



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde Humana

Efeito Endotelial da Terapia com Estatina em Alta Dose *versus* Baixa Dose Associada à Ezetimibe em Mulheres com Excesso de Peso

Tese de Doutorado

Maristela Magnavita Olivieira Garcia

Salvador-Bahia

2013



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

**Efeito Endotelial da Terapia com Estatina em Alta Dose *versus* Baixa Dose Associada
à Ezetimibe em Mulheres com Excesso de Peso**

**Tese apresentada ao curso
de Pós-graduação em
Medicina e Saúde Humana
da Escola Bahiana de
Medicina e Saúde Pública
para obtenção do título de
Doutor em Medicina**

Autor:

Maristela Magnavita Oliveira
Garcia

Orientador:

Prof. Dr. Luis Claudio Lemos
Correia

Salvador-Bahia

2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

G216 Garcia, Maristela Magnavita Oliveira

Comparação do efeito endotelial da terapia com estatina em alta dose versus
baixa dose associada à ezetimibe em mulheres com excesso de peso / Maristela
Magnavita Oliveira Garcia. – 2013. 196 f.; 30 cm

Tese (doutorado) – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Pósgraduação em
Medicina e Saúde, 2013.

Orientador: Prof. Luis Cláudio Lemos Correia

1. Endotélio vascular/efeito de drogas 2. Efeitos pleiotrópicos 3.
LDLcolesterol 4. Estatinas 5. Ezetimibe 6. Obesidade I. Título

CDU 616.1-03

Catlogação: Martha Silvia Martinez-Silveira Berbert

Nome: GARCIA, Maristela Magnavita Oliveira

Título: Efeito Endotelial da Terapia com Estatina em Alta Dose *versus* Baixa Dose Associada à Ezetimibe em Mulheres com Excesso de Peso

Tese apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Doutor em Medicina e Saúde Humana.

Aprovado em: 01/11/2013

Banca Examinadora

Profa. Dra Ana Marice Ladeira
Profa. Adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.
Doutora em Medicina, pela Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Maria de Lourdes Lima
Profa. Adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.
Doutora em Medicina, pela Universidade Federal da Bahia

Profa. Dra. Lucíola Crisóstomo
Profa. Adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.
Doutora em Medicina, pela USP

Prof. Dr. José Augusto Barreto
Prof. Adjunto da Universidade Federal de Sergipe
Doutor em Cardiologia, pela FMUSP

Prof. Dr. Antonio Alberto da Silva Lopes
Professor Associado- Doutor, Livre Docente da UFBA
Doutorado e pós doutorado na Universidade de Michigan.

"A sabedoria é um paradoxo. O homem que mais sabe é aquele que mais reconhece a vastidão da sua ignorância."

F.Nietzsche

Dedico, primeiro, e acima de tudo, à Deus, que é caminho, verdade e vida, luz que me conduziu e bondade que permitiu que tudo acontecesse. Com amor, dedico este trabalho ao meu marido Francisco, pois construímos juntos nossos sonhos, e por essa razão ficam mais belos, e por nem sempre serem fáceis, são doces conquistas.

Dedico, com muito carinho, amor e gratidão, aos meus queridos pais, Edson e Thereza, que são incondicionais torcedores pelo meu sucesso, cujos olhos refletem por mim meiga admiração, mistura de amor e terno orgulho. Aos meus filhos queridos e muito amados, Rodrigo e Stella, desejo dedicar, além do resultado final da obra, todas as lições que ela carrega nas etapas trilhadas: de amor, dedicação, vontade, ânimo, confiança, seriedade e fé, um verdadeiro aprendizado.

Instituições Envolvidas

EBMSP- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

FBDC- Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

ADAB – Ambulatório Docente Assistencial da EBMSP – **PEPE**- Projeto para o
Estudo do Excesso de Peso

Laboratório de Patologia Clínica do ADAB

LPC- Laboratório de Patologia Clínica

Fontes de Financiamento

FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia

SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia

EQUIPE

Maristela Magnavita Oliveira Garcia, doutoranda

Luis Claudio Lemos Correia, orientador

Paulo Roberto Passos Lima, bolsista de Iniciação Científica, EBMSP/FAPESB, participou da elaboração do projeto, seleção das pacientes, coleta dos dados, transporte de material, apresentação de tema-livre em congresso local e trabalhos em amostras científicas.

Carolina Garcez Varela, bolsista de Iniciação Científica, EBMSP/FAPESB, participou da seleção das pacientes, randomização e coleta dos dados, transporte de material, apresentação de temas-livres em congressos local, regional e nacional e trabalhos em amostras científicas.

Patricia Fontes da Costa Silva, bolsista de Iniciação Científica, EBMSP/PIBIC, participou da coleta dos dados, seleção das paciente, randomização e coleta de dados, apresentação de temas-livres em congressos local e trabalhos em amostras científicas.

Marilia Galeffi Rodrigues, cardiologista, pesquisadora associada, participou na elaboração do projeto e coleta de dados.

Paulo Góes, estudante de biomedicina da FTC, participou na fase de seleção das pacientes e organização do recrutamento.

Equipe do PEPE- participação no encaminhamento de pacientes e disponibilização da infraestrutura para a viabilização do trabalho, além de participação em discussões científicas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Claudio Correia, que é exemplo de paixão pela pesquisa científica e pela Medicina Baseada em Evidências, além de portador de admirável raciocínio criativo, lógico e também filosófico. Meus sinceros e eternos agradecimentos pelo seu ânimo e disposição nas discussões, disponibilidade nas revisões e altruísmo na socialização do seu patrimônio do saber científico.

Aos professores pesquisadores da Pós-graduação EBMSP, do Projeto PEPE- Projeto para o Estudo do Excesso de Peso, Prof. Dr. Armênio Guimarães, Profa. Dra. Ana Marice Ladeia, Profa. Dra. Maria de Lourdes Lima, que me aceitaram no projeto, me incluíram nas discussões científicas e disponibilizaram toda a estrutura no ADAB necessária para a realização desse trabalho.

Aos meus alunos, orientandos da Iniciação Científica da EBMSP, Paulo Roberto Passos Lima, Carolina Garcez Varela e Patricia Fontes, que atuaram com grande seriedade e responsabilidade nas várias etapas da pesquisa e prestaram inestimável colaboração. Também à aluna Isis Vasconcelos, de Iniciação científica da Bahiana, que escolheu nossa pesquisa para tema de sua monografia, e trouxe ânimo para mais uma produção, enriquecendo o trabalho com sua peculiar alegria. Ao aluno Paulo Góes, da FTC, pela sua participação e capacidade organizadora.

À Dra. Marilia Galeffi, que participou na elaboração do projeto e seu planejamento logístico, além da coleta de dados da pesquisa no ADAB.

À Sra. Cristina Maria de Jesus Batista, secretária do serviço de cardiologia do ADAB, pelo apoio e tratamento para conosco, sempre solícita, amigável e atenciosa.

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica do ADAB, em especial, à sua coordenadora Marcia Moreira, pela disponibilização da estrutura, funcionários, cuidados técnicos de coleta e armazenamento e criteriosas análises.

À equipe do Laboratório de Patologia Clínica- LPC, que participou da pesquisa com as medidas de PCR, forneceu resultados rápidos, informatizados e de confiança, sendo incentivadores e parceiros nas pesquisas científicas com o NAP- Núcleo de Apoio a Pesquisa.

À Sra. Martha Silvia Martinez-Silveira Berbert, Bibliotecária Tecnologista em Saúde Pública, da Fundação Oswaldo Cruz, do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, pela gentileza, eficiência e agilidade no meu atendimento.

Agradeço, especialmente, à todas as voluntárias que depositaram na nossa equipe de pesquisa confiança e respeito por este trabalho

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Artéria carótida comum
ADAB	Ambulatório Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina
ALT	Alanina aminotransferase
a-PA	Ativador tecidual do plasminogênio
ASC	Área de superfície corpórea
AST	Aspartato aminotransferase
CEPa	Células endoteliais progenitoras em circulação
CPK	Creatinafosfoquinase
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
ECR	Ensaio clínico randomizado
EMIC	Espessura médio-intimal carotídea
EMICsam	Espessura médio-intimal carotídea semiautomática média
EMICsamax	Espessura médio-intimal carotídea semiautomática máxima
eNOS	Óxido nítrico endotélio sintetase
E-selectina	Molécula de adesão da fase aguda
Fator tecidual	Tromboplastina
GMPc	Monofosfato cíclico de guanina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA redutase	Redutase do hidroximetilglutaril-coenzima
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule-1</i>
IIQ	Intervalo interquartil
IMC	Índice de massa corpórea
IPAQ	<i>International Physical Activity Questionnaire</i>
LDL-colesterol ou LDL-c	Lipoproteína de baixa densidade
NO	Óxido nítrico
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio
PCR	Proteína C reativa de alta sensibilidade
PGI ₂	Prostaciclina
s-ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1 solúvel
sTM	Trombomodulina solúvel
TNF α	Fator de necrose tumoral α
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VMF	Vasodilatação mediada por fluxo
VMN	Vasodilatação mediada por nitrato
vWF	<i>Factor von Willebran</i>

RESUMO

EFEITO DA TERAPIA COM ESTATINA EM ALTA DOSE VERSUS BAIXA DOSE ASSOCIADA À EZETIMIBE NA FUNÇÃO ENDOTELIAL EM MULHERES COM EXCESSO DE PESO

As estatinas agem prioritariamente reduzindo o LDL-colesterol e o efeito na função endotelial necessita ainda de esclarecimento. **Objetivos:** (1) Testar a hipótese de que a modulação da função endotelial promovida por estatinas relaciona-se com a dose utilizada, em cenário de semelhante redução no LDL-colesterol (2) Definir o nível de evidência do valor prognóstico da vasodilatação mediada por fluxo (VMF), desfecho testado no objetivo principal e (3) Testar a acurácia e a reprodutibilidade do método manual de aferição da espessura médio-intimal carotídea (EMIC), tendo o semiautomático como referência. **Métodos:** (1) Ensaio clínico randomizado para dois grupos de tratamento (16 pacientes em cada) e um grupo placebo (14 pacientes), com mesmo grau de redução de colesterol nos grupos ativos (sinvastatina 80 mg e sinvastatina 10 mg associada a ezetimibe 10 mg) e mensurado a VMF, antes e após oito semanas. (2) Revisão sistemática nas principais bases de dados. (3) Análises de concordância e reprodutibilidade das medidas de EMIC pelos métodos de aferição manual e semiautomático. **Resultados:** (1) Houve semelhantes incrementos da VMF nos grupos sinvastatina alta dose e sinvastatina baixa dose/ezetimibe, de $8,4\% \pm 4,3\%$ para $11\% \pm 4,2\%$ ($P = 0,02$) e de $7,3\% \pm 3,9\%$ para $12\% \pm 4,4\%$ ($P = 0,001$), respectivamente, em cenário de idêntica redução do LDL-colesterol. (2) Ausência de análise de estatística-c para comprovação do valor preditor incremental da VMF a modelos clínicos estabelecidos. (3) Correlação, concordância e reprodutibilidade satisfatórias entre os métodos manual e semiautomático de EMIC. **Conclusões:** (1) O benefício endotelial semelhante entre as terapias de diferentes doses de estatinas, mas que promovem a mesma redução de LDL-colesterol, sugere que o mecanismo hipolipemiante prepondera sobre os efeitos pleiotrópicos; (2) VMF prediz risco cardiovascular, mas não se justifica seu uso na rotina clínica; (3) O método manual de aferição da EMIC pôde ter suas medidas validadas, com análise satisfatória de precisão, a partir do método semiautomático

Palavras-chaves: função endotelial; efeitos pleiotrópicos; estatinas; ezetimibe

ABSTRACT

EFFECT OF HIGH DOSE STATIN THERAPY VERSUS LOW DOSE WITH EZETIMIBE

IN ENDOTHELIAL FUNCTION IN WOMEN WITH OVERWEIGHT

The primary action of statins is reduce LDL-cholesterol and the effect on endothelial function still needs clarification. **Objectives:** (1) To test the hypothesis that modulation of endothelial function promoted by statins relates to the dose used, in scenario of similar reductions in LDL-cholesterol (LDL-c) (2) To set the level of evidence about the prognostic value of flow mediated vasodilation (FMV), that is the main outcome tested and (3) Test the accuracy and reproducibility of the manual method of measurement of carotid intima-media thickness (IMT), taking the semiautomatic as reference. **Methods:** (1) a randomized clinical trial for two treatment groups (16 patients each), and a placebo group (14 patients), with similar degree of reduction in LDL-c in active groups (80 mg simvastatin and simvastatin 10 mg with ezetimibe 10 mg) and the FMV measured before and after eight weeks; (2) Systematic review in major databases; (3) Analysis of agreement and reproducibility of IMT measurements by manual and semi-automatic methods.

Results: (1) There were similar increments on FMV in high dose simvastatin group and low dose simvastatin/ezetimibe, from $8.4\% \pm 4.3\%$ to $11\% \pm 4.2\%$ ($P = 0.02$) and from $7.3\% \pm 3.9\%$ to $12\% \pm 4.4\%$ ($P = 0.001$), respectively, in scenario of similar reductions in LDL-c; (2) Absence of c-statistical analysis to prove the incremental predictive value of the FMV to established clinical models; (3) satisfactory correlation, agreement and reproducibility between the manual and semiautomatic methods of IMT. **Conclusions:** (1) The similar endothelial benefit between the two groups of different doses of statins, but same LDL-c reduction, suggests that lipid-lowering mechanism predominates over pleiotropic; (2) FMV predicts cardiovascular risk, but their use in clinical practice is not justified; (3) The manual method was validated with satisfactory precision analysis, from semi-automatic method

Keywords: endothelial function; pleiotropic effects, statins, ezetimibe

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 REVISÃO GERAL DA LITERATURA	18
2.1.1 Endotélio	18
2.1.2 Vasodilatação arterial e óxido nítrico	20
2.1.3 Obesidade e função endotelial	24
2.1.4 Avaliação da função endotelial	28
2.1.4 Valor prognóstico da função endotelial em portadores de aterosclerose: revisão sistemática	29
2.1.5 Estatinas	30
2.1.6 Ezetimibe	34
2.1.7 Combinação estatina com ezetimibe	36
2.2 REVISÃO ESPECÍFICA DA LITERATURA	37
2.2.1 Trabalhos que testaram a mesma hipótese	37
3. RACIONAL TEÓRICO	43
4. OBJETIVOS	46
5. METODOLOGIA DO ESTUDO	47
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
7. ASPECTOS ÉTICOS	67
8. RESULTADOS	70
9. DISCUSSÃO	82
9.1 DISCUSSÃO RELACIONADA AO OBJETIVO PRINCIPAL	82
9.2 DISCUSSÃO RELACIONANDO OS TRÊS OBJETIVOS DA TESE	87
10. CONCLUSÕES	89
11. PROPOSTAS DE ESTUDOS	90
12. PERSPECTIVAS	92
13. DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE DOUTORADO	94
REFERÊNCIAS	102
ANEXOS	114

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA DA REVISÃO DE LITERATURA

Tabela I- Trabalhos que testaram a hipótese do estudo	42
---	----

TABELAS DOS RESULTADOS DO ENSAIO CLÍNICO

Tabela 1- Comparação das características clínicas e laboratoriais entre os grupos de tratamento	73
Tabela 2- Efeito nos perfis lipídico e metabólico nos três grupos	75
Tabela 3: Efeito dos tratamentos no peso e características bioquímicas	76
Tabela 4. Efeito dos três tratamentos na vasodilatação mediada por fluxo	79

TABELA DO ARTIGO 1

Tabela 1 do Artigo 1- Características dos ensaios clínicos que avaliaram a capacidade preditora de eventos cardiovasculares da vasodilatação mediada por fluxo em portadores de aterosclerose	140
---	-----

TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1- Características da amostra	149
Tabela 2- Correlação das medidas de EMIC intra e interobservador	151
Tabela 3- Reprodutibilidade intra e interobservador das medidas manuais e semiautomáticas	151

TABELAS DO ARTIGO 3

Table 1. Comparison of baseline clinical and laboratory characteristics between the treatment groups.	184
Table 2. Effect on lipid and metabolic profiles in the three groups	186
Table 3. Effect on arterial vasodilation of the three treatments	188

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICOS DOS RESULTADOS DO ENSAIO CLÍNICO

Gráfico 1- Efeito dos tratamentos no LDL-colesterol, demonstrando significativa redução em ambos grupos de tratamento ativo, diferente do grupo placebo 74

Gráfico 2– Variação na vasodilatação mediada por fluxo, indicando variação positiva nos dois grupos ativos e nenhuma no placebo (Figura composta com dois gráficos 78

Gráfico 3– Correlação entre as variações do LDL-colesterol e da vasodilatação mediada por fluxo 80

GRÁFICOS DO ARTIGO 2

Gráfico 1. Correlação entre EMIC manual com EMIC máxima semiautomática 150

Gráfico 2. Gráfico de Bland-Altman comparando os valores da espessura médio-intimal carotídea pelos métodos manual e semiautomático 150

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA DA TESE

Figura I- Efeito da IL1 nas células endoteliais	20
Figura II- Vasodilatação e óxido nítrico	23
Figura III- Obesidade e mecanismos da disfunção endotelial	27
Figura IV- Via d mevalonato	33
Figura V- O papel do ezetimibe	35

FIGURAS DOS MÉTODOS DO ENSAIO CLÍNICO

Figura - Fluxograma do protocolo do estudo	50
Figura 2- Representação dos frascos utilizados na pesquisa	52
Figura 3- Exame de Vasodilatação Mediada por Fluxo- Imagem de um dos exames da pesquisa realizado no Laboratório de Ultrassonografia da EBMSP	58
Figura 4- Medidas manual e semiautomática da espessura médio-intimal carotídea Imagem de um dos exames da pesquisa realizado no Laboratório de Ultrassonografia da EBMSP -	62

FIGURA DO ARTIGO 1

Figura 1- Diagrama da seleção dos registros para a Revisão Sistemática	139
--	-----

FIGURA DO ARTIGO 2

Figura 1- Medidas da espessura médio-intimal carotídea pelos métodos manual e semiautomático	148
--	-----

FIGURAS DO ARTIGO 3

Figure Legend 1- Diagram flow of study protocol	183
Figure Legend 2. Effect of treatments on LDL cholesterol, demonstrating significant reduction in both active treatment groups, unlike the placebo group.	185
Figure legend 3. Changes of artery flow-mediated vasodilation, indicanting positive variation in the two active groups and no variation in the placebo group	187

1. INTRODUÇÃO

Importância do Problema

Os benefícios clínicos da terapia redutora de colesterol com as estatinas já foram demonstrados nas duas modalidades de prevenção, primária¹ e secundária², e primariamente creditados a enzima reguladora da síntese do colesterol, a redutase do hidroximetilglutaril-coenzima (HMG-CoA redutase).³ Até o momento, devido aos principais trabalhos terem demonstrado forte relação direta entre o nível de lipoproteína de baixa densidade, o LDL-colesterol (LDL-c), alcançado e chance de eventos, o mecanismo que tem sido mais aceito para os benefícios clínicos das estatinas é o da redução do LDL-c. Contudo, os resultados de estudos em aterosclerose sugeriram que a ação das estatinas poderia incidir na parede arterial, na composição sanguínea e no fluxo de perfusão intravascular.^{4, 5} Além da sua ação redutora de lípidos, portanto, as estatinas mostram ter efeito anti-inflamatório, anti-oxidante e anti-trombótico, observados *in vitro*, em modelos animais e na clínica com ensaios clínicos randomizados.⁶⁻⁸

A administração oral de estatina resulta em redução dos níveis plasmáticos de colesterol total e LDL-c na ordem de 30 a 50%, a depender da potência e dose utilizada.⁹ É plausível a hipótese de que, também seus efeitos pleiotrópicos sobre as funções vasculares, ou seja, aqueles que não dependem da redução do LDL-c, sejam relacionados à potência e dose do fármaco. As estatinas inibem a enzima HMG-CoA redutase, responsável por converter o HMG-CoA em mevalonato, e esta via, divide-se, no final, em outras duas, a do colesterol e a dos isoprenóides. Ocorre, portanto, não somente a redução da produção intracelular de colesterol, mas também a inibição da produção de isoprenóides, sendo esta última ação responsável por efeitos pleiotrópicos, principalmente antiinflamatório.¹⁰ As estatinas também têm ação sobre as células do endotélio vascular, melhorando sua função por meio da biodisponibilidade de óxido nítrico e redução da produção de endotelina-1, interferindo no recrutamento de novas células precursoras endoteliais para tecidos isquêmicos (marcadores de neovascularização), atuando como antioxidantes, reduzindo a concentração intracelular de espécies reativas do oxigênio.¹¹

O ezetimibe, por sua vez, é uma droga que foi liberada para tratamento da hipercolesterolemia, com distinto mecanismo de ação, agindo como um inibidor intestinal da absorção do colesterol, sem interferência na via do mevalonato e sem efeito direto na função endotelial. Portanto, permite testar a hipótese se alguns dos benefícios conferidos as

estatinas devem-se independentemente da sua ação redutora do LDL-c, dado que a associação de uma estatina baixa dose com ezetimibe é tão eficaz quanto alta dose da mesma estatina para a redução do LDL-c, como acontece com ezetimibe 10 mg associada à sinvastatina 10 mg e sinvastatina 80 mg em monoterapia, onde cada um dos tratamentos confere redução de aproximadamente 44% no LDL-c.¹²

Trabalhos previamente publicados sobre o tema divergem muito em importantes aspectos, que dificultam as conclusões e a comparação entre eles. As populações estudadas são heterogêneas, sendo na maioria de alto risco ou portadora de doença arterial coronariana (DAC). Também, as drogas e as combinações utilizadas foram as mais diversas, bem como a metodologia empregada nas pesquisas, variando, por exemplo, tempo de tratamento, comparações entre grupos com distintas e não equivalentes reduções de LDL-c e, ainda, a técnica de aferição da função endotelial.¹³⁻¹⁵

A obesidade se tornou uma condição de saúde pública, de proporções epidêmicas, em todo o mundo. Além de ser fator de risco cardiovascular, a obesidade está associada com o desenvolvimento de diabetes, dislipidemia, hipertensão arterial e estados pró-trombóticos. Dentre os fatores com evidente influência no aumento do risco cardiovascular na população obesa encontra-se a disfunção endotelial, além da resistência à insulina e inflamação subclínica.^{16, 17} Justifica-se, portanto, investigações sobre os efeitos das estatinas na função endotelial na população obesa, potencialmente predisposta a alterações no endotélio vascular.

