dados de uma revisão sistemática de pequenos estudos, usando diferentes metodologias para detectar a DAP, o qual mostra que a prevalência da doença arterial periférica é aumentada de cinco a 10 vezes nos portadores de HF comparados aos controles sem essa doença<sup>[7]</sup>. Em um dos estudos havia um elevado número de portadores da forma homozigótica da HF<sup>[85]</sup>. Fato que pode

superestimar a prevalência da doença já que estes desenvolvem aterosclerose precoce e sistêmica<sup>[86]</sup>.

Em 1995 Kroon et al<sup>[87]</sup> avaliaram a DAP por ITB e análise de velocidades do doppler no repouso e após hiperemia reativa num grupo de 68 portadores de HF heterozigótica (média de idade 45,8 anos) e 27 controles holandeses. Este estudo encontrou 31% de DAP nos vasos femuro-poplíteos vs. 3% nos controles. Em 19% dos casos a DAP foi a primeira manifestação de doença cardiovascular.

Recentemente Soska et al<sup>[88]</sup> avaliaram a presença de DAP em portadores de HF heterozigótica pelo método de índice vascular cardio-tornozelo (CAVI). Os autores não encontraram diferenças no CAVI entre os portadores de HF vs. normolipidêmicos após ajuste para os fatores de risco clássicos. Diferentemente de nosso estudo, contudo nenhum dos pacientes estudados apresentava diagnóstico molecular da HF. Nossos dados mostram que o ITB pode ser utilizado de forma prática para detectar a DAP em indivíduos HF heterozigótica, na sua grande maioria comprovado pelo encontro de mutações no receptor da LDL.

## **6.2. Determinantes da DAP em portadores de HF heterozigótica**

Em nosso estudo, as variáveis que se associaram independentemente ao diagnóstico de DAP em portadores de HF foram a idade e a presença de tabagismo ativo ou passado. Supomos que em nosso estudo a alta prevalência de DAP na HF é o resultado da junção da exposição prolongada à hipercolesterolemia associada a outros fatores de risco. Como sabemos idade

e tabagismo são também importantes fatores para a DAP na população em geral<sup>[16, 89]</sup>. É importante enfatizar, contudo, que a ausência de associação do colesterol com a DAP nos portadores de HF não diminui a importância desse fator de risco para a aterosclerose periférica. Isso decorre do fato de o colesterol ser muito elevado em ambos os grupos de portadores de HF fato que não os diferencia. É importante salientar que dados do estudo 4S mostram que o uso da sinvastatina diminuiu a DAP em indivíduos com hipercolesterolemia grave<sup>[90]</sup>.

### **6.3. Associação entre DAP e manifestação prévia de DCV em portadores de HF heterozigótica**

Neste estudo avaliamos ainda a associação potencial entre a presença de doença cardiovascular clínica e prevalência de DAP diagnosticada pelo ITB alterado em portadores de HF. Portadores de HF com histórico de doença cardiovascular apresentaram um risco cerca de 3 vezes maior, na análise univariada, de ter doença arterial periférica mesmo que em sua forma subclínica quando comparados aos sem manifestação prévia de DCV. No entanto tal associação não se manteve significativa no teste de regressão logística múltipla quando ajustadas para variáveis de confusão (idade, sexo, HAS, DM, tabagismo, perfil lipídico, níveis séricos de glicemia e creatinina). As variáveis que se associaram independentemente à presença de doença cardiovascular nessa população de HF foram, idade, tabagismo, hipertensão arterial sistêmica, menores níveis de HDL-c e maiores níveis séricos de creatinina, que se assemelham a fatores de risco já estabelecidos para DCV na população geral<sup>[91]</sup>. Apesar disso, acreditamos que a DAP possa ser um

indicativo de maior risco de eventos cardiovasculares em outros leitos arteriais. Já que os fatores de risco que causam a aterosclerose são comuns às diferentes formas de manifestação clínica dessa doença.

