

ANTONIO GABRIELE LAURINAVICIUS

**Avaliação da aterosclerose subclínica em portadores
de HDL-colesterol marcadamente elevado**

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
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Laurinavicius, Antonio Gabriele

Avaliação da aterosclerose subclínica em portadores de HDL-colesterol
marcadamente elevado / Antonio Gabriele Laurinavicius. -- São Paulo, 2015.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cardiologia.

Orientador: Raul Dias dos Santos Filho.

Descritores: 1.HDL-colesterol 2.Hiperalfalipoproteinemia 3.HALP
4.Aterosclerose 5.Efluxo de colesterol 6.Espessura íntima-média carotídea
7.Calcificação coronariana 8.Interleucina-6 9.TNF-alfa

USP/FM/DBD-520/15

Aos meus pais, Rodolfo e Giuseppina, por seu inspirador exemplo de vida e por aquele amor incondicional que é doação de si mesmo e que vence qualquer distância.

À minha amada esposa Patrícia, anjo do nosso lar, pela coragem que é capaz de me infundir nos momentos mais difíceis e por todo seu apoio carinhoso ao longo deste caminho. Não há conquista que não seja nossa.

Aos meus filhos Gabriel e Luca, alegria da minha alma, orgulho da minha razão e apelo da minha consciência para trilhar os caminhos da verdade.

Ao meu querido irmão Andrea, que me ensinou que a vida tem o tamanho do nosso amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Raul Dias dos Santos Filho, por tudo que me ensinou ao longo destes anos; por seu exemplo como grande cientista, educador e ser humano; e por sua paciência nos momentos mais difíceis desta jornada.

Aos queridos colegas e grandes amigos do Departamento de Dislipidemias do InCor: Dra. Ana Paula C. Marte, Dr. Wilson S. Filho, Dr. Marcio H. Minami, Dr. Henrique Staniak e Sueli Stifoni, por todo seu suporte e pelos ótimos momentos que passamos juntos.

À Dra. Viviane R. Zorzanelli, por suas valiosas contribuições na elaboração deste projeto.

À Dra. Edna R. Nakandakare e à Dra. Marisa Passarelli, profundas conhecedoras do metabolismo da HDL, que viabilizaram as várias formas de avaliação funcional da HDL adotadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Bortolotto e à Dra. Valeria Hong, por sua fundamental contribuição na avaliação da doença vascular subclínica em nossos voluntários.

Ao Dr. Paulo Lotufo, ao Dr. Itamar Santos e à Dra. Isabela Bonsenor, pela generosa disponibilidade na discussão metodológica e na análise dos resultados.

Ao Dr. Leonardo Mateus Lima, por sua importante parceria no projeto.

*“O último esforço da razão é reconhecer que existe uma
infinidade de coisas que a ultrapassam”.*

Blaise Pascal

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Relação entre HDL-colesterol (HDL-c) e risco cardiovascular	2
1.2 Estrutura da HDL e Metabolismo do HDL-c	3
1.2.1 Estrutura da HDL	3
1.2.2 Metabolismo do HDL-c.....	4
1.3 Determinantes das concentrações plasmáticas do HDL-c	6
1.4 Dissociação entre concentração do HDL-c e função das HDLs em determinados subgrupos	7
1.5 Hiperalfalipoproteinemia (HALP)	8
1.6 HALP e aterosclerose	9
1.6.1 Evidências epidemiológicas	10
1.6.2 Evidências experimentais: inibição farmacológica da CETP.....	10
1.7 Métodos de avaliação de doença vascular subclínica	11
1.8 Justificativa	13
2 OBJETIVOS	15
3 MÉTODOS	17
3.1 Desenho geral do estudo	17
3.2 Desenho do Braço 1	17
3.2.1 A coorte do ELSA-Brasil	17
3.2.2 Avaliações realizadas na coorte do ELSA-Brasil para fins do presente estudo	18
3.2.3 Amostragem para o estudo.....	19
3.2.4 Análise estatística	19
3.3 Desenho do Braço 2	20
3.3.1 Screening e recrutamento dos portadores de HALP	20

3.3.2 Avaliação dos portadores de HALP	21
3.3.3 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	31
4.1 Resultados Braço 1	31
4.1.1 Análise exploratória por quintis de HDL-c	31
4.1.2 Comparação do “Grupo com HDL-c normal” com o “Grupo HALP”	34
4.2 Resultados do Braço 2	37
4.2.1 Características gerais da população estudada e prevalência de doença vascular subclínica	37
4.2.2 Composição e função da HDL, e sua relação com a presença de doença vascular subclínica em portadores de HALP	42
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÕES	53
7 REFERÊNCIAS	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ARIC	<i>Atherosclerosis Risk in Communities Study</i>
CA	Cintura Abdominal
CAC	Calcificação das Artérias Coronárias
CETP	<i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i>
DAC	Doença Arterial Coronariana
EIMC	Espessura Íntimo-Medial da Carótida
ELSA	Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HALP	Hiperalfalipoproteinemia
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HDL-c	HDL-colesterol
IMC	Índice de Massa Corpórea
InCor	Instituto do Coração
LCAT	<i>Lecitina Coolesterol Acil Transferase</i>
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LH	Lipase Hepática
LLP	Lípase Lipoproteica
PBS	Solução de Tampão Fosfato
TCMD	Tomografia Computadorizada de Múltiplos Detectores
VOP	Velocidade de Onda de Pulso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho geral do Braço 2 do estudo	20
Figura 2	Representação gráfica do modelo experimental para avaliação do efeito inibitório da HDL sobre a oxidação das LDLs	24
Figura 3	Representação gráfica do modelo experimental para avaliação da função anti-inflamatória das HDLs.....	25
Figura 4	Representação gráfica do modelo experimental para avaliação da capacidade de efluxo das HDLs	26
Figura 5	EIMC por quintis de HDL-c	33
Figura 6	Grau de calcificação coronariana por quintis de HDL-c.....	33
Figura 7	Diferença na EIMC média entre portadores de HALP e indivíduos com HDL-c normal.....	36
Figura 8	Grau de calcificação em portadores de HALP e em indivíduos com HDL-c normal.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil demográfico, clínico e laboratorial conforme quintis de HDL-c na coorte do estudo ELSA	32
Tabela 2	HALP <i>versus</i> HDL-c Normal: Variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais	35
Tabela 3	Coeficientes Beta (Intervalo de Confiança 95%) para a associação entre EIMC e HDL-c por quintis (Quartil 1 como referência) e em portadores de HALP (“HDL-c Normal” como referência)	37
Tabela 4	Características da população estudada (n=80)	38
Tabela 5	Avaliação tomográfica e ultrassonográfica da população estudada (n=80).....	39
Tabela 6	Variáveis categóricas associadas a grau de calcificação coronariana (n= 62)	39
Tabela 7	Variáveis contínuas associadas a grau de calcificação coronariana (n= 62)	40
Tabela 8	Associação entre VOP avaliado por quartis e as variáveis categóricas consideradas	41
Tabela 9	Associação entre VOP, EIMC e CAC em portadores de HALP	42
Tabela 10	Níveis de APOA4 e grau de calcificação coronariana em portadores de HALP	43
Tabela 11	Composição da HDL e VOP em portadores de HALP	43
Tabela 12	Composição e função da HDL e EIMC em portadores de HALP	44
Tabela 13	Função da HDL e calcificação coronariana em portadores de HALP	45
Tabela 14	Efluxo de colesterol, aterosclerose subclínica e função da HDL em portadores de HALP	46

Tabela 15	Associação da atividade anti-inflamatória da HDL, avaliada por meio da inibição da secreção de TNF alfa, com o grau de doença vascular subclínica em portadores de HALP	46
Tabela 16	Modelo final: determinantes independentes de EIMC em portadores de HALP	46

RESUMO

Laurinavicius AG. *Avaliação da aterosclerose subclínica em portadores de HDL-colesterol marcadamente elevado* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O HDL-c é um fator de risco cardiovascular negativo e sua concentração plasmática apresenta relação inversa com a incidência de eventos cardiovasculares. Entretanto, as evidências relativas ao grupo de indivíduos com níveis de HDL-c acima do percentil 95 da população geral ainda são escassas e o impacto da hiperalfalipoproteinemia (HALP) sobre o risco cardiovascular continua representando motivo de controvérsia na literatura médica. Alguns estudos em populações específicas associam a HALP a aumento do risco cardiovascular. Ao mesmo tempo, outros estudos identificaram populações de indivíduos hipoalfalipoproteinêmicos com marcada longevidade. Assim, demonstrou-se aparente dissociação entre níveis de HDL-c e risco cardiovascular em determinadas populações, reconduzível a aspectos disfuncionais da HDL. O objetivo do presente estudo foi verificar o papel da HALP na determinação do risco cardiovascular; comparar a prevalência de doença cardiovascular subclínica, avaliada por meio da quantificação ultrassonográfica da Espessura Íntimo-Medial Carotídea (EIMC), entre portadores de HDL-c ≥ 90 mg/dL (grupo HALP) e portadores de concentrações de HDL-c atualmente consideradas normais (entre 40 e 50mg/dL para os homens e entre 50 e 60mg/dL para as mulheres); e avaliar características e função da HDL em portadores de HALP por meio do estudo de sua composição, de sua capacidade de efluxo de colesterol, e de sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, correlacionando estas características com a presença de doença cardiovascular subclínica avaliada por meio da determinação da EIMC, da Velocidade de Onda de Pulso (VOP) e da presença de Calcificação Arterial Coronariana (CAC) avaliada pela TCMD. Para responder estas perguntas, o presente estudo foi articulado em dois braços: **Braço 1:** Análise da coorte do estudo ELSA com o objetivo de determinar a prevalência de HALP em uma população geral; definir o perfil demográfico, antropométrico e metabólico dos portadores de HALP; e comparar a prevalência de doença vascular subclínica deste grupo com controles da mesma coorte com níveis normais de HDL-colesterol. **Braço 2:** Recrutamento de 80 voluntários hígidos e portadores de HALP para avaliação da correlação entre presença de doença vascular subclínica, e aspectos estruturais e funcionais da HDL. Em seus dois braços, o estudo levou a quatro conclusões principais: 1) Níveis marcadamente elevados de HDL-c estão associados a menor espessura íntimo-medial carotídea quando comparados a níveis de HDL-c considerados normais pelas diretrizes vigentes. Embora portadores do fenótipo HALP apresentem, como grupo, um perfil metabólico mais favorável

que o encontrado em indivíduos com HDL-c normal, a associação entre EIMC e HALP foi independente dos fatores de risco tradicionais, indicando que a menor prevalência destes últimos em portadores de HDL-c marcadamente elevado justifica apenas parcialmente a menor prevalência de doença vascular subclínica neste grupo; 2) Embora a HALP se apresente como um fenótipo ateroprotetor, há indivíduos com níveis marcadamente elevados de HDL-c que evoluem com doença cardiovascular, clínica ou subclínica. Neste contexto, nossos resultados indicam correlação entre os três métodos avaliados para estudar doença vascular subclínica em portadores de HALP: EIMC, VOP e CAC; 3) Os fatores de risco tradicionais continuam exercendo seu peso na determinação do risco cardiovascular em portadores de HALP. Idade, tabagismo, hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e altos níveis de LDL-c apresentaram associação estatisticamente significativa com a presença de doença vascular subclínica no grupo estudado; 4) A avaliação da composição e da função da HDL em portadores de HALP pode permitir identificar indivíduos especificamente mais suscetíveis à aterosclerose. Nossos resultados indicam que, em particular, a atividade anti-inflamatória da HDL, avaliada pela capacidade de inibição da produção de IL-6; o efluxo de colesterol e a capacidade de transferência de triglicérides apresentaram associação independente com menor espessura íntimo-medial carotídea em portadores de HALP, enquanto níveis mais altos de Apo A-IV se associaram a maior grau de doença cardiovascular subclínica.

Descritores: HDL-colesterol; hiperalfalipoproteinemia; HALP; aterosclerose; efluxo de colesterol; espessura íntima-media carotídea; calcificação coronariana; interleucina-6; TNF-alfa.

ABSTRACT

Laurinavicius AG. *Evaluation of subclinical atherosclerosis in individuals with markedly elevated HDL-cholesterol* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

HDL-c is a negative cardiovascular risk factor and its plasma concentration is inversely related to the incidence of cardiovascular events. However, evidence of benefit among subjects with HDL-c levels above the 95th percentile of the general population is still scarce and the impact of hyperalphalipoproteinemia (HALP) on cardiovascular risk continues to represent matter of debate in the medical literature. Some studies with specific populations indicated an increased cardiovascular risk associated with HALP. In addition, other reports identified groups of patients with marked hypoalphalipoproteinemia and longevity. Hence, there could be a dissociation between HDL-c levels and cardiovascular risk in certain populations, possibly due to dysfunctional HDL particles. The aim of this study was to investigate the role of HALP phenotype in determining cardiovascular risk; to compare the prevalence of subclinical cardiovascular disease, assessed by ultrasound measurement of Carotid Intima-Media Thickness (CIMT) among patients with HDL-c \geq 90mg/dL (HALP group) and patients with HDL-c currently considered normal (40-50mg/dL for men and 50-60mg/dL for women); and to evaluate HDL functionality in patients with HALP through the study of its composition, its cholesterol efflux capacity, and its anti-inflammatory and antioxidant activity; correlating those characteristics with the presence of subclinical cardiovascular disease assessed by CIMT, Pulse Wave Velocity (PWV) and Coronary Artery Calcification (CAC). To answer these questions, the present study was articulated into two arms: **Arm 1:** ELSA-Brasil study cohort analysis in order to assess HALP prevalence in a general population, defining demographic, anthropometric and metabolic profile of HALP individuals; and comparing the prevalence of subclinical vascular disease among HALP subjects with controls with normal HDL-c. **Arm 2:** Recruitment of 80 healthy volunteers with HALP to study the correlation between subclinical vascular disease and HDL functionality in this group. Our study led to four main conclusions: 1) markedly elevated HDL-c is associated with lower CIMT compared to the control group with normal HDL-c levels. Although individuals with HALP display a more favorable metabolic profile than subjects with normal HDL-c, the association between CIMT and HALP was independent of traditional risk factors, indicating that the lower prevalence of subclinical vascular disease in this group is only partially justified by the lower prevalence of cardiovascular risk factors; 2) Although HALP can be regarded as an atheroprotective phenotype, there are individuals with markedly elevated levels of HDL-c who develop cardiovascular disease. Our results indicate good correlation of the

three methods here adopted to study subclinical vascular disease among HALP patients: CIMT, VOP and CAC; 3) Traditional risk factors continue to exert their weight in determining cardiovascular risk in patients with HALP. Age, smoking, hypertension, hypertriglyceridemia and high levels of LDL-c were significantly associated with the presence of subclinical vascular disease among HALP individuals; 4) the assessment of the HDL composition and functionality in patients with HALP may allow to identify individuals specifically more susceptible to atherosclerosis. Our results indicate that, in particular, cholesterol efflux capacity, the anti-inflammatory activity of HDL, and triglyceride transfer capacity were independently associated with lower CIMT in HALP individuals, while higher levels of Apo A-IV were associated with a greater burden of subclinical cardiovascular disease.