Faltam sólidas evidências sobre o a ação endotelial das estatinas, bem como, até onde a atual revisão foi realizada, não foi testado esse efeito, em população de mulheres com excesso de peso, com potencial estado pró-inflamatório.

Nesse contexto, o objetivo do atual trabalho foi testar a hipótese de que a influência na função endotelial promovida pelas estatinas tem relação com a dose usada, independente da redução do LDL-c. Para esse fim, foi realizada a comparação do efeito na função endotelial de duas modalidades terapêuticas, que promoveram equivalente redução de LDL-c, em mulheres portadoras de excesso de peso. A primeira, estatina em dose alta, a sinvastatina (80 mg), e a segunda, dose baixa de estatina combinada à ezetimibe (sinvastatina 10 mg/ezetimibe mg).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REVISÃO GERAL DA LITERATURA

2.1.1 Endotélio

A célula endotelial controla ativamente o tônus vascular, coagulação, trombólise, remodelação vascular e respostas inflamatória e imune, portanto, exerce um importante papel de autoproteção estrutural e funcional.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que ocorre em resposta à agressão ao endotélio, sendo a disfunção endotelial seu estágio mais inicial de desenvolvimento. O dano arterial promove resposta compensatória que altera as propriedades do endotélio, resultando na disfunção endotelial, principalmente na camada íntima de artérias de médio e grande calibre.

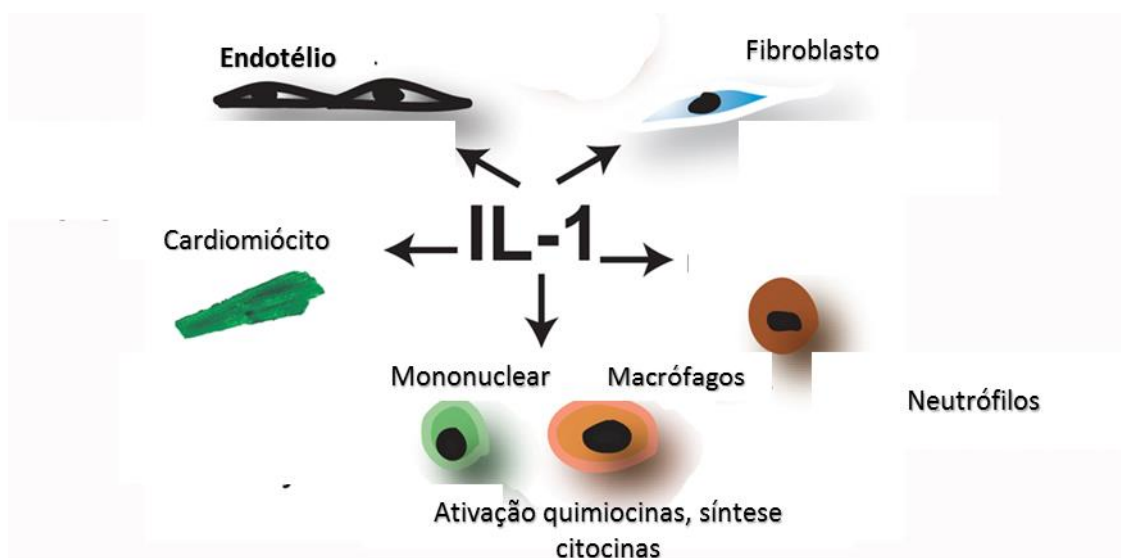
A intensa resposta inflamatória desencadeada pela agressão ao endotélio relaciona-se, principalmente, com a lipoproteína de baixa densidade, que é retida na camada íntima arterial, em parte por adesão à proteoglicanos, com posterior modificações de oxidação dessa molécula, transformando-se em LDL-oxidado, indutores importantes da expressão do quadro inflamatório.¹⁸ Consequentemente, ocorre o aumento da adesão e da permeabilidade do endotélio a leucócitos, desencadeando um estado prótrombótico, e induzindo a formação de moléculas vasoativas, fatores de crescimento e citocinas. Este estado pró-inflamatório e pró-trombótico é mediado principalmente por macrófagos, conhecidos como células esponjosas, além de subtipos de linfócitos T.¹⁹

Desse modo, a perda da integridade endotelial, compromete sua intrínseca capacidade de inibição de adesão leucocitária à superfície vascular e manutenção do

equilíbrio entre as atividades pró-fibrinolítica e pró-trombótica. A deposição dos leucócitos sobre o endotélio e sua penetração no espaço subendotelial são mediadas por moléculas de adesão, que têm sua produção aumentada na presença de disfunção endotelial, como por exemplo, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), E-selectina (molécula de adesão da fase aguda), e a ELAM-1 9 (endotelial leukocyte adhesion molecule).²⁰ A secreção de tais moléculas de adesão é regulada por citocinas sintetizadas pelo endotélio arterial, destacando-se as interleucinas 1, 4 e 6, além do TNF α (fator de necrose tumoral α).²¹⁻²³

Inteleucina-1 (IL-1) é capaz de modular o comportamento e a expressão do gene da maioria dos tipos de células envolvidas na cicatrização do infarto, principalmente, as células endoteliais. Através dos seus efeitos sobre a ativação de ambos os leucócitos e células endoteliais, a IL-1 é um mediador essencial no tráfico de leucócitos. Ela estimula a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais e ativa vias mediadas por integrinas, facilitando a migração transendotelial de neutrófilos e células mononucleares.. Além disso, a IL-1 regula positivamente a síntese de quimiocinas relacionadas ambas células, mononucleares e endoteliais, promovendo a quimiotaxia de leucócitos em sítios de lesão. Os cardiomiócitos, além do endotélio, da mesma forma, sofrem os efeitos da IL-1.²⁴

Figura I



Adaptado de Circulation 2004 June 1;109(21 Suppl 1):II27-II33.

Figura I- Efeito da IL-1 nas células endoteliais, com ações de sinalização pró-inflamatórias de ativação de leucócitos, induzindo a expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão em células endoteliais, além de promover infiltração de células inflamatórias. IL-1 também modula a sinalização de fenótipo e função de todos os tipos de células envolvidas na cicatrização do infarto, suprime a função cardíaca, induz hipertrofia dos cardiomiócitos e apoptose. Além disso, a IL-1 modula a função dos fibroblastos, aumentando a expressão de matriz metaloproteinase.

2.1.2 Vasodilatação arterial e óxido nítrico

A capacidade de vasodilatação é fundamentada na síntese e biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) derivado do endotélio, sintetizado pela NO endotélio sintetase (eNOS), a partir do precursor L-arginina, que constitui não só um importante mediador da vasodilatação endotelial, mas também atua na regulação de outras propriedades protetoras do endotélio.²⁵ O termo disfunção endotelial surgiu para descrever a incapacidade das células endoteliais em manter o tônus vascular, no entanto, atualmente tende a englobar comprometimento de várias outras propriedades que se manifestam com o desequilíbrio vascular.

As células endoteliais modulam o tônus vascular através da liberação de vasodilatadores, tais como o óxido nítrico e prostaciclina, e vasoconstritores, como a endotelina-1, prostaglandina H₂, espécies reativas de oxigênio (ROS), angiotensina 2 e tromboxano A₂. A síntese de óxido nítrico ocorre a partir do aminoácido L-arginina, pela ação enzimática da eNOS e em a presença de cofatores. Uma vez liberado no lúmen vascular, o óxido nítrico espalha-se nas células, incluindo músculo liso, liga-se com o guanilato ciclase solúvel, resultando em aumento da produção intracelular de GMP cíclico. Na disfunção das células endoteliais, ocorre aumento da produção de superóxido (O₂⁻) levando a consumo excessivo de óxido nítrico para produzir peroxinitrito (ONOO⁻). Baixos níveis de óxido nítrico em células endoteliais pode potencialmente resultar na supressão ineficaz de ROS e conduzir indiretamente a vasoconstrição. Dessa forma, essas alterações do metabolismo do óxido nítrico promovem o estresse oxidativo.^{26, 27} - **Figura 2**

Evidências crescentes sugerem a existência de um importante efeito anti-inflamatório e antitrombótico exercido pelo NO endotélio dependente, através da demonstração de que a inibição farmacológica dessa molécula aumenta a adesão de monócitos ao endotélio. A inibição da eNOS resulta, portanto, em um aumento na expressão de moléculas que promovem a adesão de leucócitos e também de quimiocinas, como a proteína-1, quimicamente atraente de monócitos, direcionando-os para a íntima de sítios endoteliais, contribuindo para formação de lesão aterosclerótica.

A importante atuação da eNOS, estimulando a produção de NO pelo endotélio, limita a ativação, adesão e agregação da placa aterosclerótica, em decorrência do efeito antitrombótico exercido pela molécula de NO, que possui relação com a inibição do inibidor do plasminogênio ativado -1 (PAI-1) proteína pró-trombótica. Na presença de doença aterosclerótica coronariana, é documentado comprometimento da produção de NO,

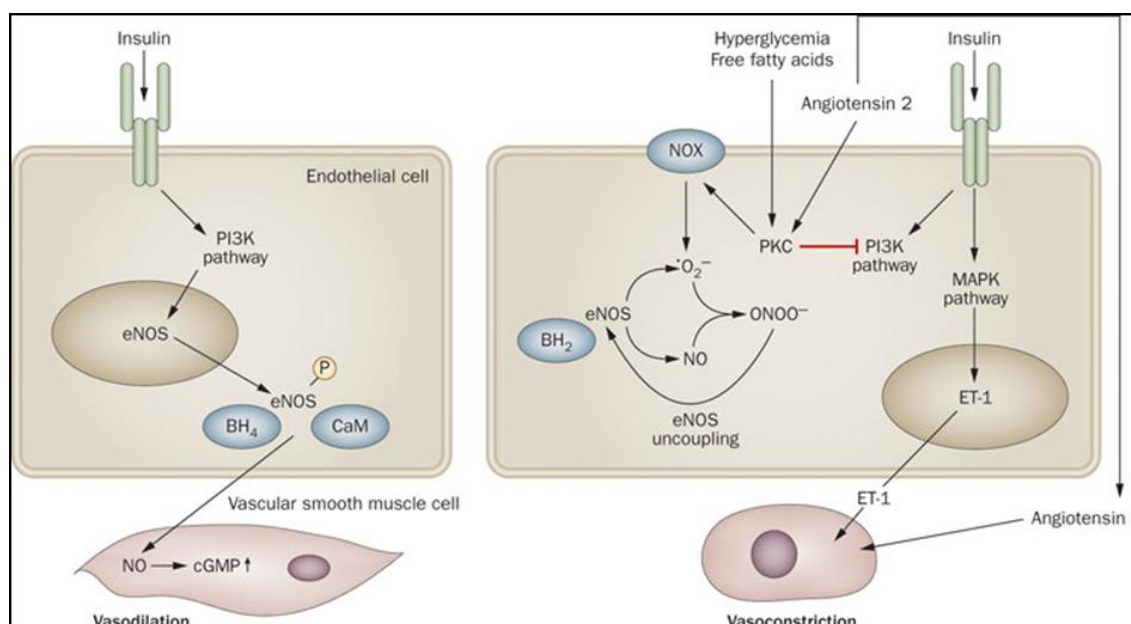
dependente do endotélio lesado pela placa aterosclerótica, sendo este um fator preditor independente de eventos coronarianos agudos.^{25, 28}

As respostas do endotélio vascular apresentam variações importantes, que dependem de inúmeros fatores. Em graus diferentes, estímulos externos como cigarro,²⁹ alimentos³⁰ e drogas,³¹ dentre outros, influenciam na reação endotelial. Fatores internos, relacionados ao organismo, também influenciam a função endotelial, principalmente, genética,³² imunidade,³³ hormônios,³⁴ idade^{35, 36} e morbidades associadas, tais como, diabetes, hipertensão e aterosclerose.³⁷ Dessa forma, é observado na literatura diferentes resultados, quanto à resposta vasodilatadora arterial, que depende fortemente das características populacionais dos estudos.

A idade é um importante fator modificador da estrutura e da função endotelial e os mecanismos envolvidos na diminuição da vasodilatação dependente do endotélio relacionada à idade são, mais importantemente, relacionados a alteração primária na via da L-arginina-NO.³⁸ Nos idosos, também, o estresse oxidativo na parede arterial, especialmente nos portadores de hipertensão, tem grande participação no comprometimento da biodisponibilidade do NO.³⁹

No Brasil, numa população de idosos com mais de 65 anos e com hipercolesterolemia, foi testado o efeito, na função endotelial e na proteína C reativa de alta sensibilidade (PCR), de 20 mg de atorvastatina, por quatro semanas. Apesar da redução significativa do LDL-colesterol e do grau de inflamação no grupo que recebeu estatina, os resultados não registraram mudanças na vasodilatação mediada por fluxo, com semelhantes percentuais de dilatação entre os grupos placebo e atorvastatina. Crisóstomo LM. e cols.⁴⁰ sugeriram que a ausência da influência da estatina na função endotelial em idosos pode estar relacionada às intrínsecas questões arteriais da senescência, como rigidez de parede, redução de distensibilidade e redução de síntese e biodisponibilidade do óxido

nítrico. Os autores consideraram, adicionalmente, a possibilidade da ocorrência de efeito na função endotelial com maior tempo de intervenção e com dose mais alta de atorvastatina. Contrariamente, resultados anteriores de outro estudo que testou mesma dose de atorvastatina, em 30 pacientes mais jovens, com idade de 49 ± 12 anos e risco para desenvolvimento de diabetes, por 12 semanas, demonstraram que houve resposta de melhora significativa da vasodilatação mediada por fluxo e também da PCR. Nesse mesmo trabalho, entretanto, outro grupo, de 37 portadores de diabetes estabelecida, com 53 ± 13 anos, teve melhora discreta na vasodilatação mediada por fluxo, que não foi significativa,



apesar da redução da PCR.⁴¹

Adaptado de Clin. Pract. Endocrinol. Metab. (2007)

Figura II- Vasodilatação e óxido nítrico

BH₂: dihidrobiopterina; ET-1: endotelina 1, MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno, NO: óxido nítrico, NOX: NADPH oxidase; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase, PKC: proteína quinase

2.1.3 Obesidade e função endotelial

Durante décadas, o tecido adiposo foi considerado como um compartimento inativo, que apenas era utilizado como um armazenador de energia. Durante os últimos anos, o tecido adiposo foi revelado como um importante órgão endócrino e parácrino, produtor de inúmeras enzimas, hormônios e fatores de crescimento, que são denominados genericamente de adipocinas. Vários estudos experimentais e clínicos mostraram que adipocinas modulam a sensibilidade à insulina e influencia na glicemia e no metabolismo da gordura. As adipocinas também atuam diretamente sobre a função endotelial, homeostase vascular e aterogênese, de forma independente dos seus efeitos sobre o metabolismo da glicose e gordura. Essas moléculas já são consideradas marcadores diagnósticos e prognósticos cardiovascular e pesquisas a apontam como potencial alvo terapêutico para reduzir o risco cardiovascular.⁴²

O comprometimento da função endotelial em pacientes obesos relaciona-se, principalmente, com o estado de resistência à insulina, quando o aumento da concentração de insulina estimula a via da MAP quinase (proteína ativada-mitogênio), promovendo proliferação e migração celular, produção de matriz extracelular, com conseqüente progressão do processo aterosclerótico. Tais mudanças ocorrem por defeito na autofosforilação da serina e da treonina, que ativam a via dessa proteína quinase.⁴³ Ao contrário, em estado normal de equilíbrio, a via da tirosina quinase desencadeia a ativação de outra proteína quinase, a Akt, que libera óxido nítrico e que tem papel antiaterogênico.

A obesidade, mesmo quando manifestada na infância, apresenta incipiente influência no endotélio vascular, principalmente se estiverem presentes variantes genéticas da NO-s e endotelina- 1 e seus receptores, podendo aumentar o risco cardiovascular em

crianças. A análise do genótipo-fenótipo da criança em risco cardiovascular para disfunção endotelial tem papel importante na acurada estimativa de risco cardiovascular.⁴⁴

A obesidade, principalmente do tipo visceral, está relacionada com estado inflamatório subclínico, e associa-se com índices elevados de PCR, interleucina-6 e TNF α .⁴⁵ Tais marcadores inflamatórios, por sua vez, relacionam-se com disfunção endotelial, como demonstrado no estudo populacional multicêntrico IRAS (*Insulin Resistance and Atherosclerotic Study*), com 1008 pacientes não diabéticos e sem DAC, que constatou forte associação de PCR com IMC, cintura abdominal e sensibilidade à insulina.⁴⁶ Outros marcadores inflamatórios, como contagem de leucócitos, fibrinogênio, albumina baixa, fator VIII e fator de von Willebrand também se relacionam com o aumento de risco de desenvolvimento de diabetes e comprometimento endotelial, como descrito nos estudos ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*) e WHS (*Women's Health Study*).^{47, 48}

O ganho de gordura na região da cintura abdominal, ainda que de grau modesto, pode causar disfunção endotelial, tendo sido demonstrado pela significativa correlação com a diminuição da VMF, mesmo em indivíduos com peso normal, e sem alterações na pressão arterial e frequência cardíaca. Fortalecendo essa associação, foi registrado que a recuperação da função endotelial foi relacionada com a perda de gordura. A disfunção endotelial decorrente do ganho de gordura visceral pode ser um importante mecanismo que liga a obesidade central ao aumento da morbimortalidade cardiovascular.⁴⁹ Essa interação entre disfunção endotelial e ganho de gordura visceral teve consistente demonstração em estudos epidemiológicos.^{50, 51}

Vilella e cols., entretanto, demonstraram que a disfunção endotelial correlaciona-se melhor com a relação cintura-quadril do que com a medida da cintura abdominal ou índice de massa corpórea. Esse trabalho avaliou 85 pacientes obesos, quanto a associação entre

VMF da artéria braquial com índice de massa corpórea, circunferência abdominal e índice cintura-quadril.⁵²

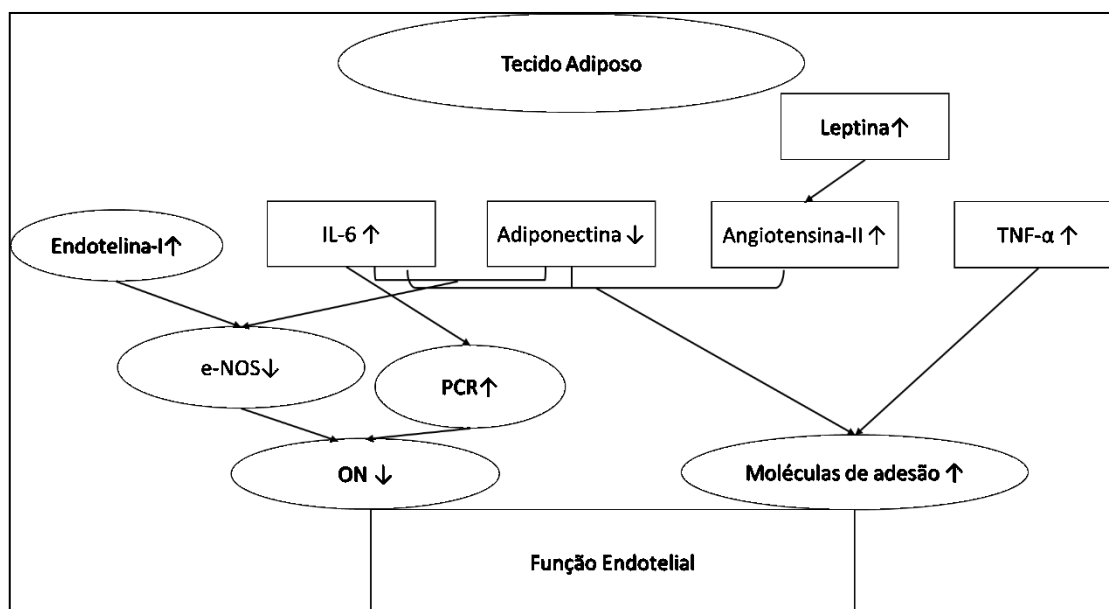
Os mecanismos que ligam a adiposidade visceral ao aumento do risco cardiovascular incluem os altos níveis de adipocinas, que são citocinas produzidas pelo tecido adiposo periférico, e moléculas pró-inflamatórias. Além disso, os ácidos graxos livres da gordura visceral, apresentam bioquímica diferenciada, com maior capacidade nociva para o fígado, predispondo à resistência à insulina e à disfunção endotelial.^{53, 54} A adiponectina, mais especificamente, a hipoadiponectinemia, juntamente com o aumento dos níveis de TNF α . induzidos pelo acúmulo de obesidade visceral, pode ser um factor importante para o desenvolvimento de alterações vasculares e distúrbios metabólicos, dada sua associação com a piora na função endotelial. Além desses mecanismos, em indivíduos obesos, a redução de células progenitoras também está relacionada com a senescência de células endoteliais.⁵⁵ – **Figura III.**

A leptina, hormônio derivado do adipócito, tem seus níveis elevados na condição de obesidade e pode contribuir para o risco cardiovascular associado ao excesso de peso, embora não tenha os mecanismos totalmente esclarecidos. Foi demonstrado em pesquisa em ratos que receberam leptina recombinante em dias alternados por uma semana, que a leptina associa-se com aumento da atividade simpática e superóxido, promovendo disfunção endotelial e influenciando na ação da angiotensina II no aumento da pressão arterial. Dessa maneira, a referida influência hormonal pode contribuir para rigidez arterial e hipertensão na obesidade.⁵⁶

Pesquisa clínica do estudo *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis* (MESA) comparou pessoas com síndrome metabólica (mas não diabéticas) e diabéticas (com e sem síndrome metabólica) em relação àquelas sem nenhuma condição, quanto a incidência de progressão da calcificação arterial coronariana, utilizando escore de cálcio Agatston. O

riscos relativos ajustados (intervalos de confiança a 95%) de calcificação coronariana foram de 1,7 (1,4 - 2,0); 1,9 (1,4 - 2,4) e 1,8 (1,4 - 2,2) (todos $p < 0,01$) para aqueles com síndrome metabólica sem diabetes, diabetes sem síndrome metabólica, e com ambos, diabetes e síndrome metabólica, respectivamente. Além disso, a progressão da calcificação foi preditora de eventos coronarianos em pessoas com síndrome metabólica sem diabetes (HR= 4,1, IC 95% = 2,0-8,5, $p < 0,01$) e diabetes (HR= 4,9, IC 95% = 1,3-18,4, $p < 0,05$) entre os de maior tercil de aumento de calcificação *versus* nenhum aumento.⁵⁷

Nesse contexto de lipotoxicidade, intervenções terapêuticas, desde mudança de estilo de vida a tratamentos farmacológicos, especialmente de controle da dislipidemia, influenciam positivamente a função endotelial, com melhora nos desfechos cardiovasculares e metabólicos.⁵⁸



Adaptado de *J Clin Pharmacol* 2013 September 9.