### **6.3.1 Há espaço para identificação da DAP na predição de eventos cardiovasculares na HF?**

Apesar da clara associação da HF com doença aterosclerótica precoce, o curso das manifestações clínicas dessa doença em portadores de HF é variável, sendo que muitos indivíduos não irão apresentar manifestações clínicas de doença cardiovascular apesar de valores extremamente elevados de colesterol<sup>[80, 83]</sup>. Diferentemente, a doença arterial periférica parece depender de outros fatores além da elevação do colesterol, como por exemplo, a idade, tabagismo, HAS e DM<sup>[16]</sup>. Esta observação é consistente com nossos resultados, já que no presente estudo o nível de colesterol não foi um preditor independente da alteração dos valores de ITB.

O ITB é um marcador específico da DAP e sua alteração está associada em estudos prospectivos ao risco de manifestação clínica de DCV<sup>[28]</sup>. Devemos ressaltar, no entanto, que este é um estudo transversal fato que não nos permitiu confirmar uma associação entre a DAP e o risco de eventos cardiovasculares na HF. Dessa forma não podemos afirmar que a longo prazo, valores alterados de ITB e consequentemente diagnóstico de DAP vão ou não indicar um risco maior de eventos cardiovasculares na população de HF como já descrito na população normal. Para isso seria necessário mostrar que o uso sistemático do ITB poderia discriminar e reclassificar o risco de eventos cardiovasculares nessa população. Estudos prospectivos e longitudinais são

necessários para que possamos determinar o papel da detecção da DAP como preditora do risco de evento cardíacos e cerebrovasculares na HF heterozigótica.

#### **6.4. Comparação dos valores de ITB e marcadores de aterosclerose subclínica detectados pela angiotomografia e escore de cálcio coronário**

A HF apresenta elevada prevalência de aterosclerose coronária subclínica detectada tanto pelo escore de cálcio como pela angiotomografia de coronárias. Embora não haja estudos prospectivos nessa população, dados de estudos como o MESA e o registro CONFIRM<sup>[92]</sup> mostram que tanto a CAC como a detecção de obstrução coronária são marcadores independentes do risco de eventos cardiovasculares em indivíduos assintomáticos. De fato o estudo MESA<sup>[93]</sup> mostrou que a CAC é um melhor marcador de doença coronária do que o ITB, fato que sugere haver uma dissociação da doença subclínica coronária e periférica.

Em nosso estudo tentamos mostrar uma associação da DAP com a doença coronária subclínica em portadores de HF. Comparamos assim os valores de ITB entre portadores de HF com e sem placa de ateroma pela tomografia. Não encontramos uma associação entre valores alterados de ITB ( $\leq 0,90$ ) e a presença de placas coronarianas e sua gravidade, bem como valores alterados de Escore de Cálcio. Embora o processo comum ligando a DAP com a DAC seja aterosclerose sabe-se que fatores de risco diferentes podem ter influencia variável em leitos arteriais diversos. De fato previamente demonstramos que na HF há pouca associação da gravidade da DAC com



gravidade da doença subclínica aórtica e carotídea<sup>[54, 80]</sup>. Nosso estudo sugere não haver boa associação também da DAC subclínica com a DAP. Contudo, não podemos excluir que a limitação da amostra e o desenho transversal do estudo tenham limitado nosso poder amostral. Estudos prospectivos e com um maior número de pacientes são necessários para melhor explorar a relação da DAP e DAC subclínicas na HF.

## **7. Limitações**

A natureza transversal de nosso estudo permite apenas demonstrar a prevalência da DAP na população de portadores de HF comparada a uma população de normolipidêmicos e sua associação com parâmetros clínicos e laboratoriais e de aterosclerose subclínica. Estudos prospectivos são necessários para se avaliar o papel da DAP detectada por meio do ITB na avaliação do risco cardiovascular em portadores de HF.