Descriptors: HDL-cholesterol; hyperalphalipoproteinemia; HALP; atherosclerosis; cholesterol efflux; carotid intima-media thickness; coronary artery calcification; interleucina-6; TNF-alpha.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Relação entre HDL-colesterol (HDL-c) e risco cardiovascular

A hipercolesterolemia constitui um dos principais fatores de risco para a doença cardiovascular aterosclerótica, condição que representa, hoje, a principal causa de morte no mundo. Existe uma relação direta entre os valores de colesterol plasmático e o risco cardiovascular, comprovada por um sólido conjunto de evidências. Da mesma forma, a redução terapêutica, cada vez mais agressiva, do colesterol é uma das medidas mais efetivas para reduzir o risco cardiovascular e constitui uma das bases da moderna cardiologia preventiva.

Entretanto, diferentemente do que é observado com as outras lipoproteínas, os níveis de colesterol transportado na lipoproteína de alta densidade (HDL-c) guardam relação inversa com o risco cardiovascular (Miller & Miller, 1975). No estudo de Framingham, registrou-se um aumento de 10% na incidência de doença arterial coronariana (DAC) para cada diminuição de 4mg/dL no HDL-c (Gordon *et al.*, 1977), motivo pelo qual o HDL-c foi considerado um “fator de risco cardiovascular negativo”. Por outro lado, o *Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial* pontuou uma redução do risco de eventos em torno de 6% a cada aumento de 1mg/dL no HDL-c. O *Helsinki Heart Study*, que testou a gemfibrozila no contexto da prevenção primária, sugeriu uma redução de 2-3% na incidência de eventos coronarianos a cada aumento de 1% no HDL-c (Frick *et al.*, 1987). Este último achado foi posteriormente reforçado por uma análise que incluiu 4 estudos prospectivos e que registrou uma redução do risco cardiovascular de 2% em homens e 3% em mulheres a cada aumento de 1mg/dL no HDL-c (Gordon *et al.*, 1989).

Foi demonstrado que o HDL-c baixo é a alteração lipídica mais frequentemente observada em pacientes coronarianos, superando a

prevalência da hipercolesterolemia (Genest *et al.*, 1991). Da mesma forma, a relação “Colesterol total/HDL-c”, conhecido como “índice de Castelli” ou “índice aterogênico”, tem um valor claramente superior ao valor isolado do colesterol total ou do LDL-c na determinação do risco cardiovascular (Lewington *et al.*, 2007).

O estudo INTERHEART identificou a relação apoB/apoAI, além da LDL-c/HDL-c, como o mais acurado preditor de eventos cardiovasculares. Uma análise *post hoc* do estudo TNT apontou o HDL-c baixo como importante preditor de eventos, mesmo em pacientes tratados com estatinas e com níveis de LDL-c <70mg/dL (Barter *et al.*, 2007), reforçando o papel desta condição na determinação do chamado “risco residual”. Dados do estudo MIRACL (*Myocardial Ischaemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering*) sugerem que os valores de HDL-c, na apresentação dos pacientes com síndrome coronariana aguda, têm maior influência no prognóstico em curto prazo que os níveis de LDL-c (Schwartz *et al.*, 2001). Da mesma forma, demonstrou-se que a presença de HDL-c baixo aumenta significativamente o risco de reestenose após angioplastia coronária (Shah & Amin, 1992), assim como o risco de eventos após revascularização cirúrgica.

1.2 Estrutura da HDL e Metabolismo do HDL-c

1.2.1 Estrutura da HDL

A HDL (*High Density Lipoprotein*), lipoproteína de alta densidade, é a menor das lipoproteínas, sendo bastante heterogênea em termos de tamanho, forma, composição e carga de superfície (Schaefer *et al.*, 2014). Apresenta diâmetro entre 8 a 13 nm com densidade média ao redor de 1,063 g/L e grande variabilidade na sua constituição com valores medianos de colesterol-éster entre 10-20%, colesterol livre 5%, triglicérides 7%, fosfolipídeos 25% e apoproteínas entre 48-53%. Sua principal apoproteína é

a apo A, encontrando-se 70% de apo A-I e 20% de apo A-II, concentrações reduzidas de apo E, apo C e traços de apo A-IV. Quando observadas à microscopia eletrônica, as partículas de HDL podem aparecer tanto na forma esférica quanto discoidal. A HDL esférica possui um núcleo hidrofóbico composto principalmente por ésteres de colesterol e pequenas quantidades de triglicérides, circundados na superfície por uma camada hidrofílica de fosfolípidos, colesterol livre e envolvida por um anel de apoproteínas. A fração HDL humana separada por ultracentrifugação apresenta duas principais subpopulações: a HDL-2 e HDL-3 que parecem diferir no seu significado clínico. A HDL-2 é maior e tem menor densidade (entre 1,063 e 1,125 g/L) que a HDL-3 (entre 1,125 e 1,21 g/L). Quando separadas com base em suas cargas de superfície por meio de eletroforese em gel de agarose, as partículas de HDL exibem migração alfa, pré-alfa, pré-beta ou gama. As HDL alfa-migrantes são partículas esféricas e representam a maior proporção do HDL plasmático, incluindo as HDL-2 e HDL-3. As partículas nascentes de HDL, na sua forma monomolecular de apo A-I ou no formato discoidal contendo duas ou três moléculas de apo A-I agregadas pequenas quantidades de fosfolípidos e colesterol livre, apresentam migração pré-beta e pré-alfa. Uma subpopulação menor de gama-HDL tem sido descrita como partículas discoidais contendo apo-E e fosfolípidos (Rye & Barter, 2004).

1.2.2 Metabolismo do HDL-c

A fração HDL-c está ligada à função de remover o excesso de colesterol celular por meio do processo de *transporte reverso* pelo qual o colesterol é transportado de volta para o fígado, no qual pode ser removido do corpo (Schaefer *et al.*, 2014). Ao formular a teoria do transporte reverso, Glomset *et al.* descreveram o fluxo centrípeto de colesterol, mediado pelas HDLs, a partir do endotélio para o fígado. Este fluxo preveniria a formação da placa aterosclerótica ao evitar o depósito subendotelial do colesterol e

seria dependente das HDLs, justificando a associação inversa do HDL-c com o risco cardiovascular (Eisenberg, 1984). O primeiro passo do transporte reverso se inicia por meio do transportador ABCA1 na membrana celular, que se liga a HDL e facilita a remoção do colesterol em excesso das células periféricas, incluindo os macrófagos implicados diretamente na aterogênese. O transportador ABCA1 tem um papel central na regulação dos níveis de colesterol intracelular no fígado e no intestino, bem como, nas células periféricas, e proporciona uma chave para o conhecimento do mecanismo de transporte reverso do colesterol (Neufeld *et al.*, 2004). Seguindo o efluxo de colesterol, a partícula de apo A-I nascente é convertida em pré- β -HDL. Sob a contínua ação da LCAT (*Lecitina Colesterol Acil Transferase*), a pré- β -HDL desenvolve um núcleo de éster de colesterol, transformando-se a partícula discoide em partícula esférica madura, a α -HDL ou HDL3. Por sua vez, as HDL3 continuam a adquirir fosfolípidos e colesterol adicionais de membranas celulares e de componentes de superfície de lipoproteínas hidrolisadas, ricas em triglicérides (QM e VLDL), sendo convertidas em HDL2, que são maiores e mais ricas em colesterol que suas antecessoras. O transportador ABCG1 é responsável, em parte, pelo enriquecimento dessas partículas com colesterol (Schaefer, 2014). Existe um processo de troca de triglicérides provenientes dos QM e VLDL por ésteres de colesterol da HDL, mediado por uma glicoproteína denominada “proteína de transferência de éster de colesterol” (*Cholesteryl Ester Transfer Protein* – CETP). Assim, o transporte reverso do colesterol dos tecidos para o fígado através das partículas de HDL ocorre, diretamente, pela sua captura hepática por meio de receptores específicos tipo *scavenger* denominados SR-B1 ou, indiretamente, pela transferência de seu conteúdo de ésteres de colesterol a outras lipoproteínas também posteriormente capturadas no fígado. A concentração de HDL também é afetada pelo metabolismo das lipoproteínas ricas em apoB e triglicérides. Pela ação contínua da lipase lipoproteica (LLP) hidrolisando os quilomícrons sintetizados no intestino e as VLDL produzidas no fígado, são liberadas significativas quantidades de fosfolípidos e apolipoproteínas, transferidas

para as HDL. Assim, valores elevados de HDL-c podem refletir um rápido *clearance* plasmático de partículas ricas em triglicérides e vice-versa, resultando na frequente relação inversa entre as concentrações de triglicérides e HDL-c.

1.3 Determinantes das concentrações plasmáticas do HDL-c

Pelo menos, 40% da variabilidade inter-individual do HDL-c é geneticamente determinada (Knoblauch *et al.*, 2004). As concentrações plasmáticas de HDL-c variam fisiologicamente conforme sexo e faixa etária. Observa-se que os grupos com níveis mais altos de HDL-c são justamente aqueles de menor risco cardiovascular. Da mesma forma, espécies animais com pouca susceptibilidade à aterosclerose apresentam valores médios mais altos de HDL-c do que espécies mais propensas ao desenvolvimento da doença. Mulheres entre os 35 e 65 anos de idade apresentam concentrações médias de HDL-c, aproximadamente, 20% maiores que homens da mesma idade (WHO, 1988). Na infância, homens e mulheres têm níveis altos e similares de HDL-c. Com a puberdade, o HDL-c dos homens cai para níveis menores que o das mulheres e se mantém desta forma o resto da vida (Heiss *et al.*, 1980). No *BIRNH study*, que incluiu mais de 11.000 indivíduos livres de DAC entre os 25 e 74 anos de idade, observou-se que mulheres têm níveis médios mais altos de HDL-c que os homens, variando discretamente com a idade. Assim, mulheres de 25 anos apresentam concentrações médias de 55mg/dL, observando-se uma trajetória curvilínea com a idade, provavelmente relacionada ao contexto hormonal. Em torno dos 50 anos, observa-se o pico máximo de concentração de HDL-c (60mg/dL), com queda lenta e progressiva a partir deste momento. Desta forma, aos 70 anos, a concentração média de HDL-c é, novamente, de 55mg/dL (de Backer *et al.*, 1998). Por outro lado, aos 25 anos de idade, homens apresentam concentrações médias de 47mg/dL. Em média, estas concentrações sobem muito discretamente com a idade,

chegando a 50mg/dL aos 70 anos. É possível que a constatação do aumento da concentração média de HDL-c em homens idosos seja fruto de viés estatístico, pois indivíduos com HDL-c mais alto têm uma chance maior de chegar aos 70 anos de idade em relação a portadores de HDL-c baixo. O determinante maior das concentrações de HDL-c neste estudo foi o índice de massa corpórea (IMC). Mulheres com sobrepeso apresentam taxas de HDL-c similares às de homens magros. *Williams et al.* demonstraram que a perda ponderal em pacientes com sobrepeso aumenta o HDL-C, independentemente do nível de atividade física (*Williams et al.*, 1990). Outros determinantes de grande impacto foram o consumo de álcool, associado a aumento do HDL-c, e o tabagismo, associado à redução do HDL-c.

1.4 Dissociação entre concentração do HDL-c e função das HDLs em determinados subgrupos

Apesar da associação existente entre níveis moderadamente baixos de HDL-c (<35mg/dL) e maior incidência de eventos cardiovasculares, existem relatos de grupos de portadores de HDL-c baixo (hipoalfalipoproteinemia) que não apresentam aumento do risco cardiovascular (*Franceschini et al.*, 1980) e de portadores de HDL-c extremamente alto (hiperalfalipoproteinemia – HALP) nos quais foi documentado aumento do risco cardiovascular (*Matsuzawa et al.*, 1984). No primeiro grupo, destaca-se o caso da ApoA-I Milano, mutação da apoA-I inicialmente descrita por *Franceschini* e colaboradores em famílias da localidade italiana *Limone sul Garda* e caracterizada por níveis muito reduzidos de HDL-c, hipertrigliceridemia, aumento no tamanho médio das partículas HDL e associação com marcada longevidade. Estes relatos sugerem que, em determinados subgrupos, os níveis de HDL-c podem não apresentar a clássica relação inversa com a aterosclerose (*Barter & Rye*, 2006).

Por outro lado, existe consenso crescente de que a simples aferição do HDL-c pode não refletir de forma adequada a eficiência do transporte

reverso, pois trata-se de uma avaliação estática de um fluxo altamente dinâmico e dependente de múltiplas vias enzimáticas (Kontush *et al.*, 2004). Assim, medir o HDL-c não seria a forma mais adequada de avaliar o fluxo de colesterol mediado pelas HDLs. Além disso, foram descritas outras funções ateroprotetoras das HDLs, aparentemente independentes do colesterol nelas transportado. Estas funções incluem as funções antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa, assim como a preservação da função endotelial. Considerando que a simples medida do HDL-c não fornece uma adequada avaliação funcional da partícula, existe preocupação crescente com a possível dissociação quantidade/função em determinados subgrupos de pacientes, nos quais altos níveis de HDL-c poderiam ser marcadores de HDL disfuncional. Uma forma mais detalhada de avaliar o papel das HDLs na doença aterosclerótica é a subclassificação destas partículas em várias frações conforme tamanho e outras propriedades estruturais. Estas subpopulações poderiam desempenhar papéis específicos e representar, de forma mais consistente, o metabolismo do HDL-c, conforme sugerido por um estudo realizado em Judeus Ashkenazi com marcada longevidade (Barzilai *et al.*, 2003).

1.5 Hiperalfalipoproteinemia (HALP)

O termo hiperalfalipoproteinemia (HALP) é usado para descrever portadores de HDL-c marcadamente elevado. O termo refere-se ao característico padrão eletroforético (apo A-I e apo A-II, as principais apolipoproteínas da HDL, apresentam um padrão de mobilidade eletroforética tipo alfa) observado em portadores de HDL-c alto. Apesar do uso difuso do termo, não existem ainda diretrizes que definam claramente valores de corte a partir dos quais indivíduos com HDL-c alto devam ser considerados portadores de HALP. Os valores encontrados na literatura são, portanto, variáveis e algo arbitrários, dependendo do critério de inclusão aplicado pelo pesquisador. Esta heterogeneidade constitui um fator de

confusão e pode representar uma limitação na análise comparativa das evidências disponíveis. Os valores de corte mais frequentemente adotados são $> 90\text{mg/dL}$; $> 100\text{mg/dL}$ ou $>$ percentil 95 para cada população estudada. A HALP constitui um fenótipo lipídico ainda pouco estudado, determinado por fatores predominantemente genéticos, cujo impacto no risco cardiovascular não foi ainda definitivamente esclarecido. O determinante genético da HALP mais prevalente e mais bem estudado é o déficit da CETP (Hirano *et al.*, 1997). Outras alterações genéticas pontuadas como causas de HALP primária são o déficit da lipase hepática (LH); a hiperexpressão do receptor ABCA1; e o déficit funcional do receptor hepático SR-B1. A atividade da lipase lipoproteica (LLP) se correlaciona positivamente com os níveis de HDL-c (Kuusi *et al.*, 1987). Entretanto, até o momento, a atividade desta enzima não foi identificada como causa isolada de HALP, podendo desempenhar um papel coadjuvante. O impacto da HALP no risco cardiovascular parece ser dependente da variação metabólica subjacente e da via enzimática comprometida.