Figura III. Obesidade e mecanismos da disfunção endotelial

IL-6: Interleucina 6, TNF- α : Fator de necrose tumoral, e-NOS: Sintase do óxido nítrico, NO: Óxido nítrico, PCR: Proteína C reativa

2.1.4 Avaliação da função endotelial

A resposta normal do endotélio depende principalmente da sua integridade. Suas vastas funções, consideradas, endócrinas, parácrinas e autócrinas, são responsáveis pelo equilíbrio da circulação. A extensa área endotelial, atua como um sensor biológico, através das comunicações intercelulares, captando as diversas alterações, de pressão arterial, de fluxo sanguíneo, de balanço oxidativo, da coagulação, do metabolismo e também da ativação do sistema imune. De modo geral, o endotélio regula o tônus vascular, controla a coagulação, regula a fibrinólise, age no remodelamento vascular e interfere na resposta inflamatória e imunológica.

Portanto, após estímulo, com entrada de cálcio para o intracelular, o endotélio responde liberando produtos, dos quais o NO, previamente conhecido como fator relaxante derivado do endotélio (FRDE), é o principal. Tendo curta meia vida, de menos de 50 segundos, ele ativa o monofosfato cíclico de guanina (GMPc), reduzindo o cálcio intracelular, relaxando a musculatura lisa vascular e promovendo vasodilatação.

A vasodilatação dependente do endotélio, responsável pela auto-regulação do fluxo nos tecidos e pela homeostase do estresse de cisalhamentos (*shear stress*) nos vasos de condutância, foi a mais relevante função do endotélio já caracterizada, devendo-se a descoberta do óxido nítrico, em 1980, por Furchgott.⁵⁹ A função endotelial pode ser estudada, testando essa capacidade vasodilatadora, e são vários os métodos utilizados, sendo ultrassonografia intracoronária e arteriografia exemplos de métodos invasivos, e vasodilatação arterial mediada por fluxo e plestimografia venosa, de não invasivos. Outras formas de avaliação do endotélio incluem análises morfológicas e mecânicas da parede vascular, por exemplo com a espessura médio-intimal, da complacência, distensibilidade, e índices de remodelamento.

A determinação de marcadores endoteliais também refletem sobre a perda da integridade endotelial, presente na aterosclerose, quando ocorre a transição das condições basais (vaso-relaxante, anticoagulante, antiplaquetário e profibrinolítico) para um estado vasoconstritivo, procoagulante, ativador das plaquetas e antifibrinolítico. Desta forma, as células endoteliais disfuncionais libertam em menor quantidade NO, prostaciclina (PGI₂), trombosmodulina e ativador tecidual do plasminogênio (tPA), e produzem uma maior quantidade de endotelina 1 (ET-1), angiotensina II, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e fator Von Willenbrand (vWF), expressando também o fator tecidual (tromboplastina). Dos vários marcadores de função endotelial com aplicabilidade clínica em pacientes com DAC, as moléculas de adesão celular solúveis (CAMs) o vWF, a trombosmodulina solúvel (sTM) e as células endoteliais progenitoras em circulação (CEPs) têm-se revelado de especial utilidade clínica por predizerem o risco de evento cardiovascular.^{60, 61}

Embora a função endotelial coronária continue sendo o "padrão ouro", a sua complexidade e requisitos invasivos não permitem o uso corrente, enquanto que a VMF da artéria braquial pela ultrassonografia, além de ser relativamente simples, sua magnitude reflete a produção de óxido nítrico dependente do endotélio, correlaciona-se com a reatividade coronária,⁶² associa-se com fatores de risco cardiovascular, com uma maior prevalência de doença arterial coronariana,⁶³ além de ser preditor independente de eventos cardiovasculares em pacientes com e sem aterosclerose estabelecida.⁶⁴

2.1.5. Valor prognóstico da função endotelial em portadores de aterosclerose: revisão sistemática (Anexos dos artigos – Artigo 1)

2.1.6 Estatinas

As estatinas são drogas universalmente prescritas e sua história começou em 1971, com o microbiologista Akira Endo pesquisando novo antibiótico, ao observar que certos fungos produziam um potente inibidor da produção do colesterol. Foi feito o isolamento e análise desse composto inibidor, a partir do qual foi sintetizada em laboratório a molécula que daria origem à matriz das estatinas. O lançamento da primeira estatina (lovastatina) aconteceu em 1987.⁶⁵

A ação hipolipemiante das estatinas deve-se à sua interferência na primeira etapa da biossíntese do colesterol. Elas inibem de forma reversível e competitiva a enzima HMG - CoA redutase, através da afinidade desses fármacos com o sítio ativo da enzima. Dessa forma, não há conversão do HMG - CoA em ácido mevalônico, que é um precursor do colesterol.⁶⁶ Dessa forma, o efeito bioquímico principal das estatinas consiste em reduzir as concentrações plasmáticas de LDL-colesterol. No entanto, não apenas a produção intracelular de colesterol é inibida, mas também a biossíntese de diversos intermediários da via do ácido mevalônico, como os isoprenóides, que são essenciais para modular o processo pós-traducional de proteínas envolvidas nas mais diversas vias de sinalização intracelular (ex. Proteínas Rho e Rac). Além disso, as estatinas reduzem triglicérides plasmáticos e aumentam a lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol).⁹ – **Figura IV**

As estatinas, portanto, por essa primeira etapa enzimática, limita a velocidade da biossíntese do colesterol e resulta em redução da sua produção, depois, também interfere na maior expressão de receptores de LDL na superfície dos hepatócitos, o que leva ao aumento da sua remoção do sangue. A maior parte das estatinas ficam ligadas às proteínas plasmáticas e possuem meia-vida variável, sendo que a da sinvastatina é em torno de 3

horas, havendo posterior excreção do colesterol pelo intestino, tanto na sua forma livre, como fazendo parte dos ácidos biliares.⁶⁷

Estudos sugerem que o mecanismo pelo qual as estatinas reduzem o risco cardiovascular vai além da diminuição lipídica, justificando-se, mais pela modulação da composição e biologia da placa aterosclerótica, deixando-a menos propensa a ruptura e conseqüentemente com menos riscos de tromboembolismos, e menos por redução do grau de estenose.⁶⁸

Esses efeitos dependem de diversas ações como:

1) Melhora da função endotelial e efeito na atividade vascular e reendotelização

Uma das principais causas da disfunção endotelial é o comprometimento da biodisponibilidade do óxido nítrico, que é uma substância produzida pelas células endoteliais, mediadora da vasodilatação arterial, que também interfere na agregação plaquetária, proliferação da musculatura lisa e interação leucocitária vascular. As estatinas aumentam o nível de óxido nítrico, estimulando e regulando a eNOS, principalmente através da inibição da caveolina, proteína de membrana que atua como inibidor específico da eNOS. Além de aumentar a vasodilatação, as estatinas promovem diminuição da produção de endotelina – 1, peptídeo sintetizado pelas células endoteliais que promove vasoconstrição, interferindo na função endotelial. Há também vinculação das estatinas à capacidade de aumento do número de células endoteliais progenitoras circulante e indução da angiogênese.

2) Efeito antioxidante

Esse efeito ainda não possui um mecanismo totalmente esclarecido, mas acredita-se que se dá pela inibição da síntese de intermediários isopropenóis, envolvidos na sinalização intracelular, durante a ativação dos macrófagos, e também pelo aumento dos níveis de óxido nítrico, que interagem com radicais livres. Diversos

mecanismos levam a neutralização das espécies reativas do oxigênio, relacionando ao estresse oxidativo, e que é um dos componentes da disfunção endotelial.^{69, 70}

As estatinas promovem redução da concentração intracelular de isoprenóis, com conseqüente redução da migração, adesão e ativação leucocitária, diminuindo o processo inflamatório arterial. Dessa forma, ocorre a supressão da inflamação vascular e miocárdica, favorecendo a modulação do estado redox e aumentando a biodisponibilidade do óxido nítrico.⁷¹

O estudo PRINCE (*The pravastatin inflammation CRP evaluation*) é um dos mais importantes na demonstração de redução de marcadores inflamatórios com a terapêutica com estatinas, tendo utilizado a pravastatina como hipolipemiante.⁷² O JUPITER (*Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin trial*), adicionalmente, foi o primeiro estudo desenhado para avaliar se o efeito anti-inflamatório das estatinas poderia alterar desfechos clínicos, tendo sugerido redução do risco cardiovascular. Contudo o trabalho foi precocemente interrompido, o que comprometeu o poder de suas conclusões.⁷³

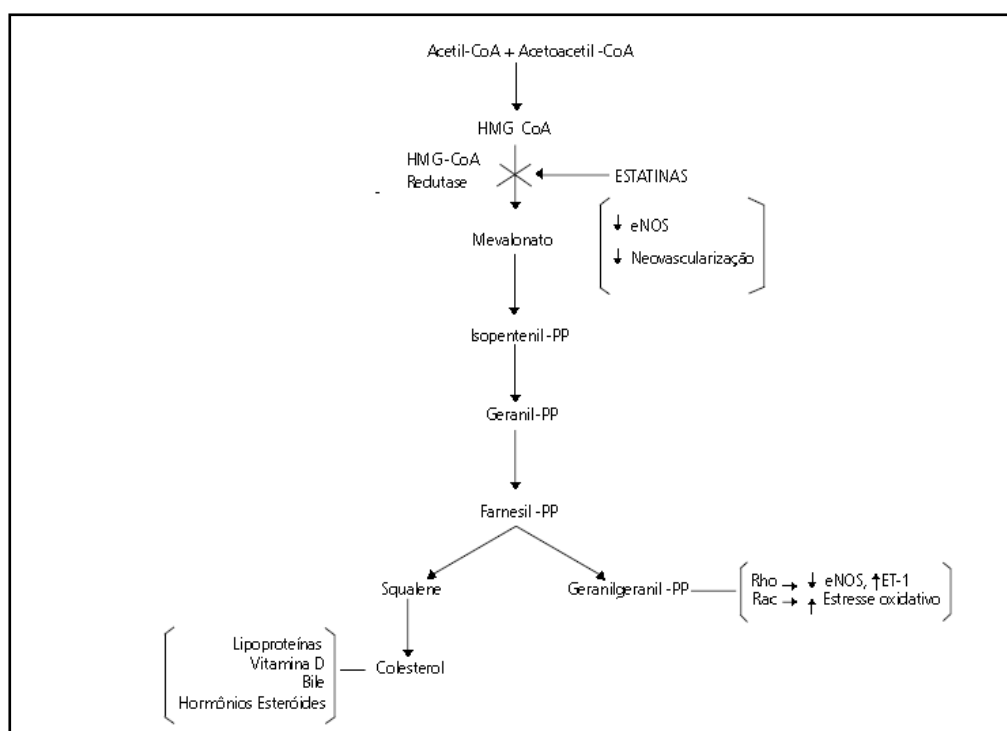
4) Estabilização da placa de ateroma

As estatinas promovem mudanças na estrutura e composição da placa, como espessamento da camada fibrótica envoltória, diminuição dos níveis de lipídeos e do acúmulo de colesterol nos macrófagos, aumentando a estabilidade da placa e diminuindo seu potencial trombótico e de ruptura.⁶⁸

Na particular interferência na angiogênese, pode existir uma relação dose-efeito, do tipo bifásica, onde em baixas doses de estatina, seu efeito é proangiogênico, e em dose elevada, seu efeito é angioestático, melhorando a função endotelial e impedindo a progressão da placa, conforme estudo *in vitro* e *in vivo* de modelo animal.⁷⁴ São, portanto,

inúmeros os mecanismos que levam as estatinas exercerem seus efeitos no endotélio vascular, e estes não dependem, exclusivamente, dos mecanismos da redução absoluta do colesterol.

Apesar destas demonstrações de efeitos das estatinas, falta evidência clínica direta que diferencie as funções hipolipemiantes que dependem da diminuição do colesterol e as que independem dos inibidores da HMG-CoA redutase. Da mesma forma, continua questionável se as funções independentes da ação hipolipemiante relaciona-se à inibição da HMG-CoA redutase ou com interferência direta nas vias inflamatórias.



Adaptado de Am.J.Cardiol. (2005)

Figura IV- Via do mevalonato divide-se em duas outras, a do colesterol e a dos isoprenóides

2.1.7 Ezetimibe

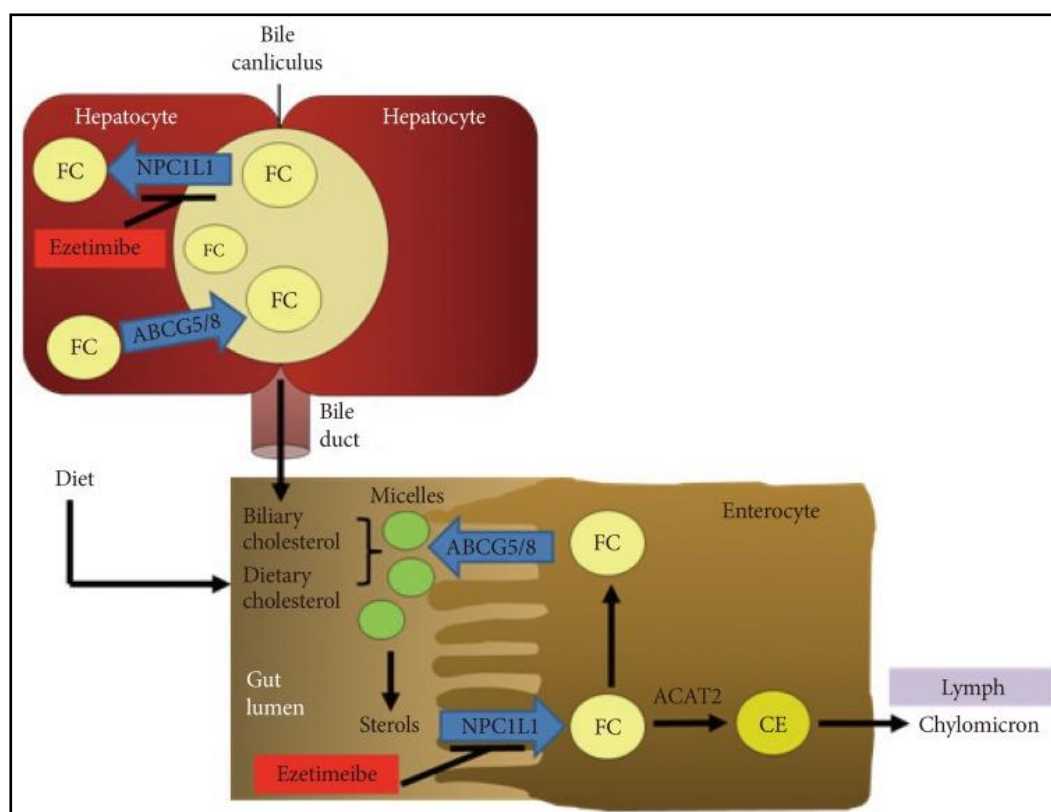
O ezetimibe é o primeiro agente hipolipemiante com ação inibidora da absorção intestinal, sem comprometimento dos nutrientes lipossolúveis. Após a administração por via oral, é rapidamente absorvido e metabolizado em ezetimibe-glucuronídeo, o metabólito farmacologicamente ativo. Sua concentração máxima é atingida em uma à duas horas, sendo posteriormente reciclado via êntero-hepática, para, em seguida, a maior parte ser eliminado via fecal. A meia vida é de aproximadamente 22 horas. Não há significativas diferenças dos efeitos clínicos quanto a idade, sexo ou raça, e não se faz necessário ajustar a dosagem, que é de 10 mg ao dia, mesmo para pacientes com leve insuficiência hepática ou leve a severo comprometimento renal. A via metabólica principal do ezetimibe se dá pela glucuronidação do grupo 4-hydroxifenil pelas isoenzimas 5'-difosfato-glucuroniltransferase na forma ativa ezetimibe-glucuronideo no intestino e fígado.⁷⁵

O ezetimibe tem passagem pelo fígado e retorna ao intestino, onde na borda em escova dos enterócitos bloqueia a captação do colesterol da dieta e biliar. A ação ocorre através do bloqueio de uma proteína transportadora, chamada Niemann-Pick C1-like 1(NPC1L1),⁷⁶ localizada na membrana do eritrócito do intestino delgado, ocorrendo posterior redução no aporte para o fígado, onde a regulação do LDL-c do plasma ocorre através de uma sobre-regulação dos receptores de LDL na superfície dos hepatócitos.^{77, 78}

O Ezetimibe reduz LDL-colesterol, tanto em monoterapia, quanto combinado com estatinas, sendo altamente seletivo para o bloqueio do colesterol. A redução em monoterapia é da ordem de 17% a 22%,^{79, 80} e quando usado combinado com estatina, a redução adicional é de 6% a 20%.^{81, 82}

As diferentes respostas observadas nos estudos podem dever-se a grande variação interindivíduos do efeito inibitório da droga.⁸³ Estudos genéticos identificaram mais de 140

polimorfismos no gene NPC1L1 e mostraram que a variação gênica associa-se com diferentes respostas ao tratamento.^{84, 85}



Adaptado de Diabetes Metab J. 2013 Aug;37(4):240-8

Figura V- O papel do ezetimibe na proteína *Niemann-Pick C1-Like 1* (NPC1L1), no transporte do colesterol no intestino e no fígado. NPC1L1 está localizada na borda em escova intestinal e membrana hepatocanicular. No lúmen do intestino delgado, o colesterol biliar e dietéticos são misturados e solubilizados para formar micelas. NPC1L1 transporta esteróis da membrana da borda em escova para compartimentos intracelulares. Colesterol livre (FC) é esterificado por acil coenzima A: colesterol aciltransferase 2 (ACAT2) para formar ésteres de colesterol (CE), em quilomícrons e secretado na linfa. NPC1L1 facilita a transferência de colesterol biliar secretado para os hepatócitos e impede a perda de colesterol. O transportador de colesterol, ATP-binding cassette transporter G5 e G8 (ABCG5/ABCG8) também se localiza na membrana apical dos hepatócitos. Ezetimibe inibe o transporte de colesterol ligado - NPC1L1 no intestino e no fígado.