## **8. Conclusão**

---

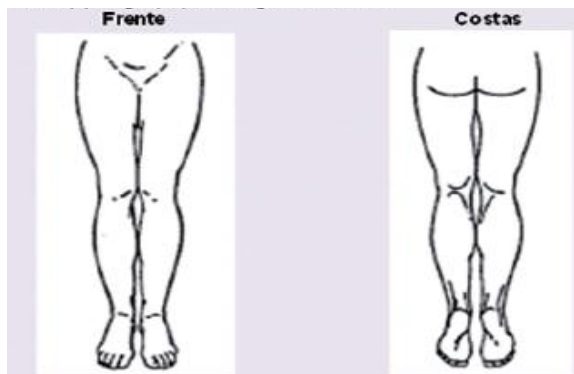
Nossos resultados indicam que a DAP é mais freqüente na HF do que em indivíduos normolipidêmicos e que outros fatores de risco potencializam o colesterol para sua presença. Não foi encontrada associação independente da alteração do ITB com manifestação de DCV prévia e com a aterosclerose coronária subclínica. Contudo, mais estudos são necessários para determinar o papel do uso do ITB como ferramenta para avaliação do risco de eventos cardiovasculares nessa população.

## **9. Anexos**

---

## Anexo 1 - Questionário de Claudicação de Edimburgo

- 1) Você tem dor ou desconforto na(s) perna(s) quando anda?
  - (0) Não – Encerra questionário
  - (1) Eu sou incapaz de andar - Encerra questionário
  - (2) Sim - responda as questões seguintes
- 2) Essa dor alguma vez começa quando você está em pé parado ou sentado?
  - (0) Não
  - (1) Sim
- 3) Você tem essa dor ao subir uma ladeira ou quando anda rápido?
  - (0) Não
  - (1) Sim
- 4) Você tem essa dor quando anda no seu ritmo normal, no plano?
  - (0) Não
  - (1) Sim
- 5) O que acontece com a dor quando você pára?
  - (0) Geralmente continua por mais que 10 minutos
  - (1) Geralmente desaparece em 10 minutos ou menos
- 6) Onde você sente essa dor ou desconforto? Marque "X" o(s) lugar(es) no diagrama abaixo:



- Panturrilha(s)       Coxa(s)  
 Glúteos(s)    outras localizações

### RESULTADO:

(1) POSITIVO PARA CLAUDICAÇÃO – TIPO DE CLAUDICAÇÃO:

TÍPICA    ATÍPICA

(2) NEGATIVO PARA CLAUDICAÇÃO

ORIENTAÇÕES PARA SE CHEGAR AO RESULTADO:

**POSITIVO:** Q1= (2) Sim; Q2= (0) Não; Q3= (1) Sim; Q4= Indiferente; Q5=(1) Geralmente desaparece em 10 minutos ou menos; Q6=Assinalou uma ou mais das seguintes localizações: Panturrilha(s), coxa(s) e/ou glúteos(s) **TÍPICA:** Q6 = Assinalou Panturrilha(s), independente de terem sido assinaladas também outras localizações **ATÍPICA:** Q6 = Não assinalou Panturrilha(s), MAS assinalou coxa(s) e/ou glúteos(s)

**NEGATIVO:** Qualquer combinação diferente da acima

## **10. Referências**

---



1. Grundy, S.M., et al., *Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology*, in *Circulation*. 1999. p. 1481-92.
2. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia. Implications for pathogenesis and therapy*, in *Med Clin North Am*. 1982. p. 335-62.
3. Varret, M., et al., *Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia*, in *Clin Genet*. 2008. p. 1-13.
4. Civeira, F. and H. International Panel on Management of Familial, *Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia*, in *Atherosclerosis*. 2004. p. 55-68.
5. Marks, D., et al., *A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia*, in *Atherosclerosis*. 2003. p. 1-14.
6. *Mortality in treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: implications for clinical management. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group*, in *Atherosclerosis*. 1999. p. 105-12.
7. Austin, M.A., et al., *Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review*, in *Am J Epidemiol*. 2004. p. 421-9.
8. Genest, J. and T.R. Pedersen, *Prevention of cardiovascular ischemic events: high-risk and secondary prevention*, in *Circulation*. 2003. p. 2059-65.