1.6 HALP e aterosclerose

Embora o HDL-c baixo ($<35\text{mg/dL}$) seja preditor de eventos cardiovasculares e algumas diretrizes recomendem níveis maiores que 50mg/dL em mulheres e que 40mg/dL em homens, não existem orientações específicas sobre qual seria o valor ideal de HDL-c a ser atingido (ATPIII). Existem evidências epidemiológicas e experimentais indicando que a simples aferição do HDL-c pode não ser a melhor forma de avaliar o transporte reverso e que, pelo contrário, altos níveis de HDL-c podem, em determinados casos, ser marcadores de HDL disfuncional e transporte reverso ineficiente. As evidências disponíveis a respeito são controversas.

1.6.1 Evidências epidemiológicas

A descrição de famílias japonesas com HDL-c muito elevado, secundário à deficiência da CETP, com casos de extrema longevidade e menor incidência de DAC (Saito, 1984; Brown *et al.*, 1989), suscitou interesse já na década de oitenta. Inazu *et al.* reuniram 11 destas famílias com valores de HDL-c entre 126-165 mg/dL, demonstrando uma única mutação pontual no gene da CETP (Inazu *et al.*, 1990). O aumento do HDL-c no grupo foi secundário ao aumento da fração HDL-2, fato que levou à redução da razão HDL3/HDL2. Outros achados foram o aumento da apo A-I e a redução do LDL-c. Em nenhuma destas famílias, foram observados casos de DAC precoce. Por outro lado, também foram relatados casos de HALP secundária a déficit da lipase hepática (LH), associados à opacificação corneana e DAC precoce (Matsuzawa *et al.*, 1984). Hirano e colaboradores avaliaram 201 portadores de HALP (HDL-c > 100mg/dL), 67% dos quais eram portadores de mutação comprovada no gene da CETP. A prevalência de DAC manifesta neste grupo foi de 9% para os homens e de 2% para as mulheres, sugerindo que a HALP é uma síndrome heterogênea, cujo impacto no risco vascular pode variar de antiaterogênico para pró-aterogênico, dependendo da causa metabólica do fenótipo (Hirano *et al.*, 2014).

1.6.2 Evidências experimentais: inibição farmacológica da CETP

A inibição farmacológica da CETP é a estratégia mais efetiva para aumentar as concentrações plasmáticas de HDL-c até o momento e tem sido alvo de intensa pesquisa. Entretanto, apesar do aumento consistente nos níveis de HDL-c, o impacto desta intervenção no risco cardiovascular ainda não foi esclarecido. Estudos experimentais em coelhos, alimentados com dieta rica em colesterol, que receberam um inibidor da CETP, o

JTT705, apresentaram aumento do HDL-c que, contudo, não levou à redução da aterosclerose da aorta (Huang *et al.*, 2002).

Quando testada em seres humanos, a inibição farmacológica da CETP por meio do *torcetrapib*, avaliada no estudo ILLUMINATE, levou a aumento da morbimortalidade, apesar do aumento de 72,1% nos níveis do HDL-c (Barter, 2007). Resultados análogos foram obtidos quando o *torcetrapib* foi testado para desfechos substitutos. O estudo ILLUSTRATE não conseguiu demonstrar impacto na velocidade de progressão da placa aterosclerótica avaliada por ultrassonografia intracoronária (Nissen *et al.*, 2007). No estudo RADIANCE 1, não houve benefício na evolução da espessura íntimo-medial da carótida (EIMC) avaliada por ultrassonografia em portadores de hipercolesterolemia familiar (Kastelein *et al.*, 2007). Da mesma forma, o estudo RADIANCE 2 não mostrou benefício em portadores de dislipidemia mista (Bots *et al.*, 2007). Além disso, verificou-se que, apesar do aumento no HDL-c, a inibição da CETP não incrementou o transporte reverso, assim como sugerido pela taxa de excreção fecal de colesterol, que não aumentou com a administração da droga (Brousseau *et al.*, 2005). Contudo, os resultados destes estudos foram atribuídos a características próprias do *torcetrapib* (aumento na pressão sistólica média de quase 5 mmHg ou a formação de um HDL disfuncional) e não necessariamente ao efeito da inibição da CETP (Rader, 2007). Ausência de benefício também ocorreu, recentemente, com outros inibidores da CETP, o *dalcetrapib* e o *evacetrapib* (Tariq *et al.*, 2014).

1.7 Métodos de avaliação de doença vascular subclínica

A EBT ou tomografia ultrarrápida (Agatston *et al.*, 1990) e a tomografia computadorizada de múltiplos detectores – TCMD (Greenland *et al.*, 2004) – são capazes de determinar a calcificação das artérias coronárias (CAC). Estudos angiográficos com ultrassom coronário e estudos anatomopatológicos demonstraram que a CAC se correlaciona com a carga

ou quantidade de placas ateroscleróticas (Achenbach *et al.*, 1998). A quantidade de placas ateroscleróticas, por sua vez, se associa diretamente com o risco de eventos coronários (Mollet *et al.*, 2004). Estudos em que a CAC foi avaliada pela tomografia computadorizada demonstram que o escore de cálcio é marcador independente de risco de eventos coronários (Silverman *et al.*, 2014).

Em 1998, a TCMD foi introduzida na prática clínica, possibilitando a aquisição simultânea de 4 a 320 cortes. 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 em comparação à tomografia de corte único (Baumgart *et al.*, 1997).

A medida da Espessura Íntimo-Medial da Carótida (EIMC) é definida como a distância entre a interface lúmen-íntima e a interface média-adventícia. Atualmente, pode ser aferida por aparelhos de ultrassom de alta resolução de modo B. Alguns estudos demonstraram que maiores valores de EIMC estão relacionados com a prevalência de DAC e com eventos clínicos coronários. A relação entre EIMC e DAC foi configurada pelos dois maiores estudos epidemiológicos publicados: o *Atherosclerosis Risk in Communities Study* (ARIC) e o *Cardiovascular Health Study*, ambos demonstrando que um aumento da EIMC estava associado com aumento do risco de DAC (Robertson *et al.*, 2012). Embora a EIMC possa ocorrer devido a aumento da espessura da camada média vascular, ela é considerada como um marcador substituto da presença do processo aterosclerótico.

A velocidade de onda de pulso (VOP) é um método não invasivo para determinar, mais precisamente, as propriedades elásticas da aorta e das grandes artérias. Esse método tem mostrado associação com eventos cardiovasculares e, também, com aterosclerose coronária (Bruno *et al.*, 2014).

1.8 Justificativa

Embora o HDL-c baixo esteja associado ao desenvolvimento de doença aterosclerótica e as evidências epidemiológicas sugiram se manter valores acima de 40mg/dL para os homens e de 50mg/dL para as mulheres, não existem, até o momento, orientações específicas quanto ao valor ideal de HDL-c a ser atingido, nem quanto à melhor forma de atingir estes níveis. Esta lacuna se deve à ausência de evidências conclusivas de proteção cardiovascular acima dos níveis habituais de HDL-c, assim como, à escassez de medidas farmacológicas com efeito isolado no HDL-c e com benefício cardiovascular bem estabelecido (Tariq *et al.*, 2014).

Portadores de HALP oferecem a oportunidade de avaliar o impacto do aumento isolado do HDL-c sobre o risco cardiovascular. Ainda não se sabe, claramente, se a HALP representa uma condição aterogênica ou ateroprotetora. Da mesma forma, há controvérsia quanto ao papel da CETP, cuja atividade reduzida parece ser a causa mais prevalente de HALP, na homeostase do colesterol. Comparar a prevalência de aterosclerose subclínica entre portadores de HALP e indivíduos controle, correlacionando estes dados com a avaliação funcional da HDL, poderá contribuir na elucidação destes pontos.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

- a) Comparar a prevalência de doença cardiovascular subclínica, avaliada por meio da quantificação ultrassonográfica da EIMC, entre portadores de HDL-c > 90mg/dL (grupo HALP) e portadores de concentrações de HDL-c atualmente consideradas normais (entre 40 e 50mg/dL para os homens, e entre 50 e 60mg/dL para as mulheres).

- b) Avaliar características e função da HDL em indivíduos portadores de HALP por meio do estudo de sua composição; de sua capacidade de efluxo de colesterol; e de sua atividade anti-inflamatória e antioxidante; correlacionando estas características com a presença de doença cardiovascular subclínica avaliada por meio da determinação da EIMC, da velocidade de onda de pulso e da presença de calcificação coronariana avaliada pela TCMD.

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Desenho geral do estudo

O presente estudo inclui dois braços paralelos e complementares:

- **Braço 1: Análise da coorte do estudo ELSA (Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto)** com o objetivo de estudar o perfil demográfico, antropométrico e metabólico dos portadores de HALP; e comparar a prevalência de doença cardiovascular subclínica deste grupo com controles da mesma coorte com níveis normais de HDL-colesterol.
- **Braço 2: Recrutamento de 80 indivíduos com valores de HDL-colesterol > 90mg/dL** para avaliação da associação entre presença de doença vascular subclínica, e composição e função das partículas de HDL neste grupo.

3.2 Desenho do Braço 1

3.2.1 A coorte do ELSA-Brasil

O Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto, ELSA-Brasil, é uma coorte cujo objetivo é a avaliação do desenvolvimento de doenças crônicas em uma população brasileira, especialmente diabetes mellitus e doenças cardiovasculares, ao longo de um acompanhamento de longo prazo. Trata-se de um estudo multicêntrico, fruto da colaboração das universidades federais de Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e Fundação Oswaldo Cruz. O Estudo recrutou um total de 15.105 indivíduos entre os 35 e os 74 anos de idade entre 2008 e 2010. Como parte

da extensa avaliação realizada, todos os participantes do estudo realizaram avaliação da espessura da íntima-média carotídea e dosagem do perfil lipídico, além da aferição de variáveis epidemiológicas, demográficas, antropométricas e laboratoriais. Os detalhes da coorte do ELSA-Brasil foram descritos e publicados previamente (Schmidt *et al.*, 2014).

3.2.2 Avaliações realizadas na coorte do ELSA-Brasil para fins do presente estudo

Para fins do presente estudo, foram realizadas duas análises distintas:

- Uma primeira análise exploratória da coorte com o intuito de estudar a distribuição de variáveis demográficas, epidemiológicas, antropométricas e laboratoriais por quintis de HDL-c, avaliando sua associação com a presença de doença vascular subclínica avaliada por meio da aferição da EIMC.
- Uma segunda análise comparando diretamente os dois grupos de interesse para o presente estudo: aqueles com HDL-c em valores considerados normais pelas diretrizes vigentes (HDL-c entre 40 e 50mg/dL para homens, e entre 50 e 60mg/dL para mulheres), e aqueles com fenótipo HALP (HDL-c \geq 90mg/dL para ambos os sexos). A comparação dos dois grupos incluiu a prevalência de doença vascular subclínica (avaliação ultrassonográfica da EIMC e avaliação tomográfica do escore de calcificação coronariana), e as variáveis epidemiológicas, demográficas, antropométricas e laboratoriais potencialmente relacionadas à sua presença.
- Finalmente, procedeu-se a análise de regressão linear múltipla para definir os determinantes independentes da presença de doença vascular subclínica no grupo HALP.

3.2.3 Amostragem para o estudo

A partir de 10.943 participantes do estudo ELSA-Brasil com medidas válidas de EIMC para ambas as artérias carótidas comuns, excluímos 415 (3,8%) indivíduos com doença cardiovascular prévia (Infarto do miocárdio, AVC ou revascularização) e 6 (<0,1%) por falta de dados sobre antecedentes de doença cardiovascular. Excluímos também 727 (6,6%) indivíduos que relataram uso excessivo de álcool (> 210 g por semana para homens, > 140 g por semana para mulheres) e 12 (0,1%) por falta de dados sobre consumo de bebidas alcoólicas. Quatro participantes foram excluídos por falta de dados sobre o HDL-c. Portanto, a amostra final para o presente estudo incluiu 9.779 participantes do estudo ELSA-Brasil. Para estudar a associação entre HALP e doença vascular subclínica, consideramos os dados dos seguintes subgrupos:

- a) 36 homens com HDL-c > 90mg/dL;
- b) 228 mulheres com HDL-c > 90mg/dL;
- c) 1.580 homens com HDL-c entre 40 e 49 mg/dL;
- d) 1.646 mulheres com HDL-c entre 50 e 59 mg/dL.

Os subgrupos (a) e (b) conformaram o “grupo HALP”; os subgrupos (c) e (d) compuseram o “grupo HDL-c Normal”. Indivíduos com HDL-c baixo foram excluídos da presente análise.

3.2.4 Análise estatística

As variáveis categóricas foram descritas por frequência e percentagem (N,%), e comparadas pelo teste do qui quadrado. As variáveis contínuas foram descritas como medias \pm desvio padrão ou medianas [intervalo interquartil] e comparadas entre os grupos usando ANOVA ou o teste de Kruskal-Wallis, quando aplicável. Foram criados 3 modelos lineares para

estudar a associação entre EIMC e HDL-c por quintis e no grupo HALP: um modelo bruto; um modelo ajustado por sexo, idade e raça; um modelo com ajuste completo por idade, sexo, raça, diagnóstico de hipertensão, diabetes, tabagismo, índice de massa corpórea, relato de atividade física moderada/intensa e uso de hipolipemiantes. As análises foram realizadas por meio do *R software version 3.2.0*. A significância foi definida como $p < 0,05$.

3.3 Desenho do Braço 2

3.3.1 Screening e recrutamento dos portadores de HALP

Foram recrutados 80 voluntários do sexo masculino e feminino, sem manifestação prévia de doença cardiovascular, com idades entre 45 e 75 anos, e com duas ou mais aferições prévias do perfil lipídico revelando HDL-c ≥ 90 mg/dL (grupo HALP). O desenho geral do Braço 2 do estudo encontra-se representado na Figura 1.