2.1.8 Combinação de estatina com ezetimibe

A terapia combinada de uma estatina com ezetimibe utiliza os dois diferentes mecanismos de ação desses agentes hipolipemiantes, a inibição da síntese do colesterol pela estatina e a inibição da absorção no intestino pelo ezetimibe. Essa dupla via implica em um substancial aumento de redução do LDL-colesterol. Foram descritos também benefícios no aumento do HDL-colesterol e na redução de triglicérides.⁸⁶

Estudos clínicos demonstraram que esta associação resulta numa redução adicional média no LDL-C de 21% àquela obtida com o uso da estatina isoladamente. A associação do ezetimibe com baixas doses de estatina equivale ou supera os resultados da redução do LDL-C obtidos com estatina em dose máxima.^{82, 87, 88}

Em pacientes com hipercolesterolemia familiar, o estudo ENHANCE, não demonstrou que a terapia combinada, resultasse em mudanças significativas na espessura da camada médio-intimal carotídea, comparativamente com sinvastatina em monoterapia, a despeito da redução dos níveis de LDL-colesterol e de proteína C reativa.⁸⁹

Apesar do incremento na capacidade redutora do LDL-colesterol, até o momento, não existem claras evidências dos benefícios clínicos adicionais com uso da associação das duas terapias hipolipemiantes, principalmente, de avaliação de desfechos duros. Encontra-se em andamento o IMPROVE-IT (*Improved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial*), um estudo multicêntrico, randomizado, prospectivo, placebo-controlado, para avaliar redução adicional de eventos cardiovasculares em pacientes com doença coronariana crônica e síndromes coronarianas agudas, com a adição do ezetimibe à terapia com estatina.⁹⁰

2.2 REVISÃO ESPECÍFICA DA LITERATURA

2.2.1 Trabalhos que testaram a hipótese do estudo

A pesquisa foi realizada nas bases de dados Pubmed, Lilacs e Bireme, cruzando os seguintes descritores: statins; endothelial function; pleiotropic effects; hypolipidemic effect. Foram selecionados estudos publicados a partir do ano 2000, com desenho de ensaio clínico randomizado, seguimento de pelo menos quatro semanas, população mínima de 20 indivíduos e que analisaram a função endotelial por métodos de vasodilatação mediada por fluxo da artéria braquial ou radial e/ou Plestimografia. O objetivo dos trabalhos foi a avaliação do efeito endotelial com uso das estatinas.

Foram selecionados dez ensaios clínicos randomizados, publicados no idioma inglês, entre os anos de 2005 a 2013, sendo um destes uma produção nacional. A sinvastatina foi a estatina mais utilizada nos ensaios clínicos, mas também foram avaliadas atorvastatina, rosuvastatina e fluvastatina. O principal método utilizado na da função endotelial foi a vasodilatação mediada por fluxo da artéria braquial, presente em nove trabalhos.

A média de idade dos trabalhos variou de 53 a 72 anos e os níveis basais de LDL-c variaram entre 107 mg/dL a 203 mg/dL. Após as intervenções os valores médios de LDL-c variaram entre 54 mg/dL a 105 mg/dL. Os percentuais médios de VMF medidos antes dos tratamentos nos diversos estudos analisados estiveram entre 3,6% a 5,43%. A **Tabela I** apresenta os estudos que testaram a hipótese se a dose da estatina influencia o efeito na função endotelial. De modo geral, foram trabalhos com amostras populacionais pequenas, distintas quanto às morbidades, e por curto período de seguimento.

Em indivíduos com intolerância à glicose, portadores de DAC e diabetes, que utilizaram duas estratégias terapêuticas, alta dose de estatina (sinvastatina 80 mg) ou

combinação sinvastatina 10 mg com ezetimibe 10 mg, obtendo redução equivalente de LDL-c, foi igual a capacidade de melhorar a função endotelial, com aumento na VMF (+0,9% vs +1,5%, P=0,39), e de reduzir marcadores inflamatórios. Settergren e cols. sugeriram, então, que o mecanismo mais importante na influência da função endotelial é a própria redução do LDL-c, mais do que os efeitos pleiotrópicos mediados pela estatina.⁹¹

Em trabalho com 23 pacientes portadores de hipercolesterolemia primária, Araujo e cols, da mesma forma, testaram o tratamento de sinvastatina 10 mg combinado com ezetimiba 10 mg e o de sinvastatina 80 mg, na forma de cross-over 2 x 2, tendo apresentado que para similar redução do LDL-c nos dois grupos (45,27% vs 49,05%), houve melhora da função endotelial nas duas formas de tratamento, sendo de 3,61% no grupo da combinação sinvastatina/ezetimiba (P= 0,003) e de 5,08% no grupo sinvastatina alta dose (P < 0,001), sem diferença entre os tratamentos (P= 0,291).⁹²

Contrariamente a esses resultados, Ostad e cols., numa população de 49 pacientes portadores de doença arterial coronariana estável, mesmo tendo obtido redução semelhante de PCR, mostrou que a melhora da função endotelial foi significativa apenas nos pacientes tratados com alta dose de estatina, na comparação de dois grupos, o tratado com atorvastatina 80 mg e o que usou atorvastatina 10 mg e ezetimibe 10 mg. Além desse dado principal, favorável ao mecanismo pleiotrópico da função endotelial, os resultados desse estudo não demonstraram correlação entre a mudança da vasodilatação arterial mediada por fluxo (VMF) com a mudança do LDL-c.¹⁴

Liu e cols, estudando pacientes dislipidêmicos, obtiveram melhora da VMF apenas com maior dose de sinvastatina e sugeriram benefícios pleiotrópicos das estatinas, baseados nos resultados de quatro semanas. Contudo, nesse estudo, a variação da VMF não foi o objetivo primário do trabalho, que, inclusive, calculou seu n amostral objetivando a diferença de outro marcador, que não o efeito endotelial, e sim o efeito antioxidante.⁹³

Além disso, a opção por curto prazo de seguimento pode ter, no grupo de baixa dose, impedido a observação dos efeitos dependente de maior tempo de tratamento, considerando-se que a função endotelial é relacionada com substâncias vasoconstrictoras produzidas pelo próprio endotélio, como endotelina 1, que é a principal e mais potente, e observações muito precoces com as estatinas podem comprometer os resultados dos graus de bloqueio dos receptores e vias de ação, como anti-inflamatória, antioxidante e gênica, e consequentemente nas respostas da VMF.⁹⁴

Anteriormente, Fichtischerer e cols, já haviam sugerido, também em portadores de DAC, que apenas as estatinas associavam-se com melhora da função endotelial, tendo comparado quatro grupos distintos de tratamento, o de 40 mg de atorvastatina, o de titulação progressiva de 10 a 40 mg de atorvastatina, o de monoterapia de ezetimiba (10 mg), e o grupo de combinação ezetimiba 10 mg com sinvastatina 10 mg. Foi obtida melhora na função endotelial, avaliada pela plestimografia, apenas nos indivíduos tratados com atorvastatina. Apesar dos participantes iniciarem as intervenções à partir de semelhantes valores basais de LDL-colesterol, os grupos estudados não são comparáveis entre si, principalmente, no que se refere a magnitude de redução de LDL-c, comprometendo, deste modo, a inferência feita pelos autores sobre a ação pleiotrópica.⁹⁵

Comparando a VMF, entre grupos de pacientes diabéticos, tratados por 10 semanas, com fluvastatina 60 mg ou a associação de fluvastatina 20 mg com ezetimibe 10 mg, os autores observaram melhora na função endotelial nos dois grupos, apesar da redução do LDL-colesterol ter sido menor no grupo da fluvastatina 60 mg, comprometendo também a conclusão do estudo.⁹⁶

Mais recentemente, o efeito na melhora da função endotelial, foi avaliado no estudo que examinou a VMF pós prandial, em 100 portadores de síndrome metabólica, tratados com sinvastatina 80 mg ou com sinvastatina 10 mg e ezetimibe 10 mg, durante seis

semanas. Nesse trabalho, a redução do LDL-colesterol foi semelhante nos grupos tratados e a VMF em jejum foi igual nos dois grupos ($4,35 \pm 0,19$ vs $4,43 \pm 0,18$; $P = 0,777$), bem com a variação pós prandial na VMF ($-0,34 \pm 0,21$ vs $-0,43 \pm 0,20$; $P = 0,76$).⁹⁷

Foi também em cenário de redução semelhante de LDL-colesterol, que Landmesser e cols. avaliaram portadores de insuficiência cardíaca, após tratamento de quatro semanas, com 10 mg de ezetimibe ou 10 mg de sinvastatina (15,6% vs 15,4%). Ao final, a VMF apresentou aumento apenas nos pacientes que usaram sinvastatina.⁹⁸ Concordante com esses achados, também em portadores de insuficiência cardíaca, Gounari P. e cols, demonstraram em ensaio clínico, duplo-cego, cross-over, após quatro semanas de tratamento, com rosuvastatina ou ezetimibe, obtendo semelhante efeito redutor nos níveis de LDL-colesterol, que apenas o grupo da estatina promoveu melhora na VMF.⁹⁹

Em modelo de estudo duplo-cego e cross-over, Mäki-Petäjä e cols demonstraram que ambas terapias, sinvastatina 20 mg e ezetimibe 10 mg, melhoram a função endotelial pela VMF (64,9% vs 37,2%; $P = 0,10$). Entretanto, embora as reduções do LDL-colesterol tenham sido significativas, não foram semelhantes nos grupos testados ($-38,7\%$ vs $-17,9\%$; $P = 0,001$). Além desse fator, a população estudada, restringiu-se a portadores de artrite reumatoide ativa, com elevado grau inflamatório, limitando a abrangência dos resultados.¹⁰⁰

Dos trabalhos selecionados, três deles, compararam o efeito da estatina na função endotelial após redução não equivalente do LDL-colesterol, o que prejudicou a validade interna para análise correta da intervenção, por não ser independente do mais importante fator modificado com as terapêuticas. Foi possível observar nos estudos sobre a ação das estatinas, que quanto aos aspectos além da redução do LDL-c, são relativamente recentes as pesquisas e que ainda não há consenso quanto a relevância dos mecanismos prioritários que afetam a função endotelial com essa terapia.

Dos dez trabalhos avaliados, quatro deles apontaram para os efeitos pleiotrópicos como mecanismo na melhora da função endotelial, ao passo que os outros seis sugeriram que é o mecanismo hipolipídico responsável por esse incremento. Essa diferença de resultados pode ser atribuída a algumas razões relacionadas a heterogeneidade dos estudos, especialmente quanto às populações avaliadas e suas características clínicas distintas.

Foram estudadas amostras portadoras de condições clínicas diversas, como diabetes, dislipidemia, síndrome metabólica, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e artrite reumatoide. O contexto de graus diferentes de gravidade, principalmente em relação ao comprometimento vascular, pode influenciar na relevância do mecanismo pleiotrópico na ação das estatinas sobre a função endotelial. Situações onde o endotélio encontra-se previamente lesado e mais instável, como na doença arterial coronariana, demonstram uma maior responsividade a dose elevada de estatina, que exerce maior impacto no estado considerado pró-inflamatório, vasoconstrictor e pró-trombótico, inclusive com evidências de redução de eventos cardiovasculares.¹⁰¹

A partir do contexto inicial de morbidade e gravidade diferentes, outras características clínicas também não se equivalem na apresentação basal, como idade, LDL-c e a própria VMF. Cada um desses fatores podem exercer maior ou menor influência na modulação da função endotelial do tratamento com estatina.

Tabela I: Trabalhos que testaram a hipótese do estudo

Primeiro Autor	Revista/ Ano	Amostra final	Seguimento (semanas)	População	Estatina	Método	Resultado favorável	Redução igual do LDL
Fichtlscherer, S.	European Heart Journal, 2006	60	04	DAC estável	Atorvastatina Sinvastatina	Plestimografia venosa	Pleiotropia	Não
Settergren, M.	European Heart Journal, 2008	39	06	Diabetes e DAC estável	Sinvastatina	VMF e Plestimografia venosa	Redução do LDL	Sim
Ostad, M. A.	Atherosclerosis, 2009 Journal of American Heart Association, 2005	49	08	DAC	Atorvastatina	VMF	Pleiotropia	Sim
Landmesser, U.	American Heart Association, 2005	20	04	Insuficiência cardíaca	Sinvastatina	VMF	Pleiotropia	Sim
Kawagoe, Y.	Endocrine Journal, 2011	24	10	Dislipidemia e diabetes	Fluvastatina	VMF	Redução de LDL	Não
Liu, P	Circulation, 2009	60	04	Dislipidemia	Sinvastatina	VMF	Pleiotropia	Sim
Gounari, P.	Internacional Journal of Cardiology, 2010 Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2009	22	12	Insuficiência Cardíaca Isquêmica	Rosuvastatina	VMF	Pleiotropia	Sim
Araújo, D.B.	Journal of American College of Cardiology, 2007	23	08	Dislipidemia	Sinvastatina	VMF	Pleiotropia	Sim
Mäki-Petäjä, M.	Atherosclerosis 2013	20	06	Artrite reumatóide	Sinvastatina	VMF	Redução do LDL	Não
Westerink J.	Atherosclerosis 2013	100	06	Síndrome metabólica	Sinvastatina	VMF	Redução do LDL	Sim

DAC: Doença arterial coronariana; VMF: Vasodilatação mediada por fluxo; LDL: Lipoproteína de baixa densidade

3. RACIONAL TEÓRICO

A principal variável clínica com o uso das estatinas é o LDL-c plasmático, que leva quatro a seis semanas para mostrar redução, após o início do tratamento. Sua farmacodinâmica baseia-se mais na relação dose-efeito, do que a concentração-efeito.¹⁰²

As estatinas são inibidores reversíveis da enzima microsomal HMG-CoA reductase, que a converte em mevalonato. A pleiotropia atribuível às estatinas resulta, principalmente, da inibição da síntese de intermediários isoprenóides, da via do mevalonato e da biosíntese do colesterol, em particular o farnesil pirofosfato e o geranyl pirofosfato. Portanto, o caminho da inibição da síntese de isoprenóides é a que se relaciona com o pleiotropismo, relacionado às estatinas, enquanto que é distinta e independente a direção da redução lipídica, nessa etapa final.¹⁰³

A substância ezetimibe, por sua vez, reduz o colesterol através da absorção intestinal de lipídeos, sem interferência na via do mevalonato, permitindo que a análise dos efeitos pleiotrópicos das estatinas, mediados por este mecanismo, possa ser feita, sem o viés da influência de outra terapêutica com mecanismo similar. Seu papel no estudo é de potencializar o efeito hipolipemiante da sinvastatina baixa dose (10 mg), garantido semelhante redução do LDL-c ao grupo tratado com sinvastatina alta dose (80 mg).

A equivalência de potência redutora do LDL-c, para os esquemas terapêuticos propostos para comparação (sinvastatina 80 mg e sinvastatina 10 mg associada à ezetimibe 10 mg),¹⁰⁴ permite a avaliação do efeito pleiotrópico, de forma independente da redução do LDL-c, já que se estima não haver diferenças entre os grupos, no que concerne este aspecto. A hipótese pleiotrópica pode, portanto, ser testada pela utilização de doses diferentes de sinvastatina, sob a premissa de um gradiente dose-resposta, caso exista o mecanismo pleiotrópico.

Metas mais rigorosas de redução de LDL-colesterol foram sugeridas na intenção de maior redução de risco cardiovascular, baseando-se em inúmeros trabalhos com prevenção primária e secundária, derivados das evidências de correlação linear existente entre o efeito redutor lipídico com menor risco de eventos.

105

A avaliação de marcadores de risco relacionados a prognóstico tardio (desfechos substitutos), como especificamente a função endotelial, pela VMF e, também, inflamação, através da PCR, pode revelar se a influência sobre eles relaciona-se com maior dose de estatina utilizada e, portanto, além da redução do LDL-colesterol, estariam envolvidos os efeitos pleiotrópicos. Opostamente, se associado, primariamente, com a redução do LDL-colesterol, essa influência será independente da dose de estatina utilizada, ou seja, mesmo na combinação da baixa dose com o ezetimibe o efeito deverá ser igualmente observado.

Dados do Ministério da Saúde do Brasil, obtidos através do programa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL 2012) revelam que o excesso de peso e a obesidade, apresentaram avanço da proporção, passando de 43% de pessoas acima do peso, em 2006, para 51%, em 2012. No mesmo período, o percentual de obesos subiu de 11% para 17%. Nas mulheres, o envelhecimento tem forte influência sobre os indicadores, sendo que 25% das mulheres entre 18 e 24 anos está acima do peso, 40% na faixa etária entre 25 e 34 anos, chegando a 56% entre 45 a 54 anos.

Estudar o impacto do tratamento com estatinas na função endotelial em população com excesso de peso tem sua justificativa, não apenas pelas questões epidemiológicas, mas, especialmente, devido a existência do *status* inflamatório

presente nessa morbidade de caráter crônico, cujo mecanismo relaciona-se com as elevadas concentrações de citocinas plasmáticas, diretamente associadas ao comprometimento da função endotelial.¹⁰⁶ Dessa forma, a população escolhida para o estudo, de mulheres acima do peso e com LDL-c \geq 100 mg/dL, oferece potencial vascular para testar a hipótese da influência da dose de estatina na função endotelial.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

1. Testar a hipótese de que a terapia com estatina em alta dose oferece benefício endotelial superior à terapia com baixa dose de estatina, em cenário de equivalente redução de LDL-colesterol

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Definir o nível de evidência a respeito do valor prognóstico da vasodilatação mediada por fluxo, como fundamento do desfecho testado no objetivo principal.
2. Testar a acurácia e a reprodutibilidade do método manual de aferição da espessura médio-intimal carotídea, tendo o semiautomático como referência.

5. METODOLOGIA

Desenho do Estudo: Ensaio clínico randomizado, duplo-cego e placebo-controlado.

Registro de Ensaio Clínico: Identificador do Estudo no *Clinical Trials.gov* NCT01241097 (**Anexo 1**)

O presente trabalho tem protocolo de registro no sistema do Clinical Trial.gov, iniciado em 06/08/2010, sob o seguinte título em inglês: Pleiotropism of Statin Therapy in High Dose Versus Low Dose Combined With Ezetimibe. O registro seguiu as Normas Consolidadas do *CONSORT 2010*, que é utilizado mundialmente para melhorar o registro de estudo randomizado, ensaios controlados.¹⁰⁷

Local do Estudo: Ambulatório de Obesidade da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, em Salvador, Bahia. O trabalho contou com equipe multiprofissional da instituição, que oferece estrutura com consultórios devidamente aparelhados e salas de exames de eletrocardiografia, ergometria e ecocardiografia, atendendo em média 60 consultas por mês, o que permitiu a realização da pesquisa. Os exames laboratoriais foram realizados em um único laboratório central, vinculado ao ambulatório exceto a dosagem nefelométrica de PRC que foi feita em um segundo laboratório de referência, com selo de qualidade pela Sociedade de Patologia Clínica.

População alvo: Portadores de sobrepeso ou obesidade e com LDL-c ≥ 100 mg/dL.

População acessível: Mulheres matriculadas no Ambulatório de Obesidade da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, que os critérios para participar do estudo.

Seleção da População: Do universo de 72 mulheres, foram selecionadas 46 mulheres e randomizadas para as modalidades de tratamento, sendo 16 no grupo Sinvastatina 80 mg, 16 no grupo Sinvastatina 10 mg com ezetimibe 10 mg e 14 no Placebo. A seleção exclusiva do gênero feminino neste trabalho deveu-se ao perfil do próprio ambulatório, onde, após revisão de prontuários do setor, foi detectada uma distribuição de 95% de mulheres.

Critérios de Inclusão: Mulheres com índice de massa corpórea (IMC) ≥ 25 Kg/m², com idade superior a 18 anos e LDL-c ≥ 100 mg/dl.

Critérios de exclusão: Uso prévio, nos últimos três meses, de estatinas, ezetimibe ou fibratos, triglicérides > 400 mg/dL, creatinina sérica superior a 2,0 md/dl, enzimas hepáticas elevadas, maiores que uma e meia vezes o limite superior da normalidade; creatinafosfoquinase (CK) sérica superior a três vezes o limite superior da normalidade; gestantes; fase de amamentação; insuficiência cardíaca; doença psiquiátrica, demência de qualquer etiologia, ou terapia de reposição hormonal. Início recente, dentro das últimas quatro semanas, de tratamento com betabloqueador, inibidor de enzima de conversão ou bloqueador de canais de cálcio. Nesse caso, a intervenção seria realizada após período de pelo menos quatro semanas de uso contínuo. Também terapia com insulina em diabéticos e processos inflamatórios agudos no último mês, avaliados através da história clínica e exame físico (ouvido, garganta, lesões de pele ou outras manifestações inflamatórias), bem como relato de doenças crônicas como colagenoses, ou ocorrência de tuberculose ativa nos últimos três meses foram excluídos do trabalho. Além disso, PCR acima de 10 mg/dL, correspondendo a presença de inflamação subclínica.

Cr terios de interrup o: Intoler ncia ao uso das medica es; aumento das enzimas hep ticas superior a tr s vezes o limite superior da normalidade ou medida isolada de CPK superior a dez vezes o limite superior da normalidade.

Protocolo de Randomiza o: Foi realizado o protocolo de randomiza o em bloco, para assegurar uma distribui o igual do n mero de participantes nos grupos de estudo. Neste estudo, o tamanho do bloco foi de tr s, randomiza o procedeu normalmente dentro de cada bloco at  que a terceira pessoa fosse randomizada para um grupo; depois disto, os participantes foram automaticamente distribu dos para o outro grupo, e assim sucessivamente, at  completar cada grupo. A ordem rand mica de tr s em cada bloco foi gerada para sorteio a partir de aloca o computadorizada, com o programa “*Research Randomizer*” que utiliza o m todo *Math.random*”(www.randomizer.org).

O fluxograma do protocolo do estudo, segundo modelo do *CONSORT 2010*, encontra-se ilustrado na **Figura 1**.