9. Slack, J., *Risks of ischaemic heart-disease in familial hyperlipoproteinaemic states*, in *Lancet*. 1969. p. 1380-2.
10. Stone, N.J., et al., *Coronary artery disease in 116 kindred with familial type II hyperlipoproteinemia*, in *Circulation*. 1974. p. 476-88.
11. Mohrschladt, M.F., et al., *Cardiovascular disease and mortality in statin-treated patients with familial hypercholesterolemia*, in *Atherosclerosis*. 2004. p. 329-35.
12. Aronow, W.S. and C. Ahn, *Prevalence of coexistence of coronary artery disease, peripheral arterial disease, and atherothrombotic brain infarction in men and women > or = 62 years of age*, in *Am J Cardiol*. 1994. p. 64-5.
13. Newman, A.B., et al., *Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group*, in *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999. p. 538-45.
14. Newman, A.B., K.S. Tyrrell, and L.H. Kuller, *Mortality over four years in SHEP participants with a low ankle-arm index*, in *J Am Geriatr Soc*. 1997. p. 1472-8.
15. Belch, J.J., et al., *Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: a call to action*, in *Arch Intern Med*. 2003. p. 884-92.
16. Dormandy, J.A. and R.B. Rutherford, *Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC)*, in *J Vasc Surg*. 2000. p. S1-S296.
17. Howell, M.A., et al., *Relationship of severity of lower limb peripheral vascular disease to mortality and morbidity: a six-year follow-up study*, in *J Vasc Surg*. 1989. p. 691-6; discussion 696-7.

18. Criqui, M.H., et al., *Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease*, in *N Engl J Med*. 1992. p. 381-6.
19. McDermott, M.M., et al., *The ankle-brachial index as a predictor of survival in patients with peripheral vascular disease*, in *J Gen Intern Med*. 1994. p. 445-9.
20. Makdisse, M., et al., *Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in the Hearts of Brazil Project*, in *Arq Bras Cardiol*. 2008. p. 370-82.
21. Garcia, L.A., *Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease*, in *J Endovasc Ther*. 2006. p. 113-9.
22. Mostaza, J.M., et al., *[Ankle brachial index and cardiovascular risk]*, in *Med Clin (Barc)*. 2003. p. 68-73.
23. Meijer, W.T., et al., *Peripheral arterial disease in the elderly: The Rotterdam Study*, in *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998. p. 185-92.
24. Diehm, C., et al., *High prevalence of peripheral arterial disease and comorbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study*, in *Atherosclerosis*. 2004. p. 95-105.
25. Senti, M., et al., *Lipoprotein profile in men with peripheral vascular disease. Role of intermediate density lipoproteins and apoprotein E phenotypes*, in *Circulation*. 1992. p. 30-6.
26. Diehm, C., et al., *Relationship between lipid parameters and the presence of peripheral arterial disease in elderly patients*, in *Curr Med Res Opin*. 2004. p. 1873-5.

- 
27. Hirsch, A.T., et al., *ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation*, in *Circulation*. 2006. p. e463-654.
  28. Zheng, Z.J., et al., *Associations of ankle-brachial index with clinical coronary heart disease, stroke and preclinical carotid and popliteal atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*, in *Atherosclerosis*. 1997. p. 115-25.
  29. Greenland, P., S.C. Smith, Jr., and S.M. Grundy, *Improving coronary heart disease risk assessment in asymptomatic people: role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests*, in *Circulation*. 2001. p. 1863-7.
  30. Donnelly, R., D. Hinwood, and N.J. London, *ABC of arterial and venous disease. Non-invasive methods of arterial and venous assessment*, in *BMJ*. 2000. p. 698-701.
  31. Resnick, H.E., et al., *Relationship of high and low ankle brachial index to all-cause and cardiovascular disease mortality: the Strong Heart Study*, in *Circulation*. 2004. p. 733-9.