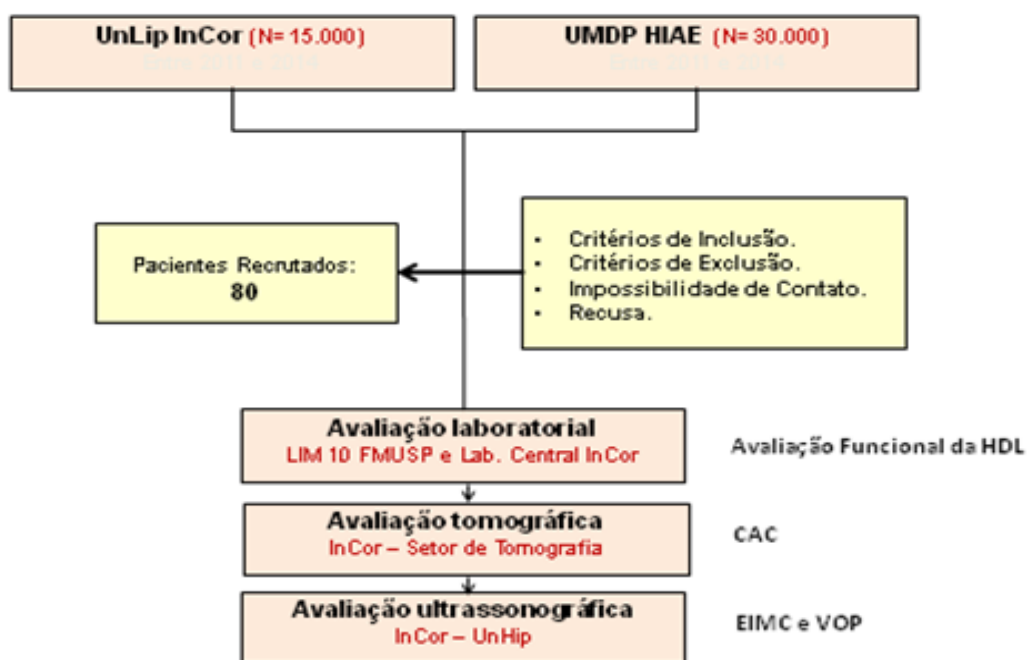


Figura 1 – Desenho geral do Braço 2 do estudo

Adotou-se, no presente estudo, o valor de 90mg/dL como *cut-off* para definição de caso de HALP, considerando que este valor é superior ao percentil 95 na curva de distribuição da concentração média do HDL-c na população geral (Schaefer *et al.*, 2014). A inclusão no estudo se deu de forma voluntária após a assinatura de termo de consentimento informado. Os candidatos foram recrutados a partir de *screening* eletrônico da base de dados laboratoriais da Unidade de Check-Up do Hospital Israelita Albert Einstein e da Unidade Clínica de Lípidos do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP), aplicando-se como filtro a presença de duas aferições em momentos distintos de HDL-c acima de 90mg/dL. Foram aplicados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

Critérios de Inclusão:

- Idade entre 45-75 anos;
- HDL-c >90mg/dL em 2 ou mais aferições.

Critérios de Exclusão:

- Uso de hipolipemiantes;
- Diabetes mellitus;
- Etilismo;
- Gestação;
- Doença coronariana manifesta ou conhecida;
- Doença hepática ativa;
- Impossibilidade de realização de TCMD.

3.3.2 Avaliação dos portadores de HALP

Os indivíduos recrutados conforme inciso anterior foram submetidos à avaliação clínica, laboratorial, ultrassonográfica e tomográfica conforme protocolo descrito a seguir:

a) Avaliação clínica:

Os pacientes responderam a um questionário sobre risco cardiovascular e foram examinados para aferição da pressão arterial sistêmica conforme orientação do VII JNC (Chobanian *et al.*, 2003), e para mensuração antropométrica (peso corporal total, altura, cintura e quadril), conforme padrão da Organização Mundial da Saúde.

b) Avaliação laboratorial:

Realizou-se uma única coleta de sangue, em jejum de 12 horas, na hora da inclusão no protocolo, para coleta das seguintes alíquotas:

- 20 mL de sangue em tubo Falcon de 50mL contendo EDTA;
- 05 mL de sangue em tubo de hemograma;
- 05 mL de sangue em tubo seco.

A avaliação funcional da HDL foi conduzida no Laboratório de Investigação Médica (LIM 10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), incluindo:

- Tamanho das lipoproteínas (HDL2, HDL3 e LDL);
- Atividade antioxidante das HDL;
- Atividade anti-inflamatória das HDL;
- Medidas de composição (após A-I e A-II, colesterol total, colesterol livre, colesterol éster, triglicérides e fosfolípides);
- Capacidade de efluxo de colesterol.

A avaliação bioquímica basal dos pacientes recrutado foi realizada no laboratório central do InCor, incluindo dosagem de: colesterol total e frações, transaminases, bilirrubina total e frações, gama GT, creatinina, ureia, PCR-

us, TSH, glicemia de jejum, hemoglobina glicosilada, insulinemia e hemograma.

- **Isolamento das lipoproteínas:**

As lipoproteínas (LDL e subfrações de HDL2 e HDL3) foram isoladas do plasma, por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade (Havel *et al.*, 1955). Todas as lipoproteínas foram dialisadas contra solução de tampão fosfato (PBS), contendo EDTA, pH = 7,4, esterilizadas em filtro 0,22 μm e estocadas a -70°C .

- **Avaliação do efeito inibitório da HDL sobre a oxidação das LDL:**

Lipoproteínas de baixa densidade (LDL), isoladas do plasma, foram dialisadas contra PBS sem EDTA e, a seguir, diluídas para obter uma concentração de 40 mg de proteína de LDL em 500 μL de H₂O desionizada. Logo após, foram adicionadas 80 μg de proteína de HDL3 ou HDL2, seguidas de 1mL de solução de CuSO₄ 10 mmol/L (concentração final), a 37°C. O tubo branco consistiu de incubação de LDL e cobre, apenas. A cinética de formação de dienos conjugados foi determinada pela variação na absorbância, monitorada, continuamente, em 234 nm, durante 4h, em intervalos de 3 min. Foi calculado o tempo (min) de resistência das LDL à oxidação ("lag time") entre o início da reação e a intersecção do tempo com a reta extrapolada da fase de propagação; e a razão máxima de formação de dienos conjugados, determinada pela absorbância máxima/min (Esterbauer & Zollner, 1989). A Figura 2 apresenta a representação gráfica do modelo experimental aqui descrito.

ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE DA HDL

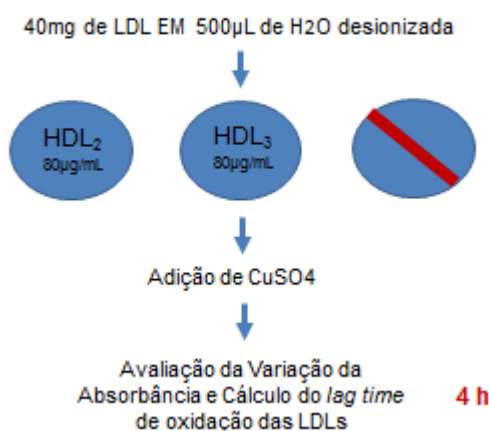


Figura 2 – Representação gráfica do modelo experimental para avaliação do efeito inibitório da HDL sobre a oxidação das LDLs

O "lag time" de oxidação das LDL representa o tempo em que estas lipoproteínas resistem à oxidação. Ele é determinado pelo ponto no qual o incremento linear da absorvância cruza com a linha do tempo. Quanto maior o "lag time", maior é o tempo que essas LDL resistem à oxidação. Já a razão máxima de formação de dienos conjugados é representada pela divisão da absorvância máxima pelo tempo em que ela ocorreu. Quanto menor este valor, mais lenta e a produção de dienos conjugados em LDL.

- **Avaliação da função anti-inflamatória das HDL:**

Macrófagos foram obtidos por meio de injeção de PBS contendo antibióticos no peritônio de camundongos da linhagem suíça. Após centrifugação a 4°C (1.000 rpm), o botão celular foi ressuspenso em meio RPMI contendo soro fetal bovino 10%. As células foram incubadas em placas de cultura com 24 cavidades de forma a manter a concentração de $0,5 \times 10^6$ células por cavidade, e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de CO₂ 5%. Após remoção das células não aderidas, os macrófagos foram incubados com DMEM contendo 0,1% de albumina isenta em ácidos graxos acrescidos com 50 µg de LDL acetilada/mL de meio e 100 µg de proteína/mL de HDL, por 48 h. A seguir, as células foram lavadas com PBS

contendo albumina isenta em ácidos graxos e incubadas com lipopolissacarídeos (1µg/mL de DMEM) durante 24 h. O meio de cultura foi coletado e congelado a -80°C para determinação, por ELISA, da concentração de citocinas e quimiocinas inflamatórias (TNFalfa, IL-6). Vide Figura 3.

ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA HDL

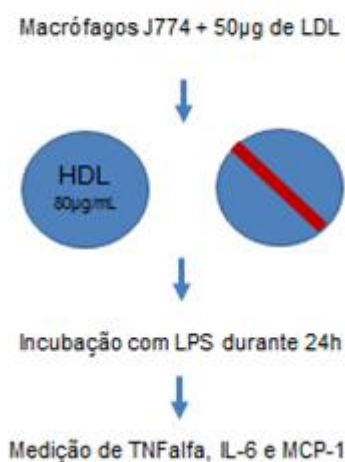


Figura 3 - Representação gráfica do modelo experimental para avaliação da função anti-inflamatória das HDLs

- **Avaliação da capacidade de efluxo de colesterol:**

Para avaliação da capacidade de efluxo de colesterol, foram usadas células J774, derivadas de macrófagos murinos, incubadas com colesterol radiomarcado durante 24 horas. Tais células foram, posteriormente, expostas durante 4 horas ao soro precipitado (depletado de apoB); à fração HDL2; e à fração HDL3 dos portadores de HALP participantes do estudo, para posterior aferição da radioatividade residual expressa em porcentagem, seguindo-se metodologia previamente descrita (Khera *et al.*, 2011). O modelo experimental adotado é representado graficamente na Figura 4.

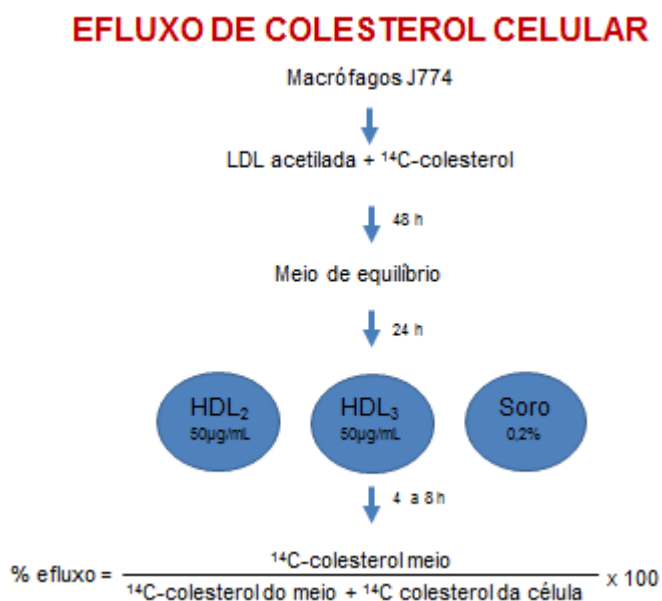


Figura 4- Representação gráfica do modelo experimental para avaliação da capacidade de efluxo das HDLs

- **Avaliação Transferências de lípides marcados de uma nanoemulsão lipídica rica em colesterol para as HDL**

Para avaliação da transferência de colesterol livre, colesterol esterificado, triglicérides e fosfolípides à partícula de HDL, adotou-se método previamente desenvolvido e descrito por nosso grupo (LoPrete *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2011). O método avalia a capacidade acceptora da HDL em relação aos lípides estudados. Para tal fim, uma nanoemulsão lipídica doadora radiomarcada é incubada com o plasma do indivíduo durante uma hora a 37°C. Posteriormente, a nanoemulsão e as lipoproteínas contendo apoB são precipitadas. Em seguida, a radioatividade do remanescente é aferida e o resultado é expressado em porcentagem da radioatividade total inicialmente incubada.

c) Avaliação ultrassonográfica.

- **Determinação da distensibilidade da aorta pela medida da velocidade de onda de pulso (VOP):**

A medida da VOP (m/s) é realizada a partir da base da onda de pressão obtida por captadores externos colocados sobre dois pontos conhecidos da árvore arterial e calculado como a distância entre os dois pontos de medida divididos pelo tempo percorrido entre os dois pontos. A medida automática foi realizada pelo aparelho Complior (Gonesse, France), já validado e utilizado em diversos estudos. A VOP foi avaliada em dois diferentes territórios arteriais: carótido-femoral e carótido-radial. Cada onda pulsátil aparece em tempo real na tela do computador, e o aparelho determina, pela tangente à fase ascendente inicial da onda de pressão, o início da onda nos dois locais, e deduz, em função da distância medida, a velocidade de onda de pulso. Para obter o valor da velocidade de onda de pulso, serão selecionadas, pelo menos, dez curvas para análise.

- **Avaliação funcional e anatômica da artéria carótida pelo método *echo-tracking*:**

As propriedades funcionais e anatômicas da carótida direita foram avaliadas por um sistema ultrassonográfico pulsátil tipo “echotracking” (Wall-Track System2, PIE MEDICAL, Maastricht, Netherlands) desenvolvido para medir os movimentos das paredes de grandes artérias superficiais a partir da localização pelo modo B da ecografia vascular convencional. Foram medidos diâmetro da artéria, EIMC (mm) e percentagem de distensão batimento a batimento. A complacência, a distensibilidade e o módulo elástico da artéria, além da massa vascular, foram calculados a partir destes parâmetros e das medidas da pressão de pulso carotídeo obtidas pela tonometria de aplanção.

d) Avaliação tomográfica:

A TCMD foi realizada conforme os protocolos de aquisição vigentes na instituição na ocasião do estudo. Os exames tomográficos foram realizados em aparelho de 64 colunas de detectores (*Aquilion64TM - ToshibaTM Medical Systems Corporation*, Otawara, Japão) no Instituto do Coração (InCor – HC/FMUSP). Uma vez orientados quanto ao exame e adequadamente posicionados na mesa da TCMD, os pacientes foram monitorizados eletrocardiograficamente para sincronização da aquisição da imagem e acompanhamento da frequência cardíaca durante o exame. As imagens foram obtidas com espessura de corte de 3,0 mm e campo de visão de 200 a 220 mm, para aquisição de imagens axiais do tórax, incluindo toda a área cardíaca, permitindo-se a visualização das artérias coronárias e da presença de calcificação em sua topografia. A aquisição das imagens foi realizada durante o período diastólico determinado por meio da frequência cardíaca do paciente. O escore de cálcio total foi obtido para cada paciente em *workstation VitreaTM 2, versão 3,5 – Vital Images Inc*, Plymouth, MN, EUA. Para avaliação das imagens de escore de cálcio, utilizamos a medida do escore de Agatston, amplamente utilizada na literatura, e com forte correlação com doença coronária.

3.3.3 Análise estatística

As variáveis contínuas foram comparadas pelo teste t de Student ou de Mann-Whitney no caso de distribuição não Gaussiana; as variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fisher ou χ^2 . Os grupos foram comparados por análise de variância de medidas repetidas.