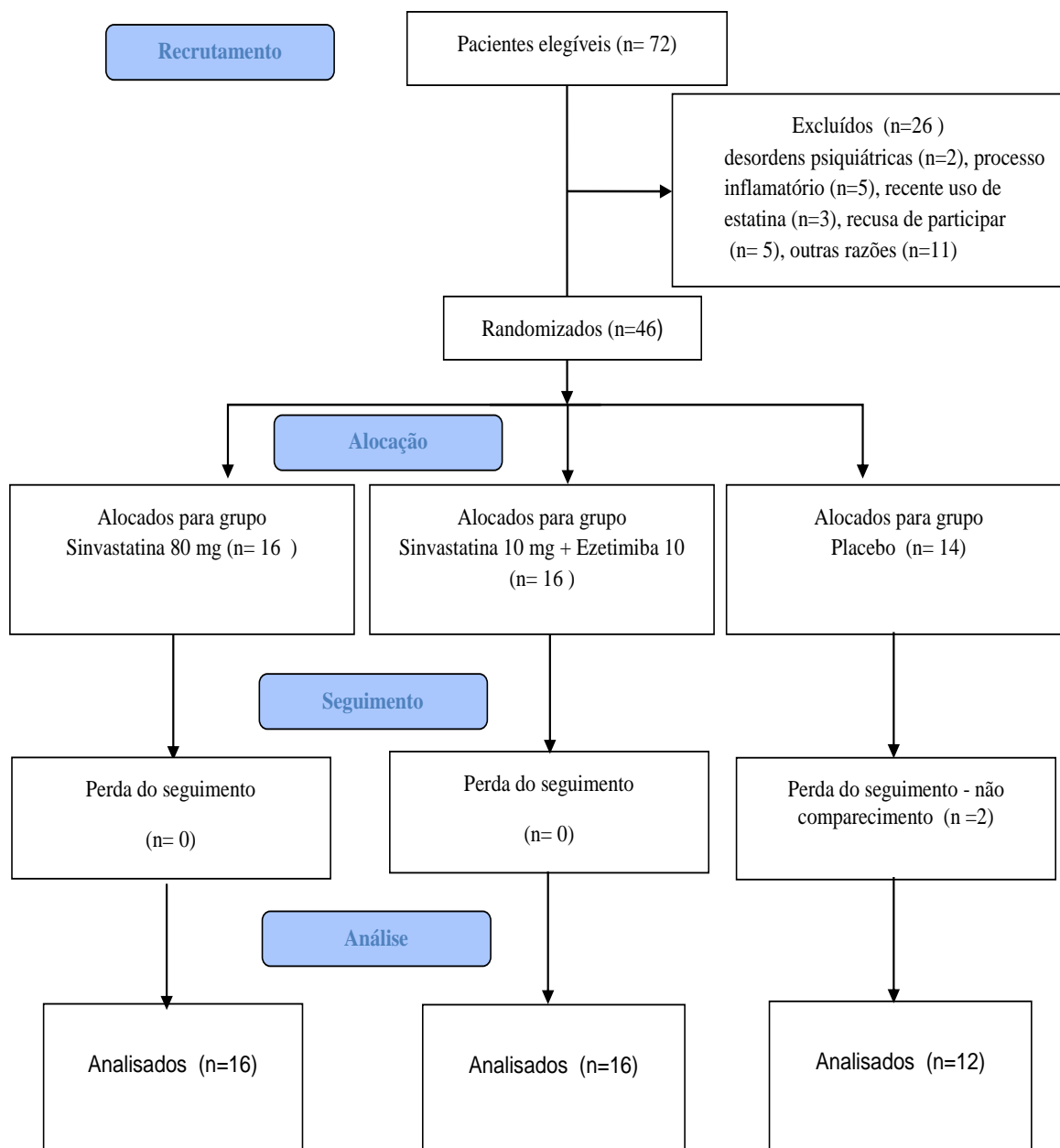


Figura 6- Fluxograma do Protocolo do Estudo

Cegamento: Foi realizado duplo cegamento, portanto, os pacientes não tiveram conhecimento para qual tratamento foi direcionado, e da mesma forma, o avaliador dos desfechos do estudo não conhecia a respeito da alocação ou dados clínicos. Na situação de ocorrência de efeitos colaterais significativos poderia ser revelado para o paciente e para dois dos pesquisadores qual era o tratamento em uso. Tais pesquisadores eram previamente designados como os responsáveis pela randomização e não realizavam os procedimentos de exames relacionados aos desfechos.

Foram adquiridas idênticas embalagens para os comprimidos dos três grupos de tratamento, em forma de frascos de plástico branco leitoso (polietileno de alta densidade) e com tampas e lacres também de polietileno. Não era possível a visualização do conteúdo dos frascos, devido ao seu aspecto leitoso, o que garantiu o cegamento, mesmo que os comprimidos de sinvastatina e ezetimibe, embora parecidos no tamanho, apresentassem diferença na tonalização da coloração. Cada frasco recebeu identificação alfanumérica, cuja correspondência terapêutica era conhecida apenas pelos dois pesquisadores previamente designados.

Para o tratamento com sinvastatina 80 mg, cada participante recebeu 2 frascos idênticos (A1 e A2), contendo em cada um sinvastatina 40 mg. Para o tratamento com a combinação sinvastatina 10 mg e ezetimiba 10 mg, cada participante recebeu dois frascos idênticos (B1 e B2), sendo um frasco com sinvastatina 10 mg e outro com ezetimibe 10mg. No grupo controle, cada participante também recebeu dois frascos idênticos (C1 e C2), contendo em cada frasco comprimidos inertes. -**Figura 2**



Figura 2- Representação dos frascos utilizados na pesquisa

Tratamento: Os pacientes foram randomizados para um dos três possíveis tratamentos: sinvastatina 10 mg e ezetimiba 10 mg; ou sinvastatina 80 mg; ou placebo, Todos foram orientados para fazer uso diariamente, à noite, tomando um comprimido de cada frasco, durante oito semanas.

Para o controle do uso correto da terapêutica, foi solicitado a todas as participantes que trouxessem os frascos dos comprimidos, sempre que comparecessem as visitas marcadas. Essa medida visava a contagem dos comprimidos para certificar do uso diário, na dose recomendada. Tratamento inadequado foi considerado se ausência de uso por mais 5 dias durante 4 semanas.

O placebo foi produzido por farmácia de manipulação de referência local, com insumo inerte, desprovido de propriedades farmacológicas ou terapêuticas, em forma de comprimidos pequenos com peso de 100 mg, constituído de sacarose. O uso dessa substância não compromete nem a dieta hipocalórica das pacientes, nem o controle glicêmico, dada sua pequena dosagem e baseado em informações das Diretrizes Brasileiras

de diabetes de 2009, segundo a qual, a sacarose não aumenta a glicemia mais do que quantidades isocalóricas de amido e, inclusive, alimentos contendo sacarose, não necessitam ser restringidos por pessoas com diabetes.

Visitas: Foram em número de três no total, divididas na seguinte cronologia: (1) a primeira visita constou da realização dos estudos ultrassonográficos, principalmente a VMF, coleta da amostra de sangue, para medidas dos marcadores bioquímicos basais, e para orientação nutricional padrão. Nessa visita eram entregues os frascos contendo os comprimidos; (2) a segunda visita, após quatro semanas, teve o objetivo de novas medidas de função endotelial, que testou se houve maior precocidade do efeito na VMF em algum dos grupos. Também foi coletado amostra de sangue para avaliar as variáveis lipídicas e possíveis parâmetros da terapêutica, com dosagem de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), CPK e creatinina; (3) Após oito semanas, na terceira visita, houve a última avaliação ultrassonográfica, dessa vez, para avaliar o desfecho final, a VMF e, por conseguinte, a variação da VMF do basal para a oitava semana (o delta na função endotelial). Também foram repetidas todas as medidas bioquímicas realizadas antes dos tratamentos. Além disso, foi avaliada a função diastólica do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma.

Coleta dos Dados

Questionário

Foi aplicado a todas as participantes um questionário clínico estruturado (**Anexo 2**), contendo dados de identificação, idade, gênero, cor da pele auto-referida (segundo classificação do IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), interrogatório sobre sintomas, hábitos de vida e antecedentes médicos. Tabagismo foi definido como uso regular de qualquer forma de tabaco, hábito presente ou passado, desde que interrompido há no máximo um ano; etilismo foi considerado como ingestão de bebida alcoólica ao menos três vezes por semana; sedentarismo definido pela não realização de atividade física regular pelo menos três vezes por semana; e história familiar considerada positiva quando da ocorrência de doença arterial coronariana prematura em parentes de primeiro grau, antes dos 65 anos em mulheres e antes dos 55 anos em homens.¹⁰⁸

Exame Físico

O exame físico foi realizado de forma completa e incluiu a avaliação antropométrica (**Anexo 2**). Todas as participantes tiveram aferidas a frequência cardíaca de repouso, a pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica. O local de aferição da pressão arterial foi o braço esquerdo, estando os indivíduos sentados por pelo menos 5 minutos, com bexiga vazia, sem terem fumado ou ingerido bebida alcoólica ou contendo cafeína, nos 30 minutos que antecederam às tomadas. Foi utilizado tensiômetro aferido na calibração periodicamente, com dimensões de braçadeira apropriadas para braços de pacientes obesos.

A circunferência abdominal foi medida na distância média entre a última costela flutuante e a crista ilíaca, utilizando fita métrica inelástica. O quadril foi medido com fita

métrica na altura dos trocânteres femurais. Peso e altura foram medidos em balança biomédica e destas medidas derivou o índice de massa corpórea, através da fórmula de Quetelet, que divide o peso pela altura ao quadrado.¹⁰⁹ Foi calculada a área de superfície corpórea (ASC), para posterior indexação das medidas cavitárias obtidas pelo ecocardiograma, de acordo com a seguinte fórmula: $0,007184 \times (\text{peso em kg})^{0,425} \times (\text{altura em metros})^{0,725}$.

Exames Laboratoriais

As coletas e análises sanguíneas foram feitas em um único laboratório central, sediado no próprio Ambulatório (ADAB), seguindo técnicas específicas. Foi encaminhado para dosagem no segundo laboratório, também de referência e com selo de qualidade pela SPC, exclusivamente, proteína C reativa de alta sensibilidade. (**Anexo 3**).

As coletas do sangue foram realizadas, após 12 horas de jejum, seguindo as técnicas e métodos padronizados pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. A dosagem de PCR foi realizada pelo método nefelométrico, comercialmente disponibilizado Dade Behring Inc., Newark, DE, USA. Este método mede a aglutinação das partículas recobertas por anticorpos pela intensidade da luz refletida, utilizando o equipamento BN 100.¹¹⁰ Para glicemia, foi utilizado o método do sistema de química clínica Dade Behring-Dimension RXL- DADE Behring Inc., Newark, DE – USA e o reagente do Kit Flex Cartriabe da Dade Behring-Dimension® IVD Dimension®, que serve para diagnóstico in vitro da determinação quantitativa da glicose no soro, plasma. O método da glicose é uma adaptação do método hexoquinase-glicose-6-fosfato desidrogenase, já validado como um método de laboratório clínico geral. As medidas da concentração plasmática de colesterol total (CT), triglicérides e lipoproteína de alta densidade, o HDL-colesterol (HDL-c) foram obtidas por meio de método bioquímico enzimático; LDL-c foi calculado através da equação de Friedewald:¹¹¹ $\text{colesterol total} - (\text{HDL-c} + \text{triglicérides}/5)$. O equipamento

utilizado para a dosagem dos triglicérides, colesterol total e HDL-c foi o Dade Behring-Dimension RXL- DADE Behring Inc., Newark, DE – USA, e o reagente do Kit Flex Cartriabe da Dade Behring-Dimension® IVD.

Para este trabalho, foram realizadas três coletas sanguíneas uma, na primeira visita (marcadores basais), e as subsequentes, após quatro e oito semanas de tratamento.

Risco de Framingham

A estimativa de risco de infarto ou morte para 10 anos foi calculada utilizando o Escore de Risco de Framingham, usando a tabela para o gênero feminino, classificando em baixo, intermediário ou elevado risco.¹¹² (**Anexo 3**) Tal estimativa de risco, além de caracterizar a população do estudo, poderá ser utilizada para futuras análises, em grupos específicos, quanto à correlação com fatores de risco, e em trabalho prospectivo com desfechos clínicos.

Avaliação da Vasodilatação Mediada por Fluxo da Artéria Braquial

Os exame fundamental que forneceu a variável indispensável para testar a hipótese da pesquisa foi a VMF para a avaliação da função endotelial pré e pós tratamento. (**Anexo 4**).

Foi utilizado aparelho de ultrassonografia com Doppler colorido, de alta resolução, da marca GE, modelo Vivid 3, com sonda de 7,5 MHz e o exame foi realizado segundo diretriz previamente publicada¹¹³ (**Anexo 5**). Os pacientes foram estudados em jejum de quatro horas, em repouso, na posição deitada, com temperatura ambiente controlada (22° a 24° C), tendo permanecido pelo menos dez minutos repousando deitado, antes do exame. Os exames foram realizados por um único examinador, a pesquisadora principal do estudo. A monitorização eletrocardiográfica simultânea com o sistema de ultrassom permitiu a sincronização com o ciclo cardíaco. A artéria braquial era identificada no eixo longitudinal,

três centímetros acima da fossa antecubital. Uma imagem longitudinal de seis a oito centímetros era adquirida como basal. Posteriormente era obtido o fluxo e estimada a velocidade média de uma amostra-volume no meio da artéria, com 60° de angulação do vaso. Em seguida, era inflado o esfigmomanômetro, posicionado no antebraço, até pelo menos 50 mmHg acima da pressão sistólica, para ocluir a artéria, durante 5 min. Subsequentemente, era desinflado, induzindo breve estado de alto fluxo, ou hiperemia reativa, e após um minuto, obtida a imagem da vasodilatação mediada por fluxo, representante da dilatação dependente do endotélio, devido ao efeito da produção do óxido nítrico, causada pelo estresse de cisalhamento (*shear stress*). Foi registrado em gravação contínua, em forma de imagem em movimento, com início 30 segundos antes da desinflação até 2 minutos após. São considerados valores normais de VMF os percentuais superiores a 7%.^{114, 115} **Figura 3**

A imagem correspondente a segunda fase de repouso foi adquirida após 15 min. Novamente, adquiria-se o Doppler do fluxo da artéria braquial, após a liberação do *cuff* e antes de completar 15 segundos após a desinflação, registrando a velocidade da hiperemia. Por último, a vasodilatação independente do endotélio era medida pelo cálculo da resposta vasodilatadora, quatro minutos após a administração sublingual de dinitrato de isossorbida, 5mg (comercialmente conhecido como isordil). Essa segunda fase, era avaliada dez minutos após repouso da primeira, ou seja, da hiperemia reativa. A mudança percentual no diâmetro da artéria era calculada em relação a sua respectiva medida basal, e a razão da mediação por fluxo pela mediação por nitrato (VMN) era também calculada (VMF/VMN). Neste contexto proporcional, pode-se avaliar a resposta da função do tecido muscular vascular. Foi também gravado continuamente a vasodilatação após 3 minutos do uso do nitrato. Em indivíduos com hipotensão, bradicardia ou cefaléia esta etapa do exame não foi feita.

Para a atual pesquisa o foco foi na vasodilatação dependente do endotélio, sendo as análises centradas exclusivamente nos diâmetros arteriais e seus percentuais de dilatação. Não foram utilizados nas análises valores de velocidades de fluxo ou a fase da vasodilatação independente do endotélio (com uso de nitrato).

Foram programadas três medidas da função endotelial para cada participante, a basal (primeira visita), uma após quatro semanas de tratamento (segunda visita) e outra, após oito semanas do tratamento (terceira visita).

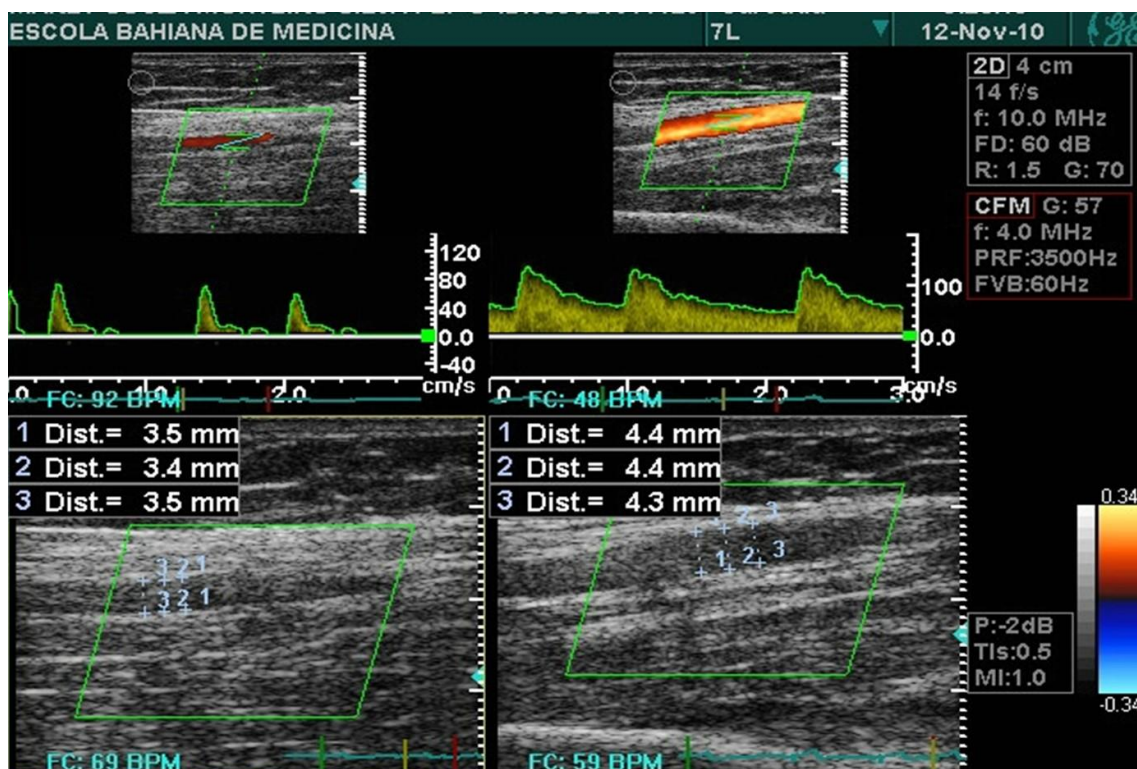


Figura 3. Exame de Vasodilatação Mediada por Fluxo - Imagem de um dos exames da pesquisa realizado no Laboratório de Ultrassonografia da EBMSP

Avaliação das Medidas Ecocardiográficas

O exame de ecocardiograma transtorácico foi realizado com o mesmo aparelho de ultrassom da VMF, comercialmente disponível (Vivid 3, GE), equipado com transdutor setorial

eletrônico, multifrequencial, de 2 a 4 MHz. O equipamento possui recursos de Doppler pulsado, Doppler contínuo, Doppler tecidual, mapeamento de fluxo a cores e monitorização eletrocardiográfica simultânea. As imagens foram digitalizadas e armazenadas para posterior análise.

As dimensões cavitárias foram medidas e a fração de ejeção calculada, através do modo unidimensional. A função diastólica do ventrículo esquerdo foi avaliada através do Doppler pulsado e Doppler tecidual, e classificada em normal ou com disfunção em graus I, II e III.¹¹⁶ O volume de átrio esquerdo foi determinado pelo método de Simpson, utilizando o corte apical 4-câmaras e indexado pela área de superfície corpórea.¹¹⁷ A massa do ventrículo esquerdo calculada de acordo com a fórmula de Devereux e indexada pela área de superfície corpórea.¹¹⁸ Hipertrofia ventricular esquerda foi definida como índice de massa de ventrículo esquerdo $> 115 \text{ g/m}^2$ para homens e 95 g/m^2 para mulheres e disfunção sistólica definida como fração de ejeção $< 55\%$. Como alterações valvares, foram consideradas as estenoses de qualquer grau e os refluxos superiores ao grau leve. Os exames de ecocardiografia foram realizados na primeira visita de forma completa e, após oito semanas de tratamento, foram analisados, especificamente, os parâmetros da função diastólica, com Doppler pulsado e Doppler tecidual. (**Anexo 6**)

Medida da Espessura Médio-intimal Carotídea

Os exames de ultrassonografia de carótidas, seguindo metodologia previamente estabelecida¹¹⁹, foram realizados na primeira visita, como um marcador basal da carga aterosclerótica de cada participante. **(Anexo 6)**

As participantes foram examinadas em posição deitada, com rotação da cabeça para o lado oposto ao examinado, em 45° da linha média e mínimo suporte abaixo do pescoço. Não foi utilizada harmônica, apenas frequência fundamental, para não criar falso aumento da espessura médio-intimal (EMIC). As artérias carótidas direita e esquerda foram avaliadas utilizando o mesmo aparelho de ultrassom bidimensional de alta resolução (Vivid 3, GE), conectado com transdutor linear de 7,5 MHz. Foi realizada a armazenagem digital das imagens para análise “off-line” das medidas.

Inicialmente, varreduras longitudinais e transversais das carótidas direita e esquerda, foram adquiridas, partindo de sua origem, passando pelo bulbo e bifurcação, até ramo interno, objetivando a pesquisa de placa de ateroma. Imagens longitudinais foram obtidas da artéria carótida comum (ACC), bilateralmente, em diástole, com foco na parede afastada do transdutor, para a medida da espessura médio-intimal carotídea.

Placa de ateroma foi definida como lesão ecogênica focal, com protusão na camada íntima superior a 1,5 mm e classificada conforme a presença de calcificação, como placa com ou sem sombra acústica.¹²⁰ Espessura médio-intimal de carótidas foi definida como a distância entre a borda externa da primeira linha brilhante e a borda externa da segunda linha brilhante da parede posterior, portanto, entre as duas linhas ecogênicas representadas pelas interfaces lúmen-íntima e média-adventícia da parede arterial.¹²¹ As medidas de EMIC foram realizadas pelos métodos manual e semiautomático.