- 
32. McKenna, M., S. Wolfson, and L. Kuller, *The ratio of ankle and arm arterial pressure as an independent predictor of mortality*, in *Atherosclerosis*. 1991. p. 119-28.
  33. Vogt, M.T., et al., *Decreased ankle/arm blood pressure index and mortality in elderly women*, in *JAMA*. 1993. p. 465-9.
  34. Ankle Brachial Index, C., et al., *Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis*, in *JAMA*. 2008. p. 197-208.
  35. McDermott, M.M., et al., *Ankle-brachial index and subclinical cardiac and carotid disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis*, in *Am J Epidemiol*. 2005. p. 33-41.
  36. Lieber, A. and J. Jorgens, *Cinefluorography of coronary artery calcification. Correlation with clinical arteriosclerotic heart disease and autopsy findings*, in *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1961. p. 1063-72.
  37. Sary, H.C., *The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life*, in *Eur Heart J*. 1990. p. 3-19.
  38. Ehara, S., et al., *Coronary artery calcification revisited*, in *J Atheroscler Thromb*. 2006. p. 31-7.
  39. Kuettner, A., et al., *Noninvasive detection of coronary lesions using 16-detector multislice spiral computed tomography technology: initial clinical results*, in *J Am Coll Cardiol*. 2004. p. 1230-7.

- 
40. Stanford, W., et al., *Coronary artery calcium quantification at multi-detector row helical CT versus electron-beam CT*, in *Radiology*. 2004. p. 397-402.
  41. Jones, C.M., et al., *Multi-slice computed tomography in coronary artery disease*, in *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006. p. 443-50.
  42. Budoff, M.J., et al., *Assessment of coronary artery disease by cardiac computed tomography: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Cardiovascular Imaging and Intervention, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Committee on Cardiac Imaging, Council on Clinical Cardiology*, in *Circulation*. 2006. p. 1761-91.
  43. Raff, G.L., et al., *Diagnostic accuracy of noninvasive coronary angiography using 64-slice spiral computed tomography*, in *J Am Coll Cardiol*. 2005. p. 552-7.
  44. Reilly, M.P., et al., *Coronary artery calcification and cardiovascular risk factors: impact of the analytic approach*, in *Atherosclerosis*. 2004. p. 69-78.
  45. Rumberger, J.A., et al., *Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study*, in *Circulation*. 1995. p. 2157-62.
  46. Baumgart, D., et al., *Comparison of electron beam computed tomography with intracoronary ultrasound and coronary angiography for detection of coronary atherosclerosis*, in *J Am Coll Cardiol*. 1997. p. 57-64.

- 
47. Schmermund, A., et al., *Comparison of electron-beam computed tomography and intracoronary ultrasound in detecting calcified and noncalcified plaques in patients with acute coronary syndromes and no or minimal to moderate angiographic coronary artery disease*, in *Am J Cardiol*. 1998. p. 141-6.
  48. Ringqvist, I., et al., *Prognostic value of angiographic indices of coronary artery disease from the Coronary Artery Surgery Study (CASS)*, in *J Clin Invest*. 1983. p. 1854-66.
  49. Emond, M., et al., *Long-term survival of medically treated patients in the Coronary Artery Surgery Study (CASS) Registry*, in *Circulation*. 1994. p. 2645-57.
  50. Greenland, P., et al., *Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals*, in *JAMA*. 2004. p. 210-5.
  51. Kondos, G.T., et al., *Electron-beam tomography coronary artery calcium and cardiac events: a 37-month follow-up of 5635 initially asymptomatic low- to intermediate-risk adults*, in *Circulation*. 2003. p. 2571-6.
  52. Ryan, T.J., et al., *Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Subcommittee on Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty)*, in *Circulation*. 1988. p. 486-502.
  53. Santos, R.D., et al., *Detection of subclinical atherosclerosis by electron beam tomography in females with heterozygous familial hypercholesterolaemia*, in *Heart*. 2004. p. 92-4.