A associação dos parâmetros com a doença vascular subclínica foi feita por análise multivariada utilizando-se o *software* SPSS. Devido a sua distribuição Gaussiana e pelo fato de poder ser utilizada como variável contínua, a EIMC foi escolhida como parâmetro de estudo para o modelo

multivariado em ambos os estudos I e II. Não foram feitos estudos de análise multivariada para a CAC ou VOP. A significância foi aceita com $p < 0,05$.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Resultados Braço 1

4.1.1 Análise exploratória por quintis de HDL-c

Para fins desta primeira análise, a população total da coorte do ELSA-Brasil foi segmentada por quintis de HDL-c, da seguinte forma: Q1 (HDL-c ≤ 44 mg/dL; N=1.863); Q2 (HDL-c 45-50mg/dL; N=1.807); Q3 (HDL-c 51-57mg/dL; N=2.004); Q4 (HDL-c 58-67mg/dL; N=2.052); Q5 (HDL-c ≥ 68 mg/dL; N=2.053). A Tabela 1 mostra o perfil epidemiológico, demográfico, antropométrico e laboratorial dos grupos considerados. A prevalência de fatores de risco cardiovascular tradicionais, tais como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, tabagismo, sobrepeso e obesidade, diminui na medida em que o valor médio de HDL-c vai aumentando. Indivíduos no Q5 são mais fisicamente ativos e apresentam níveis menores de pressão arterial, cintura abdominal, índice de massa corpórea, glicemia, trigliceridemia, hemoglobina glicada e proteína C-reativa de alta sensibilidade.

A prevalência da doença vascular subclínica, avaliada pelo grau de calcificação coronariana e pela EIMC, manteve proporção linear inversa aos níveis de HDL-c nos cinco grupos considerados, assim como evidenciado nas Figuras 5 e 6.

Tabela 1 - Perfil demográfico, clínico e laboratorial por quintis de HDL-c na coorte do estudo ELSA

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	P
	N= 1.863	N= 1.807	N= 2.004	N= 2.052	N= 2.053	
HDL-c (mg/dL)	≤ 44	45-50	51-57	58-67	≥68	
Sexo (% homens)	1.386 (74,4%)	970 (53,7%)	832 (41,5%)	586 (28,6%)	319 (15,5%)	<0,001
Idade (média, DP)	50,6 ± 9,0	50,8 ± 9,0	51,5 ± 8,8	52,0 ± 8,9	52,7 ± 9,0	<0,001
Não tabagistas (N, %)	980 (52,6%)	1.070 (59,2%)	1.181 (58,9%)	1.278 (62,3%)	1.280 (62,3%)	<0,001
Ex-Tabagistas (N, %)	591 (31,7%)	515 (28,5%)	573 (28,6%)	545 (26,6%)	576 (28,1%)	
Tabagistas (N, %)	291 (15,6%)	222 (12,3%)	250 (12,5%)	229 (11,2%)	197 (9,6%)	
Diabetes (N, %)	483 (25,9%)	398 (22,0%)	367 (18,3%)	289 (14,1%)	217 (10,6%)	<0,001
Hipertensão (N, %)	692 (37,2%)	632 (35,0%)	679 (33,9%)	588 (28,7%)	502 (24,5%)	<0,001
Atividade Física (N, %)	402 (22,0%)	379 (21,5%)	436 (22,1%)	488 (24,2%)	527 (26,0%)	0,003
PAS (média, DP)	122,6 ± 15,6	120,5 ± 16,0	119,7 ± 16,4	118,5 ± 16,5	117,5 ± 16,5	<0,001
PAD (média, DP)	77,5 ± 10,3	76,4 ± 10,1	75,6 ± 10,5	74,5 ± 10,3	73,4 ± 10,5	<0,001
Obesidade Abd. (N, %)	704 (37,8%)	699 (38,7%)	742 (37,0%)	636 (31,0%)	519 (25,3%)	<0,001
IMC (Média, DP)	28,1 ± 4,4	27,7 ± 4,7	27,1 ± 4,7	26,3 ± 4,5	25,1 ± 4,3	<0,001
CT (Média, DP)	194 ± 37	209 ± 38	215 ± 40	220 ± 41	229 ± 40	<0,001
LDL-c (média, DP)	120 ± 31	132 ± 33	135 ± 33	135 ± 34	131 ± 35	<0,001
TG (mediana; [IIQ])	152 [108-215]	129 [92-180]	114 [85-157]	99 [74-134]	85 [64-113]	<0,001
Hipolipemiante (%)	242 (13,0%)	200 (11,1%)	255 (12,7%)	262 (12,8%)	172 (8,4%)	<0,001
GJ (média, DP)	116 ± 32	113 ± 31	110 ± 27	107 ± 24	104 ± 20	<0,001
HbA1C (%)	5,6 ± 1,1	5,5 ± 1,0	5,5 ± 0,9	5,4 ± 0,8	5,3 ± 0,8	<0,001
PCR-us (mediana; [IIQ])	1,7 [0,9 – 3,6]	1,6 [0,8 – 3,8]	1,4 [0,7 – 3,3]	1,3 [0,7 – 2,8]	1,1 [0,6 – 2,8]	<0,001
EIMC (média ± DP)	0,839 ± 0,217	0,826 ± 0,212	0,818 ± 0,206	0,791 ± 0,192	0,771 ± 0,175	<0,001

Legenda: PCR-us: proteína C-reativa ultrasensível; HbA1C: hemoglobina glicada; GJ: glicemia de jejum; TG: triglicerídeos; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; CT: colesterol total; IMC: índice de massa corpórea; PAD: pressão arterial diastólica; PAS: pressão arterial sistólica; DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil.

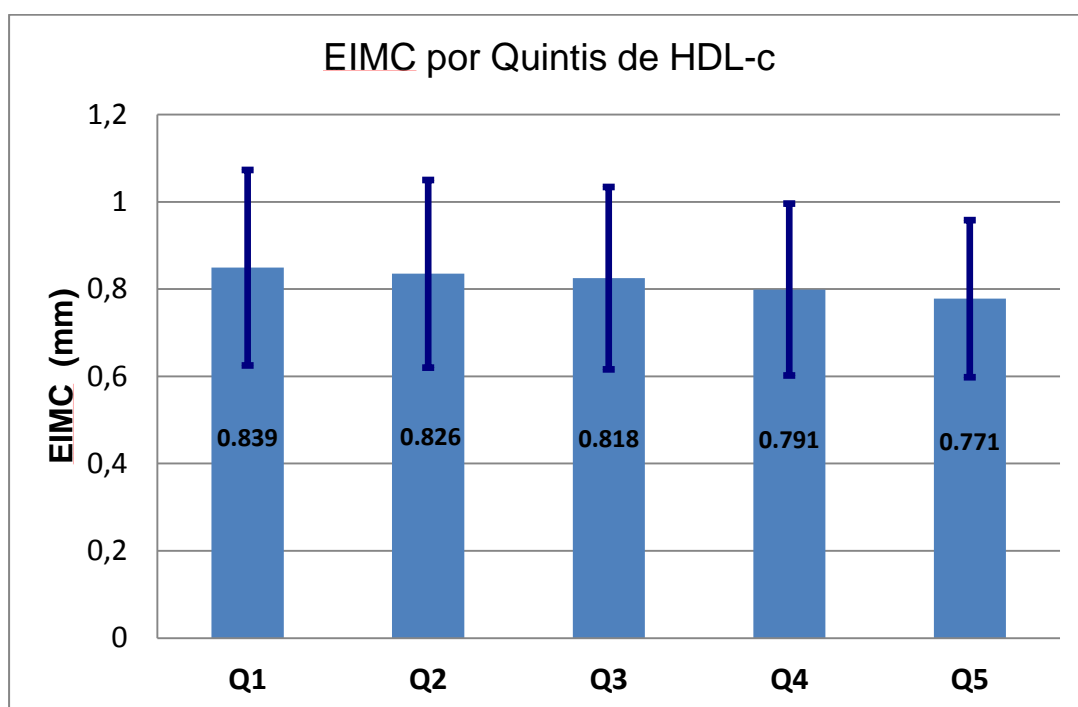


Figura 5 - EIMC por quintis de HDL-c

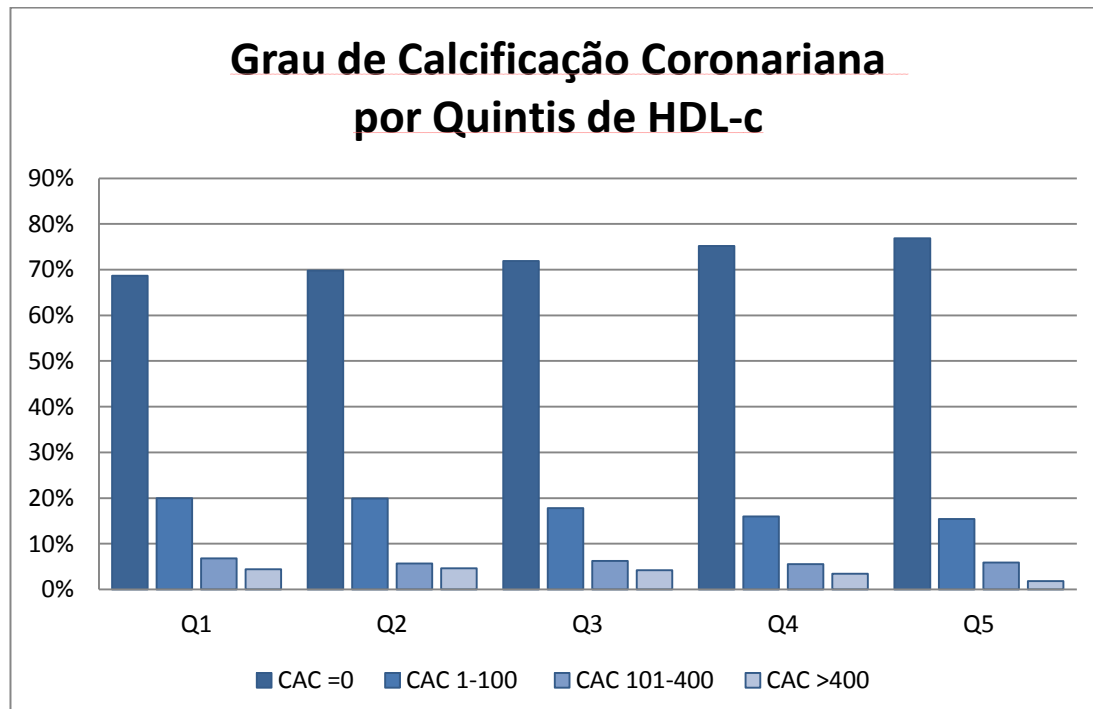


Figura 6 - Grau de calcificação coronariana por quintis de HDL-c

4.1.2 Comparação do “Grupo com HDL-c normal” com o “Grupo HALP”

A partir da coorte do ELSA-Brasil, foram considerados 3.226 indivíduos com HDL-c normal (40-50 mg/dL para homens e 50-60mg/dL para mulheres) e 264 indivíduos com fenótipo HALP (HDL-c \geq 90 mg/dL). A média de HDL-c, no grupo “HDL normal”, foi de 50 mg/dL, enquanto no “grupo HALP”, foi de 101 mg/dL. As características epidemiológicas, demográficas, antropométricas e laboratoriais dos dois grupos são apresentadas na Tabela 2. A idade média foi maior no “grupo HALP” que no “grupo HDL normal” (54,5 \pm 9,6 *versus* 51,1 \pm 8,8, $p < 0,001$). Assim como antecipado na análise por quintis, a porcentagem de indivíduos do sexo masculino foi significativamente inferior no grupo HALP (13,6% *versus* 49%, $p < 0,001$) e portadores de HALP apresentaram prevalência significativamente menor de fatores de risco cardiovascular tradicionais, apresentando um perfil de saúde globalmente mais saudável que os indivíduos do grupo controle. Hipertensão arterial (24,6% *versus* 32,7%, $p = 0,009$), diabetes mellitus (10,2% *versus* 20,4%, $p < 0,001$) e obesidade abdominal (18,6% *versus* 37,6%, $p < 0,001$). Da mesma forma, os níveis médios de LDL-c foram discretamente, mas significativamente, inferiores (127 \pm 36 mg/dl *versus* 132 \pm 32 mg/dL). Apesar da maior faixa etária do grupo HALP, a EIMC foi significativamente menor que no grupo controle (0,789 \pm 0,189 *versus* 0,818 \pm 0,200, $p = 0,002$), denotando menor grau de doença vascular subclínica no grupo HALP (Figura 7). Dos portadores de HALP, 87 foram submetidos à avaliação tomográfica do escore de calcificação coronariana. A Figura 8 mostra o nível de calcificação coronariana do grupo HALP em comparação ao grupo com HDL-c normal. Em modelo de regressão linear múltipla (Tabela 3) ajustado por idade, sexo, raça, índice de massa corpórea, nível de atividade física, presença de hipertensão arterial, diabetes e tabagismo, assim como pelo uso de hipolipemiantes, a diferença na EIMC entre os dois grupos avaliados se manteve significativa.

Tabela 2 - HALP *versus* HDL-c Normal: Variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais

Variáveis	HDL Normal	HALP	P
	HDL 40-49mg (H) 50-59mg (M) (N= 3.226)	HDL > 90mg para homens e mulheres (N= 264)	
Sexo (% homens)	1.580 (49%)	36 (13,6%)	<0,001
Idade (média, DP)	51,1 ± 8,8	54,5 ± 9,6	<0,001
Branco (N, %)	1.830 (57,3%)	148 (56,7%)	0,030
Pardos (N, %)	795 (29,4%)	50 (19,2%)	
Negros (N, %)	447 (14,0%)	48 (18,4%)	
Outras raças (N, %)	120 (3,8%)	15 (5,7%)	
Não Tabagistas (N, %)	1.851 (57,4%)	165 (62,5%)	0,271
Tabagistas (N, %)	420 (13,0%)	30 (11,4%)	
Ex-Tabagistas (N, %)	954 (29,6%)	69 (26,1%)	
Diabetes (N, %)	657 (20,4)	27 (10,2)	<0,001
Hipertensão (N, %)	1.054 (32,7)	65 (24,6)	0,009
Atividade física (N, %)	719 (22,7%)	84 (32,1%)	0,001
PAS (média, DP)	119,7 ± 16,0	120,1 ± 17,8	0,701
PAD (média, DP)	75,8 ± 10,4	74,0 ± 11,8	0,007
Obesidade abdominal (N, %)	1.214 (37,6%)	49 (18,6%)	<0,001
IMC (média, DP)	27,4 ± 4,6	24,2 ± 3,9	<0,001
CT (média, DP)	210 ± 38	245 ± 37	<0,001
LDL-c (média, DP)	132 ± 32	127 ± 36	0,023
TG (mediana; [IIQ])	124 [91-176]	78 [61-102]	<0,001
Hipolipemiante (N; %)	405 (12,6%)	16 (6,1%)	0,003
GJ (média, DP)	112 ± 29	103 ± 22	<0,001
HbA1C (%)	5,5 ± 0,9	5,3 ± 0,7	0,005
PCR-us (mediana; [IIQ])	1,5 [0,8 – 3,4]	1,2 [0,5-3,0]	<0,001

Legenda: PCR-us: proteína C-reativa ultrasensível; HbA1C: hemoglobina glicada; GJ: glicemia de jejum; TG: triglicerídeos; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; CT: colesterol total; IMC: índice de massa corpórea; PAD: pressão arterial diastólica; PAS: pressão arterial sistólica; DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartil.