A análise manual da EMIC foi feita, em ambas artérias carótidas comuns, através de três medidas ponto a ponto. O primeiro ponto era posicionado na borda superior da

linha divisória entre o lúmen e a camada íntima e o segundo ponto na borda superior da linha divisória entre a camada média e adventícia, determinados manualmente pelo examinador, a um centímetro do bulbo, com aproximadamente um milímetro entre as medidas. A EMIC manual (EMICmanual), de cada lado, foi definida como a média dessas três medidas. A média da EMI carotídea comum esquerda e direita foi considerada como EMI carotídea composta (EMICcomposta). As medidas foram realizadas na parede afastada do transdutor da ACC, considerando ser este local mais acessível e menos sujeito a falhas técnicas na obtenção, comparado com as medidas em artéria carótida interna e bulbo carotídeo.¹²²⁻¹²⁵

As medidas semiautomáticas, padrão de referência, foram realizadas por software reconhecedor de bordas (*Vivid 3 Pro IMT software analyzer*). Nesse método, a medida é iniciada com um clique do mouse no lúmen do vaso, no limite do lado esquerdo do segmento arterial de interesse e delimitado pelo segundo clique no limite à direita, com aproximadamente um centímetro entre eles. A detecção das interfaces lúmen-íntima e média-adventícia dentro do segmento arterial delimitado é feita automaticamente com base na imagem, intensidade e informação de gradiente. São, em média, 100 pontos de amostras aferidas, dependendo dos parâmetros de aquisição de imagem, como frequência e profundidade. Foram obtidas as medidas semiautomáticas máxima (EMICsamax) e média (EMICsam) da espessura médio-intimal. - **Figura 4**

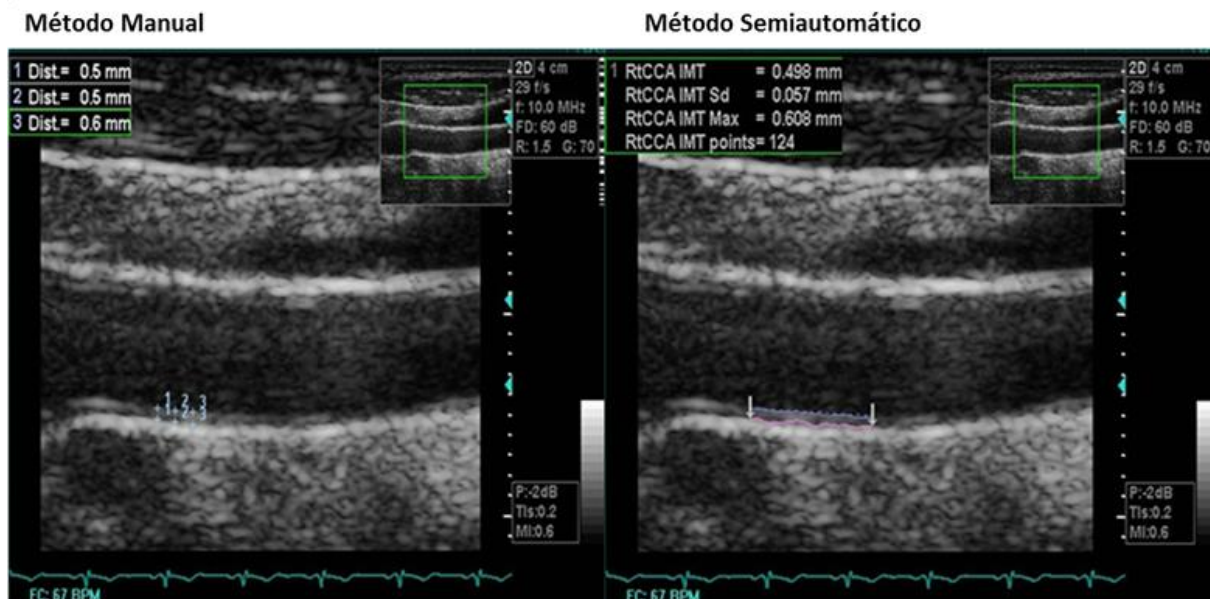


Figura 4- Medidas manual e semiautomática da espessura médio-intimal carotídea- Imagem de um dos exames da pesquisa realizado no Laboratório de Ultrassonografia da EBMSP

Registro de Eventos Adversos

Todos os eventos adversos foram registrados (**Anexo 7**) e classificados como maiores (rabdomiólise, insuficiência hepática, insuficiência renal, morte, pancreatite, icterícia obstrutiva), intermediários (mialgia moderada, diarreia, vômitos, dentre outros) e menores (constipação, náuseas, flatulência, mialgia leve, dentre outros). O acompanhamento dos eventuais efeitos colaterais da terapêutica foi feito através de exames laboratoriais e aplicação de questionário, nos retornos com quatro e oito semanas. É importante registrar que as participantes possuíam o contato telefônico dos pesquisadores responsáveis pela randomização, podendo avisar da ocorrência de efeitos colaterais indesejados.

Hábitos alimentares e Atividade Física

Todas os participantes foram questionados, na última visita, sobre os hábitos alimentares e atividade física desenvolvida, no período do estudo, utilizando como instrumento, para este último, o questionário validado do IPAQ (Interantional Physical Activity Questionaire), na sua versão curta (**Anexo 8**). Pretendeu-se, dessa forma, certificar que, além da randomização e uniformização de orientações oferecidas, os indivíduos não diferiram significativamente na dieta ou gasto energético.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Hipóteses Estatísticas

Hipótese nula (H_0): As mudanças percentuais da VMF entre os grupos A (sinvastatina 80 mg) e B (sinvastatina 10/ezetimibe 10) são semelhantes.

Hipótese alternativa (H_1): As mudanças percentuais da VMF entre os grupos A (sinvastatina 80 mg) e B (sinvastatina 10/ezetimibe 10) são diferentes.

Operacionalização das Variáveis

Variável Dependente (Desfecho Final Primário): Percentual de mudança da vasodilatação da artéria braquial mediada por fluxo, após o tratamento de oito semanas.

Covariáveis: características clínicas, marcadores bioquímicos e ultrassonográficos.

Testes estatísticos utilizados

As características clínicas gerais foram comparadas entre os grupos pelo teste t de Student não pareado, quando variáveis contínuas, ou qui-quadrado, quando categóricas. Quando necessário teste não paramétrico, usou-se teste de Mann-Whitney. Já na comparação no mesmo grupo, entre pré e pós-tratamento, foi realizado teste t de Student ou Wilcoxon signed rank.

A vasodilatação mediada por fluxo (VMF) foi calculada como a variação percentual no diâmetro da artéria após a hiperemia. O efeito do tratamento na função endotelial foi medido primariamente pela variação percentual da VMF entre o momento basal e após oito semanas de tratamento. Esta variável foi comparada entre os dois grupos de tratamento pelo teste de Mann-Whitney. Na análise intra-grupos, a medida da VMF foi comparada

entre antes e depois do tratamento, em cada grupo separadamente, pelo teste de Wilcoxon sign-rank. Para comparação pareada da VMF entre os três momentos (basal, 4 semanas, 8 semanas) foi utilizada análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas. Esta análise também foi utilizada para comparar os efeitos dos tratamento em se considerando os três momentos, através da interação entre grupo e momento. Eventuais variáveis de confusão decorrentes de diferenças clínicas entre os grupos foram ajustadas através da análise de covariância (ANCOVA). Análise de covariância foi usada para ajustar o efeito dos tratamento para a idade.

Secundariamente, a variação percentual da VMF entre o basal e a oitava semana dos grupos de tratamento ativo foram comparadas com o grupo placebo pelo teste de Mann-Whitney. Neste caso, não optamos pela comparação simultânea dos três grupos (ANOVA), pois esta foi considerada análise complementar, que não dizia respeito ao teste de hipótese principal do trabalho. Comparação entre os grupos considerando a análise intermediária (quarta semana) foram tratadas da mesma forma, por se tratarem também de análise complementar.

Associação linear entre as variações de LDL-colesterol e na vasodilatação mediada por fluxo foi testada pelo coeficiente de correlação de Spearman. Valores de probabilidade bi-caudais $< 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão para as variáveis contínuas e porcentagem para as variáveis categóricas. Variáveis que fugiram da normalidade na distribuição foram expressas por mediana e intervalo interquartil. Foi utilizado para a análise estatística o software Statistical Package for Social Sciences, Versão 20 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Il).

Tamanho Amostral

O tamanho amostral foi estimado *a priori* no intuito de promover poder estatístico de 90% ($\alpha = 5\%$) para detectar diferença absoluta de 20% entre os grupos (sinvastatina e sinvastatina/ezetimibe) na variação da vasodilatação mediada por fluxo obtida com o tratamento (comparação intergrupo). Utilizamos a premissa pessimista de que o desvio-padrão do delta em cada grupo seria em torno de 15%, resultando na necessidade de 13 pacientes em cada grupo.

Tal amostra foi determinada, através do programa *WINPEPI (computer programs for epidemiologists)*,¹²⁶ versão 11.32, em teste de “*compare means*”, no modelo de equivalência de médias entre grupos.

7. ASPECTOS ÉTICOS

7.1 QUANTO À SEGURANÇA DOS EXAMES

As voluntárias foram orientados claramente sobre os exames, e a respeito do procedimento da VMF, inclusive do uso de nitrato sublingual e seus eventuais efeitos secundários, como hipotensão e cefaléia, entretanto, as participantes foram observadas em unidade dotada de profissionais habilitados e todo material necessário para suporte e tratamento de eventuais efeitos adversos. No caso de hipotensão seria adotada posição horizontal com elevação dos membros inferiores, sendo mantida nesta posição até sua total recuperação. Se não fosse suficiente para resolver o problema, seria utilizada expansão volêmica venosa, com solução fisiológica ou Ringer lactato.

A fase da resposta vasodilatadora mediada por nitrato não poderia ser realizada em pacientes com bradicardia, hipotensão clinicamente significativa ou cefaléia, conforme recomendado pelo protocolo da Força Tarefa Internacional de Reatividade da Artéria Braquial.¹¹³

Os demais exames do estudo foram dosagens séricas, ecocardiograma e ultrassonografia de carótidas, que eram isentos de riscos.

7.2 QUANTO A SEGURANÇA DAS TERAPIAS

7.2.1 Estatina

O uso de estatina é seguro, independentemente da magnitude da redução das taxas de colesterol. A incidência de miopatia é baixa, de 0,00011%, ao ano e doença hepática com

desordem hepatobiliar é rara, sendo a ocorrência de insuficiência hepática de 0,000001%, ao ano. Doença renal ou proteinúria não é freqüente e queda da filtração glomerular demonstrou ser menos freqüente nos grupos de tratamento do que nos placebo. As estatinas podem causar neuropatia, mas com risco atribuível de 0,00012%, ao ano, e não é causa de deficit cognitivo em idosos.¹²⁷

A utilização de doses elevadas de estatina, em indivíduos com níveis de LDL-c normais ou próximos da normalidade, já testada em grandes estudos, demonstrou segurança, revelando baixo índice de descontinuação (2,5%), de elevação de transaminases (1%) e de miopatia (0,5%).¹²⁸ Questionamentos sobre riscos de desenvolvimento de câncer foram estudados e considerados ausentes, como mostrou recente metanálise, concluindo que não há aumento do risco de mortalidade por câncer com tratamento com estatinas.¹²⁹

Durante o estudo, houve acompanhamento dos potenciais efeitos adversos e tolerância a medicação, sendo medidas as taxas de função hepática, renal e de CPK, na seleção, com quatro semanas, e no final, com oito semanas. Estas avaliações visaram identificar para-efeitos da terapêutica e, se necessário, a interrupção da mesma.

A pesquisa seria interrompida, a qualquer instante, no caso do participante não mais desejar participar, se ocorresse elevação de ALT e/ou AST acima de três vezes o limite superior da normalidade, se ocorresse elevação de CPK acima de dez vezes o limite superior da normalidade. Tais efeitos são reversíveis com a suspensão da medicação¹³⁰. Haveria interrupção, também, se apresentasse efeitos adversos graves (risco de morte ou necessidade de hospitalização). Em qualquer destas situações, o Comitê de ética em Pesquisa seria imediatamente comunicado.

7.2.2 Combinação Ezetimibe com Estatina

A segurança e tolerância ao esquema combinado de ezetimibe com estatina são semelhantes ao tratamento com monoterapia de estatina.¹³¹ Neste trabalho, a combinação usada foi com estatina em baixa dose.

7.3 Princípio da Beneficência

Foram entregues os laudos dos exames laboratoriais, de ecocardiografia e Doppler de carótidas com medida da espessura médio-intimal para as participantes do trabalho. As pacientes que necessitaram, foram encaminhadas para acompanhamento no ambulatório, onde continuaram sob vigilância, mantendo tratamento da dislipidemia e outras comorbidades.

7.4 Princípios bioéticos em Pesquisa em Seres Humanos

O presente estudo atendeu aos princípios bioéticos em Pesquisa em Seres Humanos, segundo a Resolução 196/96 do Ministério da Saúde e com a Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, sob protocolo de número 157/2009 (**Anexo 9**), primariamente na data de 15/01/2010, com posterior aprovação de adendo em 01/08/2010 (**Anexo 10**). A participação na pesquisa foi explicada em detalhes a todas as voluntários, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (**Anexo 11**), quando aceitaram participar. Não houve qualquer custo para as participantes da pesquisa.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterização da População

A população caracterizou-se por ser composta de mulheres adultas jovens, idade média de 43 ± 10 anos, com excesso de peso, adiposidade abdominal, e com alterações consideradas leves nos níveis de pressão arterial ($132 \pm 17 \times 84 \pm 12$ mmHg) e de lípidas séricas, como LDL-colesterol de 137 ± 31 mg/dL e triglicérides de 129 ± 66 mg/d. Não havia comprometimento da função renal ou das enzimas hepáticas nas participantes, que apresentavam mediana de PCR aumentada, em 3,57 (IQ=5,03). Foi observado também que a média percentual da vasodilatação mediada por fluxo demonstrava predomínio de função endotelial normal ($8,5\% \pm 4,3\%$).

Na população estudada, a análise categórica das características clínicas demonstrou, quanto aos hábitos de vida, que 24% foi ou é tabagista, 33% etilista e 41% tentava fazer controle alimentar. Diagnóstico de hipertensão arterial estava presente em 41%, hiperglicemia em 65%, diabetes em 9% e dislipidemia em 74%. Havia antecedentes familiares de doença cardiovascular em 65% das participantes. Quanto a classificação de risco de Framingham, todas as pacientes eram de baixo risco cardiovascular, com risco calculado inferior a 6%, excetuando uma participante, que foi classificada como de elevado risco cardiovascular, com 22% de risco calculado de infartar ou morrer em 10 anos, sendo integrante do grupo que usou a combinação sinvastatina 10 mg com ezetimibe 10 mg.

Na avaliação das categorias terapêuticas antihipertensivas, no grupo sinvastatina 80 mg, as cinco pacientes hipertensas faziam uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II, bloqueadores beta-adrenérgicos e bloqueadores adrenérgicos de ação central, semelhante às seis participantes

da combinação sinvastatina 10 com ezetimibe 10 e às oito hipertensas do grupo placebo, que além desses, a mais, usavam diuréticos tiazídicos. Quanto aos hipoglicemiantes, 12% da população utilizava metformina e apenas uma paciente fazia uso de sulfoniuréia.

Importante registrar que os níveis basais de LDL-colesterol não apresentaram diferenças entre os grupos de tratamento, sendo de 132 ± 25 mg/dL a média inicial no grupo de sinvastatina alta dose, de 145 ± 40 mg/dL no grupo da combinação baixa dose de sinvastatina com 10 mg de ezetimibe e de 136 ± 27 mg/dL no grupo placebo. Da mesma forma, a vasodilatação mediada por fluxo foi semelhante entre os grupos, sendo sinvastatina 80 mg ($8,4\% \pm 4,3\%$), sinvastatina 10 mg/ ezetimibe 10 mg ($7,6\% \pm 3,9\%$) e placebo ($9,8\% \pm 4,5\%$), ($P = 0,31$). Não houve diferenças significativas entre os grupos de tratamento em relação às características clínicas e laboratoriais e classes de anti-hipertensivos, exceto pela a idade, que foi maior no grupo sinvastatina 10 mg / ezetimiba 10 mg ($48 \pm 8,1$ anos), seguido pelo grupo sinvastatina 80 mg ($41 \pm 8,6$ anos) e o grupo de placebo (40 ± 12 anos) ($P = 0,05$). - **Tabela 1**

8.2 Efeito antilipêmico dos tratamentos

Durante as oito semanas do estudo, não ocorreram interrupções nos tratamentos, sendo plena e idêntica a aderência nos três grupos. Nenhum efeito colateral que necessitasse a suspensão do tratamento foi registrado. Eventos clínicos leves a intermediários foram referidos, sendo cefaléia o mais frequente (um caso no grupo sinvastatina, um caso no grupo sinvastatina/ezetimibe e três no grupo placebo), seguido de dores leves nas pernas (um caso no grupo sinvastatina 80 e um caso no grupo sinvastatina/ezetimibe) e episódio de vômito (um caso no grupo sinvastatina/ezetimibe).

Observou-se que os dois tratamentos, sinvastatina 80 mg e combinação sinvastatina 10 com ezetimiba 10 mg, apresentaram semelhante efeito redutor sobre o LDL-colesterol,

com redução proporcional em oito semanas, de $27\% \pm 31\%$ no primeiro e de $30\% \pm 29\%$ no segundo ($P = 0,75$). Na dosagem do LDL-colesterol com quatro semanas, tal significativo efeito redutor já se evidenciava, também sem diferença entre os grupos ($-45\% \pm 17\%$ vs $-37\% \pm 20\%$, $P = 0,33$).

Não houve efeito exercido pelo tratamento placebo nos níveis de LDL-colesterol, que passou de 136 ± 27 mg/dL para 137 ± 29 mg/dL ($P = 0,74$), sendo evidente as diferenças de efeito deste grupo com o grupo sinvastatina 80 mg ($P = 0,017$) e com o grupo da terapêutica combinada sinvastatina 10 mg com ezetimibe 10 mg ($P = 0,006$). **Figura 2;**

Tabela 2

Com excessão do LDL-colesterol e colesterol total, todas as demais características clínicas permaneceram com valores semelhantes entre os três grupos de tratamento, tanto na avaliação da quarta semana, quanto na de oitava semana.

Não houve variação significativa do HDL-colesterol ou dos triglicérides plasmáticos em nenhum dos três grupos de tratamento, exceto por redução do triglicérides limitada ao grupo sinvastatina alta dose. No período avaliado, não houve modificação na média de IMC nos grupos tratados. Da mesma forma, pressão arterial, glicemia e PCR permaneceram constantes.