- 
54. Martinez, L.R., et al., *No correlation and low agreement of imaging and inflammatory atherosclerosis' markers in familial hypercholesterolemia*, in *Atherosclerosis*. 2008. p. 83-8.
  55. Mollet, N.R., et al., *Multislice spiral computed tomography coronary angiography in patients with stable angina pectoris*, in *J Am Coll Cardiol*. 2004. p. 2265-70.
  56. Achenbach, S., et al., *Detection of coronary artery stenoses by contrast-enhanced, retrospectively electrocardiographically-gated, multislice spiral computed tomography*, in *Circulation*. 2001. p. 2535-8.
  57. Nieman, K., et al., *Reliable noninvasive coronary angiography with fast submillimeter multislice spiral computed tomography*, in *Circulation*. 2002. p. 2051-4.
  58. Rodenwaldt, J., *Multislice computed tomography of the coronary arteries*, in *Eur Radiol*. 2003. p. 748-57.
  59. Georg, C., et al., *[Optimizing image reconstruction timing for the RR interval in imaging coronary arteries with multi-slice computerized tomography]*, in *Rofo*. 2001. p. 536-41.
  60. Dewey, M., et al., *Noninvasive coronary angiography by 320-row computed tomography with lower radiation exposure and maintained diagnostic accuracy: comparison of results with cardiac catheterization in a head-to-head pilot investigation*, in *Circulation*. 2009. p. 867-75.
  61. Ohnesorge, B., et al., *Cardiac imaging by means of electrocardiographically gated multisection spiral CT: initial experience*, in *Radiology*. 2000. p. 564-71.



- 
62. Caussin, C., et al., *Characterization of vulnerable nonstenotic plaque with 16-slice computed tomography compared with intravascular ultrasound*, in *Am J Cardiol.* 2004. p. 99-104.
  63. Leber, A.W., et al., *Composition of coronary atherosclerotic plaques in patients with acute myocardial infarction and stable angina pectoris determined by contrast-enhanced multislice computed tomography*, in *Am J Cardiol.* 2003. p. 714-8.
  64. Inoue, F., et al., *Evaluation of plaque texture by means of multislice computed tomography in patients with acute coronary syndrome and stable angina*, in *Circ J.* 2004. p. 840-4.
  65. Pundziute, G., et al., *Prognostic value of multislice computed tomography coronary angiography in patients with known or suspected coronary artery disease*, in *J Am Coll Cardiol.* 2007. p. 62-70.
  66. Alderman, E.L., et al., *Five-year angiographic follow-up of factors associated with progression of coronary artery disease in the Coronary Artery Surgery Study (CASS). CASS Participating Investigators and Staff*, in *J Am Coll Cardiol.* 1993. p. 1141-54.
  67. Ambrose, J.A., et al., *Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction*, in *J Am Coll Cardiol.* 1988. p. 56-62.
  68. Little, W.C., et al., *Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease?*, in *Circulation.* 1988. p. 1157-66.
  69. Tonstad, S., et al., *Carotid intima-media thickness and plaque in patients with familial hypercholesterolaemia mutations and control subjects*, in *Eur J Clin Invest.* 1998. p. 971-9.