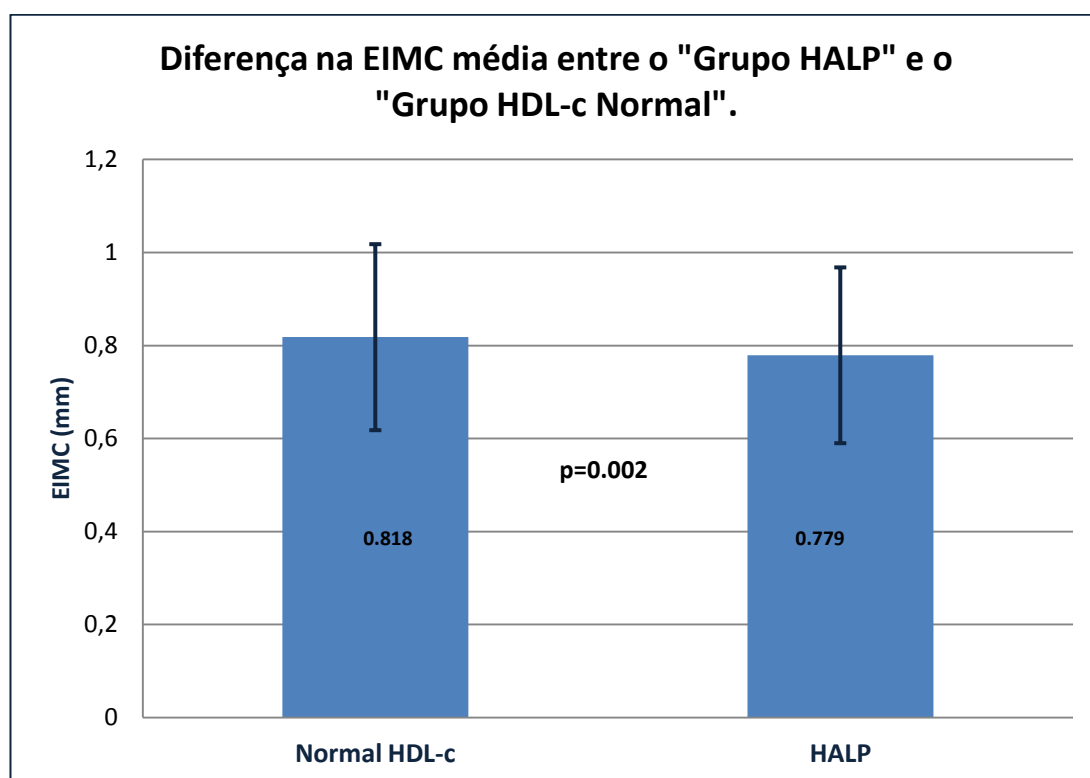


Figura 7 - Diferença na EIMC média entre portadores de HALP e indivíduos com HDL-c normal

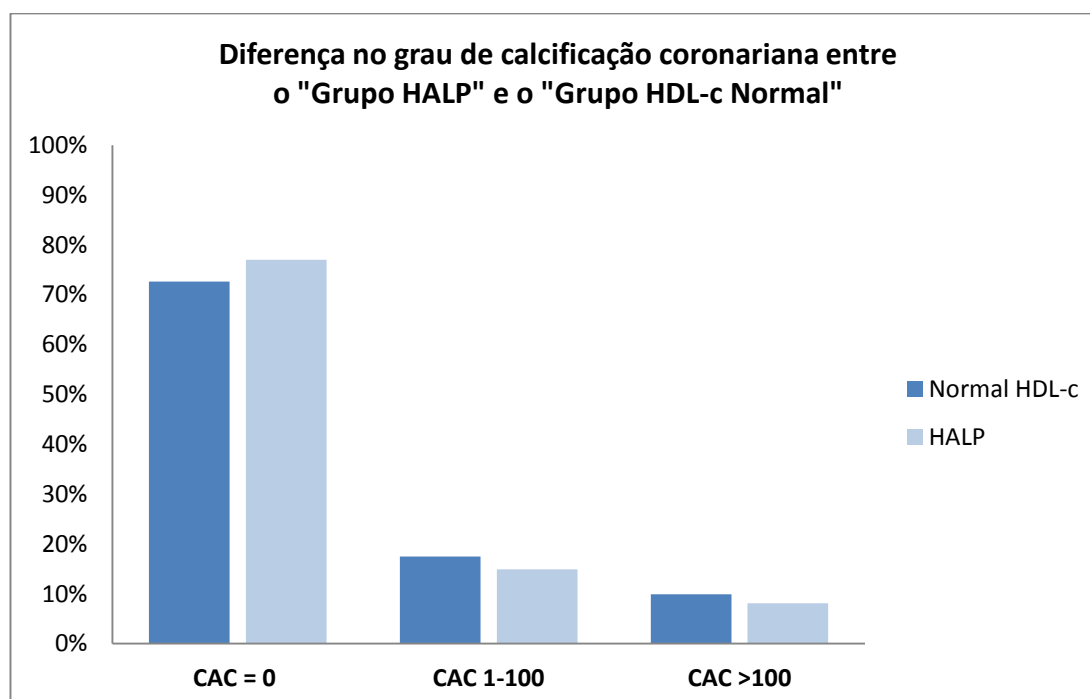


Figura 8 - Grau de calcificação em portadores de HALP e em indivíduos com HDL-c normal

Tabela 3 - Coeficientes Beta (Intervalo de Confiança 95%) para a associação entre EIMC e HDL-c por quintis (Quartil 1 como referência) e em portadores de HALP (“HDL-c Normal” como referência)

	Modelo Bruto	Ajuste por sexo, idade e raça	Ajuste completo
Quintis HDL-c			
Quartil 1	Referência	Referência	Referência
Quartil 2	-0.013(-0.026 to 0.000)	-0.009(-0.020 to 0.003)	-0.001(-0.012 to 0.010)
Quartil 3	-0.021(-0.033 to -0.008)	-0.019(-0.030 to -0.007)	-0.003(-0.014 to 0.008)
Quartil 4	-0.048(-0.060 to -0.035)	-0.048(-0.060 to -0.037)	-0.020(-0.031 to -0.008)
Quartil 5	-0.068(-0.080 to -0.055)	-0.071(-0.083 to -0.059)	-0.029(-0.041 to -0.017)
HALP			
HDL-c Normal	Referência	Referência	Referência
HALP	-0.039(-0.064 to -0.014)	-0.056(-0.079 to -0.033)	-0.020(-0.042 to 0.003)

Legenda: HALP: hiperalfalipoproteinemia; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade;

4.2 Resultados do Braço 2

4.2.1 Características gerais da população estudada e prevalência de doença vascular subclínica

A triagem nos centros de recrutamento incluiu em torno de 30.000 indivíduos na Unidade de Check-Up de Hospital Israelita Albert Einstein e, aproximadamente, 15.000 indivíduos na Unidade Clínica de Lípidos do InCor do HC/FMUSP (Figura 1). A aplicação dos critérios de inclusão e exclusão previamente mencionados levou à identificação de 80 indivíduos elegíveis que foram recrutados para o estudo. As características gerais do grupo estudado neste segundo braço são apresentadas na Tabela 4. A população do estudo foi constituída, majoritariamente, por mulheres (81,2%). O sexo feminino predominou em todos os contextos avaliados para recrutamento dos participantes quando os dados laboratoriais foram filtrados pela presença de duas medidas, realizadas em momentos diferentes, de HDL-c > 90mg/dL, achado esperado dada a maior prevalência de HDL-c alto na população feminina (WHO, 1988; Heiss *et al.*, 1980; de Backer *et al.*, 1998).

De uma maneira geral, os portadores de HALP apresentaram um perfil metabólico saudável, com índice de massa corpórea (IMC) e cintura abdominal (CA) adequadas; glicemia de jejum e triglicérides baixos; LDL-c dentro dos valores desejáveis.

Tabela 4 – Características da população estudada (n=80)

Dados demográficos e antropométricos	Média (DP)
Idade (anos)	60,34 ± 9,11
Homens, % (n)	18,8% (15)
IMC (Kg/m ²)	24,02 ± 4,23
Circunferência Abdominal (cm)	85,81 ± 17,12
Etnia (auto referida)	% (n)
Branca	62,3% (48)
Parda	16,9% (13)
Asiática	11,7% (9)
Negra	9,1% (7)
Antecedentes	% (n)
Hipertensão Arterial	44,2% (34)
Tabagismo Atual	5% (4)
Tabagismo Prévio	17,5% (14)
História Familiar de DAC precoce	12% (6)
Perfil Laboratorial	Média (DP)
Colesterol Total (mg/dL)	225 ± 42
LDL-c (mg/dL)	118 ± 34
HDL-c (mg/dL)	101 ± 24
Triglicérides (mg/dL)**	78 (32-452)
Glicemia de Jejum (mg/dL)	97 ± 12
Hábitos	% (n)
Sedentarismo	33,3% (25)
Consumo Excessivo de Álcool	10,4% (8)

Legenda: HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; IMC: índice de massa corpórea; DP: desvio padrão; DAC: Doença Arterial Coronariana.

**Mediana (intervalos).

Os níveis médios de colesterol total foram limítrofes, influenciado pelos altos níveis de HDL-c inerentes ao estudo. A prevalência de tabagismo ativo foi consistentemente menor que na população geral. A Tabela 5 mostra os dados da avaliação da aterosclerose/doença vascular subclínica na população estudada: escore de cálcio coronariano, EIMC e velocidade de onda de pulso.

Tabela 5 - Avaliação tomográfica e ultrassonográfica da população estudada (n=80)

Variável	Média (DP)
Escore de Cálcio Coronariano (% Agatston=0)	66,1% (n=41)
Espessura Íntimo-Medial da Carótida (mm)	0,73 (0,14)
Velocidade de Onda de Pulso (m/s)	10,9 (2,31)

Legenda: DP= desvio padrão.

As Tabelas 6 e 7 mostram as variáveis associadas a maior grau de calcificação coronariana. Idade, hipertensão arterial, tabagismo prévio e níveis de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides se associaram, positivamente, a maior grau de calcificação coronariana.

Tabela 6 - Variáveis categóricas associadas a grau de calcificação coronariana (n= 62)

Variável	Agatston								Total	P	
	0		1 a 100		101 a 400		> 400				
	N	%	n	%	n	%	n	%			
Sexo										0,294	
Feminino	35	85,4	7	77,8	4	57,1	3	60,0	49	79,0	
Masculino	6	14,6	2	22,2	3	42,9	2	40,0	13	21,0	
Etnia										0,123	
Branca	26	66,7	4	44,4	3	42,9	3	60,0	36	60,0	
Parda	7	17,9	1	11,1	2	28,6	1	20,0	11	18,3	
Negra	4	10,3	0	0,0	0	0,0	1	20,0	5	8,3	
Asiática	2	5,1	4	44,4	2	28,6	0	0,0	8	13,3	
HAS	12	30,0	5	55,6	6	85,7	5	100,0	28	45,9	0,001
TBG atual	0	0,0	0	0,0	1	14,3	0	0,0	1	1,6	0,213
TBG prévio	6	14,6	0	0,0	3	42,9	3	60,0	12	19,4	0,015

Legenda: HAS= hipertensão arterial sistêmica; TBG= tabagismo. Resultado do teste da razão de verossimilhanças;

Tabela 7 - Variáveis contínuas associadas a grau de calcificação coronariana (n= 62)

Variável	Agatston	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
Idade (anos)	0	58,68	8,98	57	38	80	41	0,014
	1 a 100	63,22	7,21	64	49	71	9	
	101 a 400	64,29	8,64	61	58	81	7	
	> 400	71,00	5,48	72	65	78	5	
IMC	0	23,92	4,02	23,74	18,17	35,99	39	0,138
	1 a 100	23,26	3,72	23,10	17,33	29,07	9	
	101 a 400	23,88	2,79	23,14	19,91	28,62	7	
	> 400	28,52	7,89	24,67	21,78	40,86	5	
CA	0	85,81	12,35	84	67	114	31	0,073
	1 a 100	75,00	32,10	82,5	0	104	8	
	101 a 400	90,71	6,26	93	77	95	7	
	> 400	101,00	23,60	101	74	134	5	
HDL-c	0	103,45	28,64	96	71	241	41	0,606
	1 a 100	96,72	5,92	97	90	105	9	
	101 a 400	107,29	23,68	102,5	87,5	152	7	
	> 400	90,60	10,85	92	73	102	5	
LDL-c	0	112,05	29,46	112	60	181	41	0,001
	1 a 100	108,39	32,74	103	47	154	9	
	101 a 400	134,71	34,19	126	95	188	7	
	> 400	173,80	54,82	185	81	225	5	
Colesterol Total	0	220,79	35,61	215	154	346	41	0,004
	1 a 100	206,28	38,60	213,5	147	275	9	
	101 a 400	260,17	62,63	236,25	208	354	6	
	> 400	277,60	56,25	312	196	325	5	
TG	0	79,80	25,13	79	32	138	41	0,010*
	1 a 100	68,72	14,91	75	48	95	9	
	101 a 400	149,29	142,75	83	51	452	7	
	> 400	123,50	21,19	120	99	153	5	
Glicemia	0	96,80	10,86	96	71	126	41	0,377
	1 a 100	98,67	12,32	100	77	114	9	
	101 a 400	104,67	22,92	98	82	143	6	
	> 400	92,00	8,86	93	78	102	5	

Legenda: Resultado da ANOVA; * Resultado do teste Kruskal-Wallis; Lipídes e glicemia= mg/dL; CA= circunferência abdominal (cm); IMC= índice de massa corpórea (kg/m²). TG= triglicérides; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade.

O estudo da velocidade de onda de pulso foi conduzido considerando-se sua distribuição por quartis. Assim como evidenciado na Tabela 8, as variáveis associadas a aumento da VOP foram a presença de hipertensão arterial e o antecedente de tabagismo.

Assim como mostrado na Tabela 9, os três métodos aplicados para avaliação de doença vascular subclínica em portadores de HALP apresentaram resultados concordantes e houve associação estatisticamente significativa entre VOP, calcificação coronariana e EIMC.