Elevação dos níveis médios de CPK ocorreu de forma significativa apenas no grupo que utilizou sinvastatina em alta dose, já observado na quarta semana, entretanto, os grupos mantiveram-se semelhantes entre si nos valores médios dessa variável, tanto na avaliação de quatro semanas de tratamento ($P= 0,12$), quanto na última ($P = 0,10$). Ambos grupos ativos demonstraram promover aumento leve, porém com significância estatística, da enzima hepática ALT, na oitava semana de intervenção. Não se detectou diferença na avaliação comparativa entre as médias dos grupos em geral ($P= 0,17$). -**Tabela 3**

Tabela 1. Comparação das características clínicas e laboratoriais entre os grupos tratados

	Sinvastatina	Sinvastatina/Ezetimibe	Placebo	P
Amostra	16	16	14	
Idade (anos)	41 ± 8,6	48 ± 8,1	40 ± 12	0,05
IMC (kg/m ²)	35 ± 4,3	36 ± 4,4	36 ± 8,6	0,90
Cintura (cm)	107 ± 7,6	108 ± 9,9	107 ± 17	0,94
Cintura/quadril	0,92 ± 0,71	0,92 ± 0,67	0,91 ± 0,56	0,84
PAS (mmHg)	133 ± 15	132 ± 18	130 ± 18	0,86
PAD (mmHg)	85 ± 9	86 ± 13	81 ± 14	0,52
Colesterol total (mg/dL)	205 ± 29	225 ± 47	206 ± 33	0,26
HDL colesterol (mg/dL)	49 ± 11	52 ± 12	49 ± 11	0,75
LDL colesterol (mg/dL)	132 ± 25	145 ± 40	136 ± 27	0,50
Triglicérides (mg/dL)	125 ± 51	145 ± 92	115 ± 41	0,46
PCR (mg/dL)	3,9 (2,1 – 8,1)	3,0 (1,8 – 5,1)	3,3 (1,2 – 7,2)	0,70
Glicemia (mg/dL)	94 ± 13	123 ± 82	94 ± 19	0,22
Ureia (mg/dL)	29 ± 7,3	29 ± 8,3	26 ± 6	0,42
Creatinina (mg/dL)	0,83 ± 0,11	0,79 ± 0,12	0,85 ± 0,18	0,55
AST (U/L)	18 ± 5,1	20 ± 4,6	20 ± 11	0,71
ALT (U/L)	18 ± 5,1	20 ± 4,6	20 ± 11	0,71
GGT (U/L)	32 ± 11,74	42 ± 22,99	42 ± 23,70	0,27
CPK (mg/dL)	123 ± 60	168 ± 88	109 ± 62	0,07
Hipertensão	5 (31%)	6 (38%)	8 (57%)	0,33
IECA	2 (13%)	0 (0%)	4 (29%)	0,07
BRA	1 (6,3%)	2 (13%)	2 (14%)	0,75
VMF	8,4% ± 4,3%	7,6% ± 3,9%	9,8% ± 4,5	0,31

IMC: Índice de massa corpórea, PAS: Pressão arterial sistólica, PAD: Pressão arterial diastólica, HDL: Lipoproteína de alta densidade, LDL: Lipoproteína de baixa densidade, PCR: Proteína C reativa, AST: Aspartato aminotransferase, ALT: Alanina aminotransferase, GGT: Gama glutamiltransferase, CPK: Creatinofosfoquinase, IECA: Inibidor da enzima conversora da angiotensina, BRA: Bloqueador do receptor da angiotensina, VMF: Vasodilatação mediada por fluxo

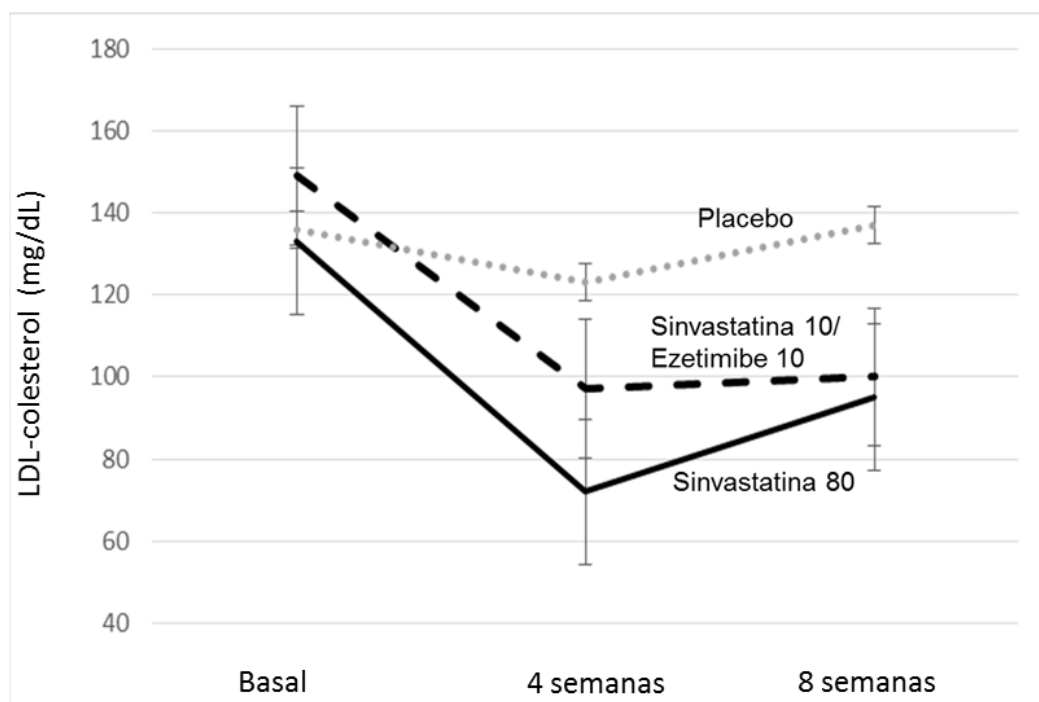


Figura 2: Efeito dos tratamento no LDL-colesterol, mostrando significativa redução da lipoproteína nos grupos ativos.

Tabela 2- Efeito nos perfis lipídico e metabólico nos três grupos, com quatro e oito semanas

	Basal	8 Weeks	P Value	4 Weeks	P Value (4 vs. 8 weeks)
Simvastatin					
LDL-colesterol (mg/dL)	133 ± 26	95 ± 44	0,006	72 ± 23	0,15
Colesterol total (mg/dL)	205 ± 29	166 ± 48	0,007	141 ± 26	0,12
HDL-colesterol (mg/dL)	49 ± 11	51 ± 12	0,48	49 ± 9,8	0,97
Triglicérides (mg/dL)	125 ± 51	99 ± 39	0,01	91 ± 29	0,26
Glicemia (mg/dL)	96 ± 12	95 ± 10	0,88	93 ± 11	0,28
Sinvastatina/Ezetimibe					
LDL-colesterol (mg/dL)	149 ± 43	100 ± 45	< 0,001	97 ± 49	0,90
Colesterol total (mg/dL)	226 ± 51	176 ± 54	< 0,001	169 ± 52	0,83
HDL-colesterol (mg/dL)	54 ± 12	52 ± 13	0,98	53 ± 14	0,39
Triglicérides (mg/dL)	121 ± 67	122 ± 73	0,08	124 ± 60	0,52
Glicemia (mg/dL)	129 ± 91	102 ± 18	0,28	102 ± 22	0,65
Placebo					
LDL-colesterol (mg/dL)	136 ± 27	137 ± 29	0,80	123 ± 30	0,21
Colesterol total (mg/dL)	206 ± 33	212 ± 31	0,79	201 ± 35	0,32
HDL-colesterol (mg/dL)	49 ± 11	50 ± 8	0,39	52 ± 14	0,50
Triglicérides (mg/dL)	115 ± 41	127 ± 52	0,27	132 ± 38	0,48
Glicemia (mg/dL)	94 ± 19	103 ± 32	0,06	111 ± 54	0,40

LDL: Lipoproteína de baixa densidade, HDL: Lipoproteína de alta densidade

Tabela 3: Efeito dos tratamentos no peso e características bioquímicas

	Basal	4 Semanas	P	8 Semanas	P
Sinvastatina					
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	35 ± 4,3	35 ± 4,3	0,51	34 ± 4,4	0,19
Aspartato transaminase (U/L)	18 ± 5,1	17 ± 4	0,73	19 ± 5	0,50
Alanina transaminase (U/L)	18 ± 5,1	17 ± 6	0,90	21 ± 8	0,05
Creatinofosfoquinase (mg/dL)	123 ± 60	136 ± 64	0,04	155 ± 84	0,03
PCR (mg/L)	3,9 (2,1 – 8,1)	3,3 (2,1 – 6,4)	0,14	2,9 (1,9 – 8,3)	0,65
Sinvastatina/Ezetimibe					
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	36 ± 4,4	35 ± 4,4	0,63	35 ± 4,3	0,27
Aspartato transaminase (U/L)	20 ± 4,6	22 ± 9	0,42	23 ± 10	0,22
Alanina transaminase (U/L)	20 ± 4,6	26 ± 15	0,21	25 ± 12	0,03
Creatinofosfoquinase (mg/dL)	168 ± 88	185 ± 127	0,30	195 ± 118	0,11
PCR (mg/L)	3,0 (1,8 – 5,1)	2,0 (1,7 – 4,2)	0,55	2,0 (1,6 – 4,2)	0,66
Placebo					
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	36 ± 8,6	35 ± 6,6	0,23	36 ± 9,4	0,81
Aspartato transaminase (U/L)	20 ± 11	17 ± 7	0,59	18 ± 5	0,24
Alanina transaminase (U/L)	20 ± 11	17 ± 10	0,20	18 ± 10	0,12
Creatinofosfoquinase (mg/dL)	109 ± 62	103 ± 60	0,17	120 ± 67	0,25
PCR (mg/L)	3,3 (1,2 – 7,2)	4,0 (2,4 – 8,2)	0,43	4,4 (2,7 – 8,3)	0,11

PCR: Proteína C reativa (mediana e IIQ)

8.3 Efeito dos Tratamentos na Vasodilatação Arterial Mediada por Fluxo

O grupo sinvastatina 80 mg apresentou incremento da vasodilatação mediada por fluxo de $8,4\% \pm 4,3\%$ no basal para $11\% \pm 4,2\%$, após 8 semanas de tratamento ($P = 0,02$). Da mesma forma, o grupo sinvastatina 80 mg com ezetimibe 10 mg apresentou melhora da função endotelial, de $7,3\% \pm 3,9\%$ para $12\% \pm 4,4\%$ ($P = 0,001$).

Em termos relativos, a variação da função endotelial apresentou mediana de +39% (IIQ = 2,2% - 105%) no grupo sinvastatina 80 mg, semelhante a +41% (IIQ = 13% - 227%) no grupo sinvastatina 80 mg + ezetimibe 10 mg ($P = 0,36$). O grupo placebo apresentou mínima mediana da variação da função endotelial de +9% (IIQ = -6,6 - 56%), sem significância estatística na comparação entre a medida basal e da oitava semana ($P = 0,28$). **Figura 3; Tabela 4**

Esta comparação permaneceu não significativa após ajuste para a diferença de idade entre estes dois grupos (ANCOVA, $P = 0,30$). Ao se comparar de forma pareada os três momentos de avaliação (basal, 4 semanas e oito semanas) por ANOVA de medidas repetidas, o grupo sinvastatina ($P = 0,045$) e sinvastatina/ezetimibe ($P = 0,001$) apresentaram variação significativa, diferente do grupo placebo ($P = 0,25$). Nesta análise, não houve interação entre grupo e momento, quando apenas os tratamentos ativos foram considerados ($P = 0,30$), indicando semelhança de variação entre estes dois grupos.

Ao contrário do efeito no LDL-colesterol, 4 semanas de tratamento não foram suficientes para obter o efeito final na vasodilatação arterial mediada por fluxo, embora uma tendência na melhora da vasodilatação já era observada nesta medida interina. Em termos de mudança relativa de dilatação, na análise precoce de quatro semanas, os

indivíduos submetidos ao tratamento com sinvastatina 10 mg associada a ezetimibe 10 mg apresentaram significativa variação, dado pela mediana de + 25% (IIQ = -4% – 92%; P= 0,03), semelhante ao grupo da sinvastatina alta dose +27% (IIQ = - 13% - 63%; P= 0,09), com P = 0,58. O grupo placebo registrou mediana da variação da função endotelial de +13% (IIQ = - 8% - 31%), sem significância estatística na comparação entre a medida basal e da quarta semana (P = 0,21).

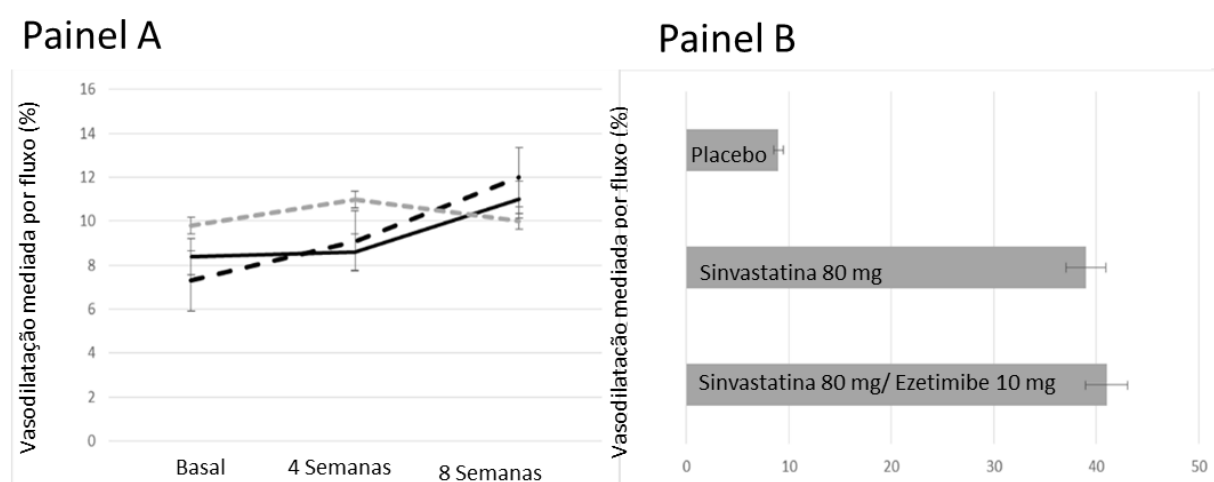


Figura 3- Variação na Vasodilatação mediada por fluxo, indicando aumento nos dois grupos ativos. Painel A: Gráfico de linhas mostra variação na vasodilatação com 4 e 8 semanas dos tratamentos; Painel B: Gráfico de barras mostra percentual de variação da vasodilatação do basal para oitava semana. Linha preta cheia: sinvastatina 80 mg, linha preta tracejada: sinvastatina 10 mg/ezetimibe 10 mg; linha clara tracejada: placebo.

Tabela 4. Efeito dos três tratamentos na vasodilatação mediada por fluxo

	Basal	8 Semanas	P	4 Semanas	P
Sinvastatina					
VMF (%)	8,4 ± 4,3	11 ± 4,2	0,02	8,6 ± 3,6	0,03
Variação da VMF		+ 39% (2.2% – 105%)		+ 27% (-13% – 63%)	0,09
Sinvastatina/Ezetimibe					
VMF (%)	7.3 ± 3,9	12 ± 4,4	0,001	9,1 ± 4,3	0,03
Variação da VMF		+ 41% (13% – 227%)		+ 25% (-4% – 92%)	
Placebo					
VMF (%)	9,8 ± 4,5	10 ± 4	0,28	11 ± 2,2	0,93
Variação da VMF		+ 9% (-6.6% – 56%)		+13% (-8% – 31%)	

Parenthesis mean 95% confidence intervals.

VMF: Vasodilatação mediada por fluxo da artéria braquial

8.4 Efeito dos Tratamentos na Inflamação

A variação nos valores de PCR, do estágio basal para quarta semana de tratamento e para a oitava semana de tratamento, foram semelhantes entre os grupos sinvastatina 80 mg, sinvastatina 10 mg com ezetimibe 10 mg e placebo. Na comparação entre os dois grupos de tratamento ativo, também não houve diferença entre eles na variação do PCR, em nenhum dos dois estágios de observação, quatro e oito semanas (P = 0,36 e 0,48, respectivamente).

8.5 Correlação entre as variações do LDL-colesterol e da Vasodilatação Mediada por Fluxo

As variações absolutas (mg/dL) dos valores de LDL-colesterol do basal para oitava semana de tratamento e as variações percentuais das medidas da vasodilatação mediada por fluxo ($VMF8 - VMF0 / VMF0$) apresentaram significativa correlação inversa ($r = - 0,33$; $P = 0,03$), na análise global da amostra. Ou seja, o LDL diminuindo seus valores (variação negativa) e a VMF aumentado (variação positiva) - **Figura 4**

Contudo, para esse tipo de análise, os grupos de tratamento separadamente, com amostras pequenas, 16 pacientes no grupo sinvastatina 80 mg ($r = - 0,39$; $P = 0,14$), 16 no grupo sinvastatina 10 mg com ezetimibe 10 mg ($r = - 0,18$; $P = 0,51$) e 12 no placebo ($r = 0,35$; $P = 0,27$) não reproduziram o mesmo resultado global de correlação inversa.

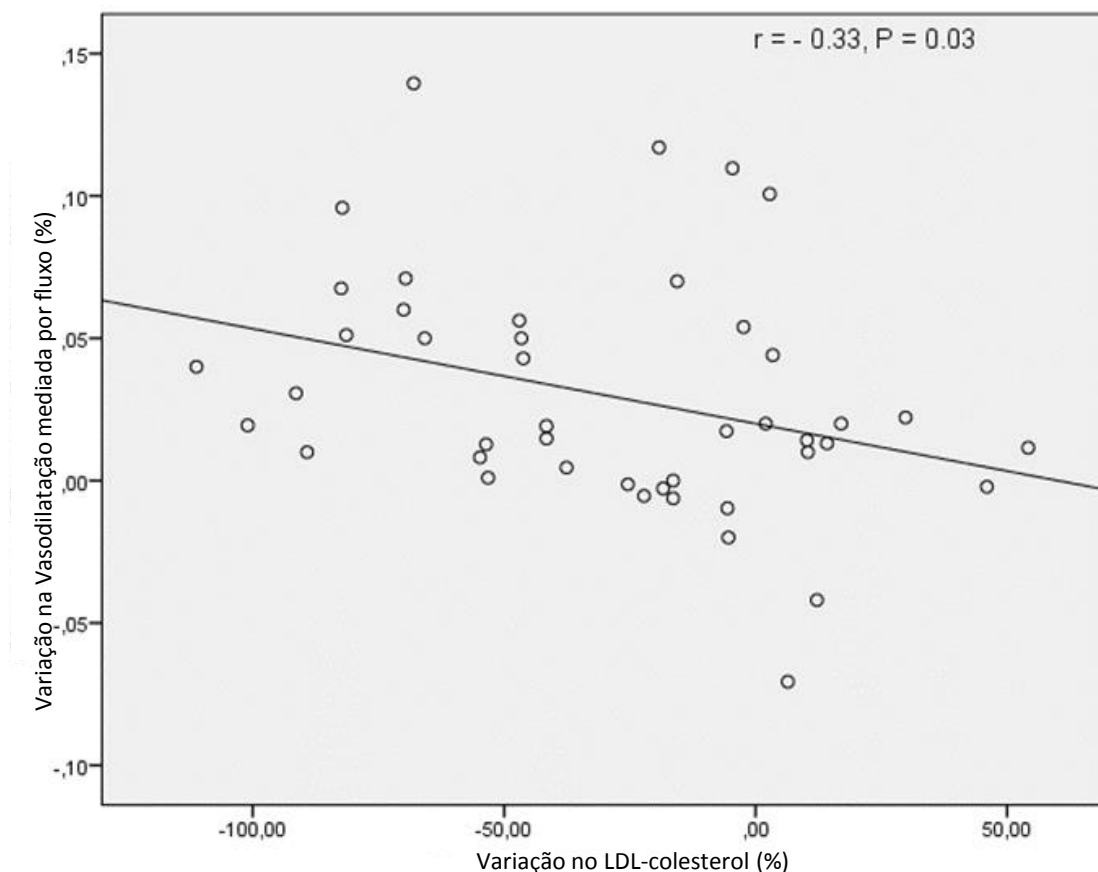


Figura 4- Correlação entre as variações do LDL-colesterol e da vasodilatação mediada por fluxo.

8.6 Correlação entre as variações do LDL-colesterol e variações da PCR.

Não houve correlação entre as variações no LDL-colesterol com as mudanças de PCR, no grupo sinvastatina 80 mg, na quarta semana ($r = 0,41$; $P = 0,22$) ou na oitava semana de intervenção ($r = 0,40$; $P = 0,17$). No grupo baixa dose de sinvastatina associada à ezetimibe, foi ausente, também, significativa correlação entre as variações de LDL-colesterol com as variações de PCR, tanto na fase precoce de observação, com 4 semanas, ($r = 0,40$; $P = 0,17$), quanto com oito semanas ($r = 0,31$; $P = 0,25$).

9. DISCUSSÕES

9.1 DISCUSSÃO RELACIONADA AO OBJETIVO PRINCIPAL

Os achados do atual ensaio clínico sugerem que a melhora da função endotelial é prioritariamente mediada pelo grau de redução do colesterol. A hipótese pleiotrópica foi testada pela utilização de doses diferentes de sinvastatina, alta e baixa (80 mg vs 10 mg), sob a premissa de um gradiente dose-resposta, caso este mecanismo estivesse presente.

No intuito de evitar que o grau de redução no LDL-colesterol fosse um fator confundidor, ezetimibe foi associado ao grupo de menor dose de sinvastatina, proporcionando o mesmo efeito hipolipemiante do grupo alta dose. Desta forma, ao observar que ambas as terapias apresentaram o mesmo benefício na função endotelial, a ausência do gradiente dose-reposta ficou demonstrada.

Além do resultado principal, alguns achados secundários foram observados. Primeiro, a presença de um grupo placebo, que não apresentou mudança na função endotelial, assegura que a melhora observada nos dois grupos de tratamento ativo não decorreu do fenômeno de regressão à média. Segundo, a correlação negativa entre a magnitude da redução de LDL-colesterol e a melhora da função endotelial representa mais uma evidência a favor do mecanismo anti-lipidêmico. Terceiro, observamos que a influência positiva na função endotelial ocorre de forma progressiva, de acordo com o tempo de exposição, visto que os resultados tardios (8 semanas) foram melhores que os resultados precoces (4 semanas), a despeito do nadir de LDL-colesterol ter sido obtido após 4 semanas de tratamento. Finalmente, quanto ao mecanismo anti-inflamatório, o tratamento não promoveu redução de proteína C-reativa em nenhum dos grupos, tornando menos provável que este tenha sido um mecanismo adicional, relacionado ao pleiotropismo, de melhora da função endotelial.

Convém justificar que a correlação negativa entre a variação negativa de LDL-colesterol e positiva da VMF não foi evidenciada nos grupos de tratamento individualmente, possivelmente, pelo reduzido tamanho amostral de cada um deles, o que tornou-se presente na análise global da população estudada.

Corroborando com nossos resultados, o recente estudo de Westerink J e cols,⁹⁷ que demonstrou o mesmo impacto endotelial de sinvastatina em alta dose *versus* baixa dose associada a ezetimibe, em indivíduos com síndrome metabólica, como também já havia sido reportado em portadores de diabetes ou doença coronariana.⁹¹ Contrariamente, Liu e cols,⁹³ obtiveram melhora da VMF apenas com maior dose de sinvastatina e sugeriram benefícios pleiotrópicos das estatinas, baseados nos resultados de quatro semanas. Contudo, nesse estudo, a variação da VMF não foi o objetivo primário do trabalho. Além disso, a opção por curto prazo de seguimento pode ter impedido a observação dos efeitos dependente de maior tempo de inibição da HMG-coA redutase. Também, em portadores de doença arterial coronária, Fichtlscherer S. e cols,¹³ sugeriram que apenas as estatinas, em questão, foi a atorvastatina, no tratamento de três meses, exerceram melhora da função endotelial. A redução do LDL-colesterol, contudo, não apresentava equivalência entre todos os grupos avaliados, e, portanto, houve comprometimento dos resultados comparativos.