70. Wiegman, A., et al., *Arterial intima-media thickness in children heterozygous for familial hypercholesterolaemia*, in *Lancet*. 2004. p. 369-70.
71. Taira, K., et al., *Positive family history for coronary heart disease and 'midband lipoproteins' are potential risk factors of carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia*, in *Atherosclerosis*. 2002. p. 391-7.
72. Wittekoek, M.E., et al., *Differences in intima-media thickness in the carotid and femoral arteries in familial hypercholesterolemic heterozygotes with and without clinical manifestations of cardiovascular disease*, in *Atherosclerosis*. 1999. p. 271-9.
73. Goldberg, A.C., et al., *Familial hypercholesterolemia: screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients: clinical guidance from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia*. *J Clin Lipidol*, 2011. **5**(3 Suppl): p. S1-8.
74. Mata, P., et al., *MEDPED and the Spanish Familial Hypercholesterolemia Foundation*. *Atheroscler Suppl*, 2002. **2**(3): p. 9-11.
75. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*, in *Nucleic Acids Res*. 1988. p. 1215.
76. Sociedade Brasileira de Cardiologia, S.B.C., S.B.H. Sociedade Brasileira de Hipertensao, and S.B.N. Sociedade Brasileira de Nefrologia, [*V Brazilian Guidelines in Arterial Hypertension*]. in *Arq Bras Cardiol*. 2007. p. e24-79.

- 
77. Oosterveer, D.M., et al., *Differences in characteristics and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients with and without tendon xanthomas: a systematic review and meta-analysis*, in *Atherosclerosis*. 2009. p. 311-7.
  78. Makdisse, M., et al., *A risk score for predicting peripheral arterial disease in individuals 75 years or older*, in *Arq Bras Cardiol*. 2007. p. 630-6.
  79. Makdisse, M., et al., *Cross-cultural adaptation and validation of the Brazilian Portuguese version of the Edinburgh Claudication Questionnaire*, in *Arq Bras Cardiol*. 2007. p. 501-6.
  80. Miname, M.H., et al., *Evaluation of subclinical atherosclerosis by computed tomography coronary angiography and its association with risk factors in familial hypercholesterolemia*, in *Atherosclerosis*. 2010. p. 486-91.
  81. Rosner, B., *Fundamentals of Bioestistics*. 1986.
  82. KIRKWOOD, B.R.a.S., J. A. C *Essential medical statistics*. 2nd ed. ed. 2006, Massachusetts, USA. : Blackwell Science.
  83. Nordestgaard, B.G., 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.
  84. Fowkes, F.G., et al., *Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis*. *Lancet*, 2013. **382**(9901): p. 1329-40.

- 
85. Rubba, P., et al., *Non-invasive evaluation of iliac and carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia*. Beitr Infusionsther, 1988. **23**: p. 33-8.
86. Raal, F.J. and R.D. Santos, *Homozygous familial hypercholesterolemia: current perspectives on diagnosis and treatment*. Atherosclerosis, 2012. **223**(2): p. 262-8.
87. Kroon, A.A., et al., *The prevalence of peripheral vascular disease in familial hypercholesterolaemia*. J Intern Med, 1995. **238**(5): p. 451-9.
88. Soska, V., et al., *Cardio-ankle vascular index in heterozygous familial hypercholesterolemia*. J Atheroscler Thromb, 2012. **19**(5): p. 453-61.
89. Katsiki, N., et al., *Smoking and vascular risk: are all forms of smoking harmful to all types of vascular disease?* Public Health, 2013. **127**(5): p. 435-41.
90. Pedersen, T.R., et al., *Effect of simvastatin on ischemic signs and symptoms in the Scandinavian simvastatin survival study (4S)*. Am J Cardiol, 1998. **81**(3): p. 333-5.
91. Sposito, A.C., et al., *[IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]*. Arq Bras Cardiol, 2007. **88 Suppl 1**: p. 2-19.
92. Cho, I., et al., *Coronary computed tomographic angiography and risk of all-cause mortality and nonfatal myocardial infarction in subjects without chest pain syndrome from the CONFIRM Registry (coronary CT angiography evaluation for clinical outcomes: an international multicenter registry)*. Circulation, 2012. **126**(3): p. 304-13.

93. Yeboah, J., et al., *Comparison of novel risk markers for improvement in cardiovascular risk assessment in intermediate-risk individuals*. JAMA, 2012. **308**(8): p. 788-95.