Tabela 8 – Associação entre VOP avaliado por quartis e as variáveis categóricas consideradas

	VOP								Total	P
	1º quartil		2º quartil		3º quartil		4º quartil			
	n	%	N	%	n	%	n	%		
Sexo										0,12
Feminino	11	91,7	12	92,3	11	91,7	8	61,5	42	84,0
Masculino	1	8,3	1	7,7	1	8,3	5	38,5	8	16,0
Etnia										0,687
Branca	6	54,5	10	76,9	6	50,0	7	53,8	29	59,2
Parda	3	27,3	1	7,7	4	33,3	1	7,7	9	18,4
Negra	1	9,1	1	7,7	1	8,3	2	15,4	5	10,2
Asiática	1	9,1	1	7,7	1	8,3	3	23,1	6	12,2
HAS										0,047
Não	8	66,7	11	84,6	5	41,7	5	38,5	29	58,0
Sim	4	33,3	2	15,4	7	58,3	8	61,5	21	42,0
Tabagismo atual										0,047
Não	8	66,7	11	84,6	5	41,7	5	38,5	29	58,0
Sim	4	33,3	2	15,4	7	58,3	8	61,5	21	42,0
Tabagismo prévio										0,047
Não	8	66,7	11	84,6	5	41,7	5	38,5	29	58,0
Sim	4	33,3	2	15,4	7	58,3	8	61,5	21	42,0

Legenda: Resultado do teste da razão de verossimilhanças. HAS= hipertensão arterial sistêmica.

Tabela 9 – Associação entre VOP, EIMC e CAC em portadores de HALP

	VOP	Média	DP	N	p
Doença vascular subclínica					
CAC	< mediana	40,27	174,09	26	0,006
	≥ mediana	231,42	501,54	19	
EIMC	< mediana	0,69	0,12	28	0,015
	≥ mediana	0,79	0,15	22	

Legenda: CAC= calcificação arterial coronariana; EIMC= espessura intima-média da carótida.

4.2.2 Composição e função da HDL, e sua relação com a presença de doença vascular subclínica em portadores de HALP

Em relação à composição da HDL, verificou-se associação estatisticamente significativa das concentrações de Apo A-IV, mas não de Apo A-I, com o grau de doença vascular subclínica avaliada pela VOP, pelo score de cálcio coronariano e pela EIMC (Tabelas 10,11 e 12). Tanto para a VOP como para a EIMC e a CAC, quanto mais altos os níveis de Apo A-IV, maior o grau de doença vascular subclínica. Por outro lado, os níveis plasmáticos de triglicérides e a concentração de triglicérides tanto na HDL2 como na HDL3 associaram-se a valores mais altos de VOP (Tabela 11), enquanto uma menor capacidade de transferência de triglicérides para as HDL associou-se a maior EIMC (Tabela 12). Em relação à atividade anti-inflamatória da HDL, avaliada pela capacidade de inibição da produção de IL-6 e TNFalfa, observou-se associação estatisticamente significativa com o grau de calcificação coronariana e de EIMC (Tabelas 13,15 e 16). Não foi possível estabelecer associação da atividade antioxidante da HDL avaliada pelo método utilizado neste estudo com o grau de doença cardiovascular subclínica (Tabelas 12 e 13). O efluxo de colesterol associou-se com significância estatística aos valores de EIMC, mantendo-se como preditor independente de EIMC no modelo ajustado final (Tabela 16).

Tabela 10 – Níveis de Apo A-IV e grau de calcificação coronariana em portadores de HALP

	Agatston	Média	DP	N	P
Apo A-IV					
	0	83,37	29,07	41	0,049
	1 a 100	87,55	22,30	9	
	101 a 400	115,57	75,00	6	
	> 400	124,21	57,79	5	
Composição da HDL2					
	0	179,21	41,79	40	0,976
Apo A-I	1 a 100	174,21	24,32	9	
	101 a 400	177,90	34,92	6	
	> 400	183,53	36,02	5	
Composição da HDL3					
	0	149,30	26,50	40	0,339
Apo A-I	1 a 100	145,41	30,03	9	
	101 a 400	169,65	34,63	6	
	> 400	157,35	27,34	5	

Legenda: Resultado da ANOVA. Apo A-I e A-IV- mg/dL; Lipides em mg/dL corrigidos para 4 ml de plasma.

Tabela 11 – Composição da HDL e VOP em portadores de HALP

	VOP	Média	DP	N	P
Apo A-IV					
	< mediana	81,14	21,60	28	0,020
	≥ mediana	109,35	50,16	22	
Composição da HDL2					
Apo A-I	< mediana	173,25	36,32	28	0,375
	≥ mediana	164,27	32,41	21	
Colesterol	< mediana	132,46	32,80	28	0,332
	≥ mediana	122,80	34,94	20	
Triglicérides	< mediana	12,71	3,17	28	0,023
	≥ mediana	17,10	7,79	21	
Fosfolípidos	< mediana	194,50	42,94	28	0,264
	≥ mediana	180,57	42,40	21	
Composição da HDL3					
Apo A-I	< mediana	148,43	20,56	28	0,155
	≥ mediana	158,65	29,00	21	
Colesterol	< mediana	59,57	15,09	28	0,809
	≥ mediana	60,67	16,29	21	
Triglicérides	< mediana	11,64	5,01	28	0,008
	≥ mediana	16,76	7,89	21	
Fosfolípidos	< mediana	72,73	22,89	28	0,265
	≥ mediana	80,52	25,29	21	

Legenda: Resultado da ANOVA; Apo A-I e A-IV- mg/dL; Lipides em mg/dL corrigidos para 4 ml de plasma.

Tabela 12 – Composição e função da HDL e EIMC em portadores de HALP

	EIMC	Média	DP	N	P
Atividade Anti-inflamatória					
TNF	< mediana	293,42	109,99	17	0,488
	≥ mediana	312,57	64,65	24	
IL-6	< mediana	126,86	81,51	17	0,315
	≥ mediana	156,38	97,74	24	
Atividade antioxidante					
Dif Lag Time (LDL-HDL2) min	< mediana	5,87	6,64	24	0,081
	≥ mediana	2,41	7,09	26	
Dif Lag Time (LDL- HDL3) min	< mediana	15,74	8,32	24	0,228
	≥ mediana	13,18	6,41	26	
Transferências					
Transferência de CE (%)	< mediana	3,32	1,09	24	0,220
	≥ mediana	2,98	0,91	27	
Transferência de PL (%)	< mediana	23,66	1,96	24	0,673
	≥ mediana	23,87	1,60	27	
Transferência de TG (%)	< mediana	5,94	0,98	24	0,038
	≥ mediana	5,41	0,79	27	
Transferência de CL (%)	< mediana	7,47	1,25	24	0,033
	≥ mediana	6,77	1,03	27	
Efluxo de Colesterol (%)					
	< mediana	7,70	1,61	17	0,019
	≥ mediana	6,29	1,94	24	
Apo A-IV					
	< mediana	87,25	43,22	24	0,258
	≥ mediana	99,68	34,26	27	
Composição da HDL2					
Apo A-I	< mediana	163,60	30,83	24	0,258
	≥ mediana	174,68	36,99	26	
Colesterol	< mediana	122,48	27,02	23	0,312
	≥ mediana	132,35	38,64	26	
Triglicérides	< mediana	13,58	3,73	24	0,289
	≥ mediana	15,38	7,40	26	
Fosfolípidos	< mediana	180,04	33,86	24	0,215
	≥ mediana	195,12	48,95	26	
Composição da HDL3					
Apo A-I	< mediana	152,24	32,72	24	0,727
	≥ mediana	149,38	24,64	26	
Colesterol	< mediana	60,96	19,18	24	0,448
	≥ mediana	57,31	14,42	26	
Triglicérides	< mediana	13,46	8,20	24	0,766
	≥ mediana	14,04	5,30	26	
Fosfolípidos	< mediana	77,93	26,01	23	0,615
	≥ mediana	74,42	22,48	26	

Legenda: Resultado da ANOVA; TNF alfa e IL-6 - pg/mL; Apo A-I e A-IV- mg/dL; Lipídes em mg/dL corrigidos para 4 ml de plasma. CE= colesterol esterificado; CL=colesterol livre; PL= fosfolípidos; TG= triglicérides.

Tabela 13 – Função da HDL e calcificação coronariana em portadores de HALP

	Agatston	Média	DP	N	P
Atividade Anti-inflamatória					
TNF alfa	0	305,66	92,78	27	0,264
	1 a 100	311,86	61,12	7	
	101 a 400	386,24	59,66	4	
	> 400	277,16	67,96	5	
IL-6	0	136,30	71,88	27	0,002
	1 a 100	156,63	124,69	7	
	101 a 400	314,67	111,39	4	
	> 400	94,64	67,57	5	
Atividade Antioxidante					
Dif Lag Time (LDL-HDL2) min	0	4,16	7,04	40	0,943
	1 a 100	3,05	5,44	9	
	101 a 400	3,01	6,66	6	
	> 400	4,80	7,99	5	
Dif Lag Time (LDL- HDL3) min	0	14,22	7,67	40	0,221
	1 a 100	20,45	13,10	9	
	101 a 400	13,16	4,89	6	
	> 400	14,61	3,78	5	
Transferências					
Transferência de CE (%)	0	3,32	1,23	41	0,672
	1 a 100	2,89	1,03	9	
	101 a 400	3,60	0,78	5	
	> 400	3,47	1,05	5	
Transferência de PL (%)	0	23,99	1,70	41	0,803
	1 a 100	23,80	2,44	9	
	101 a 400	24,13	1,83	5	
	> 400	24,78	1,96	5	
Transferência de TG (%)	0	5,64	0,71	40	0,494
	1 a 100	5,38	0,73	9	
	101 a 400	5,87	1,57	6	
	> 400	6,07	1,15	5	
Transferência de CL (%)	0	7,18	1,10	40	0,563
	1 a 100	6,56	1,12	9	
	101 a 400	6,86	2,14	6	
	> 400	6,96	0,66	5	
Efluxo de Colesterol (%)					
	0	6,82	2,04	27	0,775
	1 a 100	5,97	2,08	7	
	101 a 400	6,98	2,02	4	
	> 400	6,65	1,74	5	

Legenda: Resultado da ANOVA; TNF alfa e IL-6 - pg/mL; Lipídes em mg/dL corrigidos para 4 m/ de plasma. CE= colesterol esterificado; CL=colesterol livre; PL= fosfolípides; TG= triglicérides.

Tabela 14 – Efluxo de colesterol, aterosclerose subclínica e função da HDL em portadores de HALP

	Efluxo	Média	DP	N	P
Doença vascular subclínica					
CAC	< mediana	304	1194	24	0,704
	≥ mediana	211	507	19	
EIMC	< mediana	0,79	0,15	21	0,029
	≥ mediana	0,69	0,11	20	
VOP	< mediana	11,87	2,49	21	0,081
	≥ mediana	10,61	1,98	20	

Legenda: Resultado da ANOVA; CAC= calcificação arterial coronariana; EIMC= espessura intima-media carotídea; VOP= velocidade de onda de pulso.

Tabela 15 – Associação da atividade anti-inflamatória da HDL, avaliada por meio da inibição da secreção de TNF alfa, com o grau de doença vascular subclínica em portadores de HALP

	TNF alfa	Média	DP	N	P
Doença vascular subclínica					
CAC	< mediana	450,47	1370,42	19	0,921
	≥ mediana	115,08	329,49	24	
EIMC	< mediana	0,70	0,10	20	0,048
	≥ mediana	0,78	0,15	21	
VOP	< mediana	10,84	2,09	20	0,267
	≥ mediana	11,65	2,50	21	

Legenda: Resultado da ANOVA; CAC= calcificação arterial coronariana; EIMC= espessura intima-media carotídea; VOP= velocidade de onda de pulso.

Tabela 16 – Modelo final: determinantes independentes de EIMC em portadores de HALP

	Fator	OR	IC (95%)		p
			Inferior	Superior	
EIMC	Transferência de TG (%)	0,058	0,008	0,428	0,005
	Efluxo de Colesterol	0,536	0,314	0,917	0,023
	Fator	Coefficiente	Erro Padrão	Valor t	p
EIMC	Idade (anos)	0,0111	0,0005	22,50	<0,001
	IL-6	0,0004	0,0002	2,08	0,045

Legenda: EIMC= espessura intima-media carotídea; TG= triglicérides; OR: Odds Ratio; IC= intervalo de confiança; IL-6= interleucina 6.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O presente estudo é o maior realizado até o momento com o intuito de avaliar especificamente a associação entre hiperalfalipoproteinemia (HALP) e doença vascular subclínica, estudando aspectos funcionais da HDL na determinação do risco cardiovascular nesta população. Nossos resultados indicam que valores marcadamente elevados de HDL-c estão associados a menor EIMC quando comparados a níveis de HDL-c considerados normais pelas diretrizes vigentes, mesmo considerando que a idade média do grupo HALP foi significativamente maior que no grupo controle. O menor grau de EIMC encontrado é parcialmente justificado pela menor prevalência de fatores de risco cardiovascular tradicionais no grupo de indivíduos com HALP. Contudo, o ajuste multivariado permitiu identificar a elevação adicional no HDL-c como fator independente de proteção cardiovascular. Recentemente, Vigna e colaboradores avaliaram um grupo menor de portadores de HALP (N=20), não conseguindo demonstrar diferença estatisticamente significativa no grau de EIMC entre estes e um grupo controle com uma média de HDL-c 40mg/dL inferior (Vigna *et al.*, 2014). O pequeno número de indivíduos recrutados nesse estudo, assim como a faixa etária menor e os níveis médios de HDL-c significativamente mais baixos são possíveis explicações da diferença nos resultados. Da mesma forma, um estudo anterior que incluiu 55 portadores de HALP sugeriu que a associação entre HDL-c e EIMC seguisse um padrão de “curva em J”, segundo o qual níveis marcadamente elevados de HDL-c não estariam associados a menor grau de EIMC e poderiam ser, pelo contrário, indicadores de HDL disfuncional (Balassarre *et al.*, 2002). Novamente, o pequeno número de indivíduos incluídos e a média relativamente baixa de HDL-c no grupo HALP podem ter sido fatores determinantes dos resultados negativos encontrados. Nossas análises por quintis da população do ELSA-Brasil não confirmam a existência de um padrão “em curva J” e mostram,

claramente, uma progressiva redução do EIMC ao longo dos quintis avaliados. Além disso, os achados da análise por quintis foi corroborado pela diferença significativa encontrada na avaliação direta do grupo HALP, cuja média de HDL-c foi em torno de 100mg/dL. Embora não tenham sido avaliados desfechos clínicos, a aferição da EIMC é amplamente validada na literatura como desfecho substituto para a doença cardiovascular aterosclerótica, sendo associada a eventos coronarianos, acidente vascular cerebral aterotrombótico e mortalidade cardiovascular. Nossos resultados indicam que, embora a HALP inclua um grupo heterogêneo de indivíduos com diferentes substratos genéticos e ambientais, em seu conjunto, não pode ser considerado um fenótipo aterogênico.

Santiago e colaboradores encontraram uma maior prevalência de fatores de risco cardiovascular em 71 indivíduos com HDL-c > 68mg/dL quando comparados com portadores de HDL-c normal. Apesar da maior prevalência de fatores de risco, esses autores não encontraram diferença estatisticamente significativa no grau de EIMC entre os dois grupos, sugerindo uma ação protetora do HDL-c marcadamente elevado na modulação do impacto dos fatores de risco tradicionais sobre o EIMC nessa população (Santiago *et al.*, 2010).

A avaliação de 80 voluntários com HDL-c \geq 90mg/dL permitiu que avaliássemos o impacto dos fatores de risco tradicionais na modulação da EIMC, VOP e CAC em portadores de HALP. Nossos resultados indicam que os fatores de risco tradicionais continuam mantendo associação com o grau de aterosclerose subclínica apesar da presença de HDL-c marcadamente elevado. Portanto, quando identificados em portadores de HALP, deveriam receber a mesma atenção e o mesmo tratamento que na população geral. Além dos fatores de risco tradicionais, aspectos genéticos, estruturais e funcionais da partícula de HDL podem interferir na determinação do risco cardiovascular em portadores de HALP. Bérard e colaboradores demonstraram, por exemplo, que ratos transgênicos com hiper-expressão da enzima LCAT apresentam HDL-c marcadamente elevado, porém disfuncional (Bérard). Da mesma forma, Kontush e colaboradores (Kontush

et al., 2004) mostraram que indivíduos portadores de HALP apresentam redução da capacidade antioxidante da HDL. Embora não tenhamos comparado a capacidade antioxidante da HDL de portadores de HALP com a de indivíduos normolipêmicos, nossa avaliação intragrupo de indivíduos com HDL-c marcadamente elevado não revelou nenhuma associação desta função da HDL com a presença de aterosclerose subclínica por nenhum dos métodos aplicados. Portanto, a avaliação da função antioxidante da HDL pode não ser um bom marcador de risco cardiovascular no grupo estudado. Diferentemente da escassa literatura disponível até o momento, nossos dados indicam associação direta entre as concentrações plasmáticas de apo A-IV e o grau de aterosclerose subclínica em portadores de HALP, enquanto os níveis de apo A-I, propostos como marcadores consistentes de risco cardiovascular, não apresentaram associação com nenhuma das três formas de doença vascular subclínica avaliadas. Tais resultados contrastam com as evidências disponíveis para a população geral e, podendo apresentar um padrão próprio da HALP, merecem ser avaliados em trabalhos prospectivos (Kronenberg *et al.*, 2000).

Os resultados mais consistentes do estudo funcional são que, após ajuste multivariado, a capacidade de efluxo de colesterol e a atividade anti-inflamatória medida pela inibição da geração de IL-6 da HDL mostraram associação independente com a EIMC. Um estudo prospectivo recentemente publicado mostrou que a capacidade de efluxo de colesterol da HDL é um preditor de eventos cardiovasculares independente da concentração de HDL-c e dos outros fatores de risco tradicionais associados na síndrome metabólica (Rohatgi *et al.*, 2014).

Um outro achado importante a ser valorizado e explorado foi a associação inversa entre a transferência de triglicérides de uma nanoemulsão lipídica para as HDL com a EIMC. Esses achados contrastam com a não associação das concentrações de triglicérides das HDL2 e HDL3 com os valores da EIMC. Entretanto, não podemos descartar possível papel da atividade da CETP em nossos achados. Futuros experimentos necessitam ser realizados para melhor explorar esses achados.

Não avaliamos, neste estudo, a atividade da CETP, nem pesquisamos as mutações previamente associadas à deficiência de CETP. Portanto, não foi possível discriminar nossa população de acordo com as possíveis etiologias de fenótipo HALP. Tal informação seria útil para definir ulteriormente o espectro de risco cardiovascular próprio do fenótipo HALP e elucidar o papel da atividade da CETP na modulação da funcionalidade da HDL em portadores de HALP.

Finalmente, embora não tenham sido avaliados desfechos clínicos de forma longitudinal, a avaliação da doença cardiovascular subclínica por meio da aferição de EIMC, CAC e VOP foi consistentemente validada na literatura médica como desfecho substituto para tais eventos.

Neste contexto, nossos achados reforçam o papel do efluxo de colesterol como marcador de risco cardiovascular em portadores de HDL-c marcadamente elevado e o situam como promissora ferramenta adicional para a estratificação de risco cardiovascular destes indivíduos.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

O presente estudo, em seus dois braços, permitiu elucidar questões relevantes e, até o momento, controversas na literatura médica a respeito do fenótipo HALP. Destacam-se quatro conclusões principais:

1. Níveis marcadamente elevados de HDL-c estão associados a menor EIMC quando comparados a níveis de HDL-c considerados normais pelas diretrizes vigentes. Embora portadores do fenótipo HALP apresentem, como grupo, um perfil metabólico mais favorável que o encontrado em indivíduos com HDL-c normal, a associação entre EIMC e HALP foi independente dos fatores de risco tradicionais, indicando que a menor prevalência destes últimos em portadores de HDL-c marcadamente elevado justifica apenas parcialmente a menor prevalência de doença vascular subclínica neste grupo.
2. Embora a HALP se apresente como um fenótipo ateroprotetor, há indivíduos com níveis marcadamente elevados de HDL-c que evoluem com doença cardiovascular, clínica ou subclínica. Neste contexto, nossos resultados indicam correlação entre os três métodos avaliados para estudar doença vascular subclínica em portadores de HALP: EIMC, VOP e CAC.
3. Os fatores de risco tradicionais continuam exercendo seu peso na determinação do risco cardiovascular em portadores de HALP. Idade, tabagismo, hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e níveis elevados de LDL-c apresentaram associação estatisticamente significativa com a presença de doença vascular subclínica no grupo estudado.

4. A avaliação da composição e da função da HDL em portadores de HALP pode permitir identificar indivíduos especificamente mais suscetíveis à aterosclerose. Nossos resultados indicam que, em particular, a atividade anti-inflamatória da HDL, avaliada pela capacidade de inibição da produção de IL-6; o efluxo de colesterol e a capacidade de transferência de triglicérides apresentaram associação independente com menor EIMC em portadores de HALP, enquanto níveis mais altos de apo A-IV se associaram a maior grau de doença cardiovascular subclínica.

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

Achenbach S, Moshage W, Ropers D, Nössen J, Daniel WG. Value of electron-beam computed tomography for the non-invasive detection of high-grade coronary artery stenoses and occlusions. *N Engl J Med*. 1998;339:1964-71.

Agatston A, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M Jr, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:827-32.

Azevedo CH, Wajngarten M, Lo Prete AC, Diament J, Maranhao RC. Simultaneous transfer of cholesterol, triglycerides, and phospholipids to high-density lipoprotein in aging subjects with or without coronary artery disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66:1543-8.

Balassarre D, Amato M, Pustina L, Tremoli E, Sirtori CR, Calabresi L, et al. Increased carotid artery intima-media thickness in subjects with primary hypoalphalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:317-322.

Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2007;357:1301-10.

Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJP, Komadja M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007;357:2109-22.

Barter PJ, Rye KA. Relationship between the concentration and antiatherogenic activity of high-density lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17:399-403.

Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R, et al. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *JAMA*. 2003;290(15):2030-40.

Baumgart D, Schmermund A, George G, Haude M, Ge J, Adamzik M, et al. Comparison of electron beam computed tomography with intracoronary ultrasound and coronary angiography for detection of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:57-64.

Bérard AM, Föger B, Remaley A, Shamburek R, Vaisman BL, Talley G, et al. High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesterol acyltransferase. *Nat Med*. 1997;3(7):744-9.

Bots ML, Visseren FL, Evans GW, Riley WA, Revkin JH, Tegeler CH, et al. RADIANCE 2 Investigators. Torcetrapib and carotid intima-media thickness in mixed dyslipidaemia (RADIANCE 2 study): a randomised, double-blind trial. *Lancet*. 2007;370(9582):153-60.

Brousseau ME, Diffenderfer MR, Millar JS, Nartsupha C, Asztalos BF, Welty FK, et al. Effects of cholesterol ester transfer protein inhibition on high-density lipoprotein subspecies, apolipoprotein A-I metabolism, and fecal sterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(5):1057-64.

Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, et al. Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature*. 1989;342:448-451.

Bruno RM, Bianchini E, Faita F, Taddei S, Ghiadoni L. Intima media thickness, pulse wave velocity, and flow mediated dilation. *Cardiovasc Ultrasound*. 2014 Aug 23;12:34.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003;289(19):2560-72.

de Backer G, de Bacquer D, Kornitzer M. Epidemiological aspects of high density lipoprotein cholesterol. *Atherosclerosis* 1998;137 Suppl:S1-S6.
Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 1984;25:1017-45.

Esterbauer H, Zollner H. Methods for the determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med*. 1989;7:197-203.

Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, Weisgraber KH, Mahley RW. A-I Milano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest*. 1980;66(5):892-900.

Frick MH, Elo MO, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, et al. Helsinki Heart Study: primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia: safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1987;317:1237-45.

Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, Schaefer EJ. Prevalence of risk factors in men with premature coronary heart disease. *Am J Cardiol.* 1991;67:1185-9.

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation.* 1989;79:8-15.

Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med.* 1977;62:707-14.

Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA.* 2004; 291:210-5.

Heiss G, Johnson NJ, Reiland S, Davis SE, Tyroler HA. The epidemiology of plasma- high density lipoprotein cholesterol levels: the Lipid Research Clinics Program Prevalence Study: summary. *Circulation.* 1980;62:IV-116/IV-136.

Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, et al. Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesterol ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1849-56.

Hirano K, Yamashita S, Nakajima N, Arai T, Maruyama T, Yoshida Y, et al. Genetic cholesteryl esters transfer protein deficiencies extremely frequent in the Omagari area of Japan. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1053-9.

Hirano K, Nagasaka H, Kazuhiro K, Yamaguchi S, Suzuki A, Toda T, et al. Disease-associated marked hyperalphalipoproteinemia. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* 2014;1:264–268.

Huang Z, Inazu A, Nohara A, Higashikata T, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein inhibitor (JTT-705) and the development of atherosclerosis in rabbits with severe hypercholesterolaemia. *Clin Science.* 2002;103:587-94.

Inazu A, Brown ML, Hesler CB. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 1990;323:1234-8.

Kastelein JJ, van Leuven SI, Burgess L, Evans GW, Kuivenhoven JA, Barter PJ, et al. RADIANCE 1 Investigators. Effect of torcetrapib on carotid atherosclerosis in familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 2007;356(16):1620-30.

Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;364:127-35

Knoblauch H, Bauerfeind A, Toliat MR, Becker C, Luganskaja T, Günther UP, et al. Haplotypes and SNPs in 13 lipid-relevant genes explain most of the genetic variance in high-density lipoprotein and low-density lipoprotein cholesterol. *Hum Mol Genet.* 2004;350:1505-15.

Kontush A, de Faria EC, Chantepie S, Chapman MJ. Antioxidative activity of hdl particle subspecies is impaired in hyperalphalipoproteinemia: relevance of enzymatic and physicochemical properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:526-33.

Kronenberg F, Stuhlinger M, Trenkwalder E, Geethanjali FS, Pachinger O, von Eckardstein A, et al. Low apolipoprotein A-IV plasma concentrations in men with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:751-7.

Kuusi T, Kesaniemi YA, Vuoristo M, Miettinen TA, Koskenvuo M. Inheritance of high density lipoprotein and lipoprotein lipase and hepatic lipase activity. *Arteriosclerosis.* 1987;7:421-5.

Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, et al. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet.* 2007;370(9602):1829-39.

Lo Prete AC, Dina CH, Azevedo CH, Puk CG, Lopes NH, Hueb WA, et al. In vitro simultaneous transfer of lipids to HDL in coronary artery disease and in statin treatment. *Lipids.* 2009;44:917-24.

Mabuchi H, Nohara A, Inazu A. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and CETP inhibitors. *Mol Cells.* 2014;37(11):777-84

Matsuzawa Y, Yamashita S, Kameda K, Kubo M, Tarui S, Hara I. Marked hyper-HDL2-cholesterolemia associated with premature corneal opacity: a case report. *Atherosclerosis.* 1984;53:207-212.

Miller GJ, Miller NE. Plasma High density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease. *Lancet.* 1975;i:16-19.

Mollet N, Cademartiri F, Nieman K, Saia F, Lemos PA, McFadden EP, et al. Multislice spiral computed tomography coronary angiography in patients with stable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43: 2265-70.

Neufeld TB, Stonik JA, Demosky SJ Jr, Knapper CL, Combs CA, Cooney A, et al. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem.* 2004;279:15571-8.

Nissen SE, Tardif J-C, Nicholls SJ, Revkin JH, Shear CL, Duggan WT, et al. Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2007;356:1304-16.

Rader, DJ. Illuminating HDL - is it still a viable therapeutic target? *N Engl J Med*, 2007;357:2180-3.

Robertson CM, Gerry F, Fowkes R, Price JF. Carotid íntima-média thickness and the prediction of vascular events. *Vasc Med*. 2012 ;17:239-48.

Rohatgi A, Khera A, Berry JD, Givens EG, Ayers CR, Wedin KE, et al. HDL Cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2014;371:2383-93.

Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, Sheedy PF, Schawarz RS. Coronary artery calcium area by electron beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area: a histopathologic correlative study. *Circulation*. 1995; 92: 2157-2162.

Rye KA, Barter PJ. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:421-8.

Saito F. A pedigree of homozygous familial hyperalphalipoproteinemia. *Metabolism*. 1984;33:629-33.

Santiago FD, Nakamura RT, Kaplan D, et al. Protective modulation of carotid atherosclerosis in hyperalphalipoproteinemic individuals. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2010;26:27-34.

Schaefer EJ, Anthanont P, Asztalos BF. High-density lipoprotein metabolism, composition, function, and deficiency. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25:194-9.

Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Ordovas JM, Cohn SD, Schaefer MM, Castelli WP, et al. Factors associated with low and elevated plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteina A1 levels in the Framingham Offsprings Study. *J Lipid Res* 1994;35:871-82.

Schmidt MI, Duncan BB, Mill JG, Lotufo PA, Chor D, Barreto SM, et al. Cohort profile: longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). *Int. J. Epidemiol*. 2014. doi: 10.1093/ije/dyu027.

Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, et al. Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001;285:1711-8.

Shah PK, Amin J. Low high density lipoprotein levels is associated with increased restenosis rate after coronary angioplasty. *Circulation*. 1992;85:1279-85.

Silverman MG, Blaha MJ, Krumholz HM, Budoff MJ, Blankstein R, Sibley CT, et al. Impact of coronary artery calcium on coronary heart disease events in individuals at the extremes of traditional risk factor burden: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Eur Heart J*. 2014;35:2232-41

Tariq SM, Sidhu MS, Toth PP, Boden WE. HDL hypothesis: where do we stand now? *Curr Atheroscler Rep*. 2014 Apr;16(4):398.

Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation*. 2002;106:3143-421.

Vigna GB, Satta E, Bernini F, Boarini S, Bosi C, Giusto L, et al. Flow-mediated dilation, carotid wall thickness and HDL function in subjects with hyperalphalipoproteinemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014;24(7):777-83.

WHO. MONICA Project Principal Investigators. The World Health Organization MONICA Project: a major international collaboration. *J Clin Epidemiol*. 1988;41:105-14.

Williams PJ, Krauss RM, Vranizan KM, Woods PDS. Changes in lipoprotein subfractions during diet-induced and exercise-induced weight loss in moderately overweight men. *Circulation*. 1990;81:1293-304.