O atual trabalho obteve com dois tratamentos, sinvastatina 80 mg e combinação sinvastatina 10 com ezetimibe 10 mg, o mesmo efeito redutor sobre o LDL-colesterol ($p=0,75$). Os percentuais obtidos de redução de LDL-colesterol foram levemente inferiores às médias percentuais registradas em outros estudos (44% a 49%),^{12, 91, 92} o que pode ser atribuído, principalmente, às características distintas das populações, no que se refere aos níveis séricos basais de LDL-colesterol, mais baixos no presente estudo. No estudo de Settergren M. e cols,⁹¹ o efeito hipolipemiante dos tratamentos foi mais

expressivo, de aproximadamente 50%, apesar das taxas basais de LDL-colesterol terem sido semelhantes ao do presente estudo. Entretanto, tratava-se de população mais grave quanto às comorbidades, diabetes e doença coronariana crônica, além de multimedicada. Quanto ao efeito na função endotelial, consonante com a atual pesquisa, os resultados sugeriram maior relevância da queda do LDL-colesterol na melhora da função endotelial.

Pela grande heterogeneidade, em relevantes aspectos relacionados aos trabalhos, tais como características populacionais e desenhos dos estudos, justificam-se os diferentes resultados de graus de respostas, nas comparações terapêuticas testadas.

Todos os participantes foram selecionados sem prévio uso de drogas hipolipemiantes e o LDL-colesterol basal era semelhante entre os grupos, bem como as demais características clínicas, com excessão da idade. No seguimento de oito semanas, as intervenções realizadas exerceram mudanças eminentemente no LDL-colesterol e na variável desfecho, a VMF. Com o intuito de evitar influências de possíveis variáveis confundidoras, adicionalmente, foi realizado ajuste para idade, através de análise de covariância, sendo mostrado que a comparação permaneceu não significativa para a diferença de idade entre os grupos tratados com as duas diferentes modalidades de terapia hipolipemiante.

O mecanismo de ação pelo qual ezetimibe reduz colesterol não exerce papel nas ações pleiotrópicas, não sendo, portanto, creditado a essa droga influência direta na função endotelial,⁹⁹ menos ainda, na magnitude observada com alta dose de estatina. Contudo, há que se considerar que procedimentos outros, mesmo não medicamentosos, à exemplo de exercício,¹³² plasmaferese¹³³ e dieta, estiveram associados com algum efeito na função endotelial, nesses casos, exclusivamente, pelo efeito redutor do LDL-colesterol. Em mulheres obesas, inclusive, a perda sustentada de peso pode reduzir o grau de inflamação e melhorar a função endotelial, por si só.¹⁰⁶ Contudo, existe ainda algum grau de

discordância, havendo tanto pareceres negativos sobre qualquer efeito na função endotelial promovido unicamente pelo ezetimibe,⁹³ quanto afirmativos da sua ação na melhora.¹³⁴ Ainda assim, essa possibilidade não deve afetar a conclusão referente a hipótese principal da dose-resposta do binômio estatina-vasodilatação arterial mediada por fluxo.

No presente estudo, de oito semanas de seguimento, não ocorreu perda de peso significativa em nenhum dos grupos de tratamento, sendo o IMC mantido constante e semelhante, com quatro e com oito semanas, sem diferença entre os grupos e, portanto, sem possibilidade dessa ser uma variável de confusão na análise do desfecho.

Pode-se considerar que as terapêuticas foram seguras, dado que a aderência aos tratamentos foi muito boa, sendo infrequente a ocorrência de efeitos colaterais, que quando presentes não foram severos, nem implicaram em afastamento da pesquisa. Além da baixa incidência de queixas clínicas pelas participantes, a segurança das terapias foi confirmada pelas medidas dos níveis séricos de CPK, que, em comparação com o basal, teve aumento significativo, apenas no grupo que utilizou sinvastatina em alta dose, sendo de pequena monta e que não foi capaz de interferir na semelhança dos valores médios de CPK entre os grupos, em todas as etapas da pesquisa. Sobre as enzimas hepáticas, registrou-se, com oito semanas de intervenção, leve aumento de ALT, comparativamente com as medidas basais, em ambos grupos de tratamento ativo, diferente da ausência desse efeito no grupo placebo. Outros estudos já testaram doses elevadas de estatina em indivíduos com níveis de LDL-c normais ou próximos da normalidade e também a consideraram segura, com baixo índice de descontinuação, de elevação de transaminases e de miopatia.¹²⁸

Limitações no presente estudo devem ser reconhecidas. Primeiro, a amostra estudada consistiu apenas de mulheres com excesso de peso. Em sendo um estudo pequeno, justifica-se a opção por homogeneização da amostra, com gênero feminino, exclusivamente. A seleção de mulheres acima do peso teve o intuito de incluir um grupo

mais predisposto a alteração da função endotelial,¹⁶ aumentando a possibilidade de observar o efeito corretivo da terapia. Apesar da escolha deste tipo de amostra populacional ser justificável, devemos reconhecer que isto reduz a abrangência da conclusão do estudo para população geral. Em segundo lugar, o grau de dislipemia na população avaliada foi modesto, o que pode ter subestimado o benefício da terapia hipolipemiante.

Sobre o método de aferição da vasodilatação mediada por fluxo, todas as etapas do protocolo recomendado pelo *International Brachial Artery Reactivity Task Force*¹¹³ foram cumpridas, contudo, é inerente ao método grande variabilidade nas medidas, que sofrem influências de inúmeros fatores externos. Tal variabilidade pode também ser fator limitante da reprodutibilidade dos achados de VMF e, conseqüentemente, da sua interpretação. Os braços de circunferências mais largas da população de mulheres obesas podem trazer alguma dificuldade técnica para a realização das medidas, entretanto, nesta pesquisa, não houve interferência na realização de nenhum exame. A técnica foi facilitada pela utilização do antebraço, de menor largura para a insuflação do esfigmomanômetro, além do que permitiu um campo maior para identificação da artéria braquial com o transdutor posicionado no braço. Apesar da técnica automatizada ser mais robusta e acurada,¹³⁵ a técnica manual, que foi utilizada nesse trabalho, também é confiável e considerada viável para uso em diagnóstico e monitoramento da função endotelial.¹³⁶

É importante, por sua vez, lembrar que o desfecho deste estudo é substituto, caracterizando o objetivo como puramente mecanicista, e não podendo ser interpretado como evidência de que o efeito clínico das duas terapias é semelhante

9.2 DISCUSSÃO RELACIONANDO OS TRÊS OBJETIVOS DA TESE

Foi observado no atual ensaio clínico que foi semelhante o benefício endotelial entre as terapias testadas, com alta e baixa doses de estatina, no cenário de equivalente redução de LDL-colesterol, sugerindo que a ação hipolipemiante é mais preponderante que os efeitos pleiotrópicos, como mecanismo de ação. A importância desse conhecimento tem implicações na maior valorização do efeito redutor do colesterol pelas estatinas do que dos efeitos relacionados ao pleiotropismo. Tal conclusão adveio da ausência de interferência na dose-resposta da estatina no percentual de vasodilatação mediada por fluxo da artéria braquial, que caso ocorresse favoreceria a conclusão pelo benefício pleiotrópicos, relacionado à maior dosagem.

É importante registrar que a conclusão do estudo limita-se à população de mulheres com excesso de peso, predominantemente, com baixo risco cardiovascular, estimado pelo escore de risco de Framingham, não podendo ter uma validação mais abrangente. Diferentemente, em outro contexto populacional, como por exemplo, portadores de síndromes coronarianas agudas, altas doses de estatinas já demonstraram exercer importante papel na estabilização da placa, com efeitos antitrombótico e antiinflamatório, com redução de risco de eventos adversos relacionados à fase precoce.¹³⁷

Foi descrito na revisão sistemática apresentada nessa tese e publicada em 2012, sobre o valor prognóstico da VMF, que os menores valores de função endotelial foram observados nos trabalhos em SCA e, principalmente, no IAM sem supradesnível de ST, onde foram detectadas piores respostas dilatadoras, e onde o papel do endotélio parece ser ainda mais importante, com maior instabilidade de placa, estado vasoconstrictor e pró-trombótico da circulação coronária.¹³⁸. Provavelmente, esse pior *status* arterial justifique a maior responsividade às ações pleitrópicas das estatinas.

Além de conhecimentos como os anteriormente citados, sobre os valores de VMF em diferentes patologias ateroscleróticas, a realização da revisão sistemática teve, *a*

fortiori, intenção de esclarecer o nível de evidência sobre o valor prognóstico da medida da VMF da artéria braquial. Por não se tratar de um desfecho robusto, como morte, infarto, angina ou hospitalização, informações adicionais sobre sua capacidade como desfecho substituto puderam ser esclarecidas, assegurando seu uso no presente ensaio clínico.

O papel da disfunção endotelial na patogênese da aterosclerose, sua associação com fatores de risco cardiovascular, e os resultados iniciais de predição de risco favorecem seu uso como marcador substituto de risco em trabalhos científicos. A maioria dos trabalhos selecionados na revisão documentou, tanto na análise univariada, como na multivariada, que a VMF possui capacidade preditora independente para eventos cardiovasculares. Contudo, como ainda faltam evidências sobre sua capacidade incremental a modelos prognósticos clínicos, não há, até o momento, amparo para seu uso na rotina clínica na predição de risco cardiovascular.

Entre as variáveis clínicas pesquisadas na população desse ECR e que pretendemos utilizar em futuras pesquisas clínicas, também como desfecho substituto, encontra-se a espessura médio-intimal carotídea, medida pela ultrassonografia, e que é representativa da carga aterosclerótica. A medida da EMIC, realizada pelos métodos manual e semiautomático, foi avaliada no segundo artigo dessa tese, quanto à acurácia e reprodutibilidade. Dessa forma, já se encontram documentadas as análises validadoras das medidas do nosso laboratório de ultrassonografia, que evitarão comprometimento de validade interna e aumentarão o poder da pesquisa, visto que os resultados desse trabalho demonstraram boas e semelhantes reprodutibilidades, intra e interobservadores, das medidas da EMIC manuais e semiautomáticas.

10. CONCLUSÕES

9.1. CONCLUSÃO PRIMÁRIA

1. O presente ensaio clínico randomizado demonstra que o mais provável primordial mecanismo da melhora da função endotelial obtida com estatinas é a redução do LDL-colesterol, sendo improvável que mecanismos pleiotrópicos exerçam papel relevante.

9.2 CONCLUSÕES SECUNDÁRIAS

1. A revisão da literatura mostrou evidências que a vasodilatação mediada por fluxo da artéria braquial é um método validado para aferir a função endotelial, associa-se com fatores de risco cardiovascular e tem fortes bases fisiopatológicas e resultados iniciais de predição de risco cardiovascular. Contudo, o valor preditor incremental da VMF a modelos prognósticos clínicos não foi estabelecido, até o momento, e seu uso na rotina clínica para predição de risco cardiovascular ainda não tem amparo científico.

2. Os dados do estudo encorajam o uso da medida semiautomática, padronizada nos grandes ensaios clínicos e dos quais foram extraídas as tabelas de distribuição de normalidade de espessura médio-intimal carotídea nas diversas populações. O método manual pode ser considerado uma ferramenta alternativa para a aferição da EMIC, tendo boa correlação e concordância com o semiautomático, além de reprodutibilidades semelhantes.

11. PROPOSTAS DE ESTUDOS

As variáveis pesquisadas durante a pesquisa constituem-se em um rico banco de dados sobre o perfil de mulheres com obesidade, suas características clínicas, bioquímicas, medidas ecocardiográficas e de ultrassonografia carotídea com aferição da espessura médio-intimal. Estudos pilotos, antes de completar o banco, ofereceram resultados preliminares, apresentados em congressos, em forma de temas-livres. **(Anexo dos temas livres)**

Essas hipóteses, inicialmente testadas e outras, também passíveis de avaliações, deverão, em seguida ao término dessa tese, serem analisadas, de forma completa e definitiva, e transformadas em produções científicas. Por exemplo:

1. Avaliação da influência da inflamação na função endotelial, através de testes entre PCR e VMF.
2. Testar se a carga aterosclerótica, pela medida da espessura médio-intimal carotídea da população estudada, influencia a função diastólica do ventrículo esquerdo, e também
3. Avaliar se há influência da função endotelial na função diastólica, através de testes entre VMF e marcadores de função diastólica. A esse respeito especula-se se disfunção endotelial, mesmo em assintomáticos, pode ser o mecanismo pelo qual a aterosclerose subclínica influencia a função diastólica.
4. Avaliação da relação dos marcadores metabólicos com função endotelial
5. Outras análises com variáveis antropométricas (IMC, cintura, quadril e relação cintura/quadril), de dados vitais (pressão arterial) e ecocardiográficas (espessura de parede de ventrículo esquerdo, volume de átrio esquerdo, fração de ejeção)

6. Análises dicotomizadas para pesquisa de diferenças entre grupos específicos, tais como, com e sem hiperglicemia, com e sem hipertensão, e através da categorização de variáveis contínuas pelo estabelecimento de pontos de cortes.

12. PERSPECTIVAS

Nessa pesquisa não foram avaliados desfechos duros, e sim desfecho substituto, assim, não é permitido qualquer inferência a respeito de redução de eventos, relacionado as terapias testadas, até porque não fazia parte do objetivo desse trabalho, que tinha sua hipótese ligada ao mecanismo das estatinas no efeito sobre a função endotelial. Contudo, a partir desse conhecimento inicial mecanístico, questionamentos clínicos tendem a surgir, e com desenhos de estudos apropriados poderão ser respondidos.

Ainda não dispomos de evidências científicas sólidas sobre a não inferioridade da terapia combinada de sinvastatina e ezetimibe comparativamente com estatina em monoterapia, quanto a redução de desfechos clínicos duros, mantendo essa opção de associação apenas como alternativa nas situações de impossibilidade de aumento da dosagem da monoterapia. Existe, portanto, uma lacuna na literatura que pode impulsionar pesquisas futuras com essas duas modalidades terapêuticas, em distintos cenários, com diferentes populações, com riscos cardiovascular diversos, sobre o impacto da sua ação hipolipeminate na redução de eventos cardiovasculares.

Os benefícios clínicos das estatinas, embora presentes em prevenção primária e secundária, são mais evidentes nessa última. Da mesma maneira, existem mais resultados positivos sobre as vantagens do seu uso nos pacientes classificados em alto e intermediário risco cardiovascular. Tem sido crescente o interesse sobre sua serventia nos portadores de baixo risco cardiovascular. Sobre esse último tópico, os autores da metanálise que avaliou grupos de baixo risco cardiovascular, e que habitualmente não teriam indicação para terapia com estatina, concluíram que poderia haver benefício nessa população, já que os trabalhos analisados demonstraram que as estatinas reduziram o risco de eventos vasculares graves em cerca de 21%, para cada 38,61 mg/dL de redução nos níveis de colesterol LDL, mesmo naqueles com menor risco de doença vascular. Ainda mais, a

análise mostrou que essa redução de risco foi independentemente de idade, sexo, níveis basais de LDL-colesterol e de doença vascular prévia.¹³⁹

Tendo tais informações como base, planejar estudos com desenho adequado e desfechos robustos, seja nessa população de mulheres com excesso de peso e predominantemente de baixo risco cardiovascular pelo escore de Framingham, ou em outras amostras com características distintas, para testar hipóteses sobre redução de eventos com as opções terapêuticas discutidas, são perspectivas futuras.

13. DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE DOUTORADO

Iniciei no Doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública no ano de 2009. Já conhecia as características do curso, não apenas pela divulgação no meio acadêmico e científico, mas por própria experiência, pois aqui havia concluído, em 2008, meu Mestrado, e onde, sem dúvidas, constatei a organização e marcante preocupação com o desenvolvimento do conhecimento científico e da capacidade de avaliação crítica das evidências científicas.

A experiência positiva e o ambiente científico incitante, durante os dois anos do curso de Mestrado, me impulsionaram a partir para o doutorado. Meus objetivos para essa nova etapa eram de maior aprendizado e capacitação em pesquisa clínica, e também de adquirir autonomia e segurança em todas as etapas da pesquisa, incluindo projeto, condução, análise e interpretação.

Fui muito privilegiada na escolha do meu professor-orientador, Prof. Luis Claudio Correia, grande exemplo de pesquisador ético e de inesgotável criatividade científica. Manter no Doutorado o mesmo orientador do Mestrado foi uma decisão acertada, pois a parceria já consolidada foi fator facilitador nas discussões, desde o projeto de pesquisa e em cada etapa de sua execução. Aprendi muito com ele, e sempre fiquei impressionada com a lógica dos caminhos do seu raciocínio científico e com sua capacidade assertiva na comunicação de suas idéias, sendo verdadeiros meus respeito e admiração pelo seu excepcional altruísmo na socialização do saber científico.

Concordo com meu orientador quando diz que “O processo é mais importante do que a conclusão”, se referindo as passagens experimentadas em cada etapa do Doutorado. Procurarei descrever esse processo, por etapas, como se deu, e o que cada uma trouxe de aprendizado, dificuldades, preocupações e também conquistas.

Ano 2009

Minha primeira lição de mundo real em cenário da pesquisa foi de que as circunstâncias podem lhe obrigar a mudar o rumo, e que desejar fazer é diferente de poder fazer. São situações que nos exigem resiliência para, como alguns metais, acumular energia quando submetidos a estresse, sem permitir ocorrer ruptura.

Elaboramos o primeiro projeto intitulado Avaliação do Valor Preditor da Função Endotelial em Pacientes Admitidos com Síndromes Coronarianas Agudas sem Supradesnível do Segmento ST, tratando-se de um estudo observacional que seria realizado na Unidade Coronariana de um Hospital dessa cidade. Obtivemos aprovação do Comitê de Ética da Instituição e planejamos a execução, que envolveria outros setores, como a Emergência, e contaria com a colaboração de estudantes, internos na Unidade. Contudo, situações de força maior inviabilizaram nossa pesquisa.

Havíamos realizado uma revisão de vários estudos sobre o tema e esse tempo investido e material coletado não poderiam ser perdidos. Dessa forma, posteriormente, publicamos nos Arquivos Brasileiros de Cardiologia o trabalho referente a pesquisa de literatura, intitulado “Valor Prognóstico da Função Endotelial em Portadores de Aterosclerose: Revisão Sistemática.” Essa publicação teve um grande significado, pois retratou uma conquista do conhecimento. Um dos internos, Paulo Roberto Lima, que era aluno de Iniciação Científica também teve a sua Monografia apresentada com esse tema, cujo título foi “Importância da Vasodilatação Mediada por Fluxo como Método Determinante do Valor Preditor da Função Endotelial”. A experiência vivenciada me mostrou que as condições adversas e desafiadoras são oportunidades que devemos aproveitar para crescer, melhorar e aprender.

Ano 2010

Não precisei abandonar o estudo da função endotelial. Com apoio dos demais professores pesquisadores da Bahiana, Ana Marice Ladeia, Maria de Lourdes Lima e Armênio Guimarães, encontramos uma segunda linha de pesquisa. Eles disponibilizaram para realização do nosso trabalho o Ambulatório de Obesidade do ADAB (Ambulatório Docente Assistencial) onde é desenvolvido o PEPE (Projeto de Estudos em Excesso de Peso). Partimos, então, para o segundo projeto, agora, um estudo intervencionista, que foi o atual Ensaio Clínico Randomizado intitulado, inicialmente, “Comparação do Efeito Endotelial da Terapia com Estatina em Alta Dose versus Baixa Dose Associada à Ezetimibe em Mulheres com Excesso de Peso”. Foi um avanço, em se considerando a maior robustez do desenho do estudo, comparado com o anterior, portanto. A revisão de literatura sobre esse tema foi objeto da Monografia da aluna Claudia Heine.

Mais lições no meu caminho, para não desanimar e acreditar que podemos sempre recomeçar. O apoio recebido pelo grupo também revelou um verdadeiro sentido de equipe. Sou imensamente grata aos professores que abriram esse caminho, acolheram o projeto, e participaram de várias formas, seja com encaminhamento de pacientes, discussões científicas instigantes ou calibrações dos exames.

Recomeçar novo projeto, com novo objetivo, implicou em nova submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os Comitês são rigorosos nas análises para aprovação de Ensaio Clínicos, e assim devem mesmo ser, pois primordialmente precisam proteger os sujeitos das pesquisas e evitar abusos. Antes de submeter ao CEP da EBMSP, tive uma reunião de orientação com Prof. Lucíola Crisóstomo, na época, Coordenadora do CEP, e que considero ter sido fundamental para o conhecimento e valorização dos pré-requisitos da submissão do projeto.

Era necessário iniciar o planejamento de execução, de recrutamento, operacionalização de medicações e placebo, viabilizar exames laboratoriais e de imagem, transporte de material biológico, confecção de fichas, trabalhar variáveis para o banco de dados e obter todo material para exames. De fato, é uma etapa muito trabalhosa, porém, crucial, e exige extrema organização para que o trabalho evolua corretamente. Começar a pesquisa bem estruturada faz com que sua evolução seja mais tranquila e mais controlada. Investir tempo em uma logística funcional, antes de começar a pesquisa, nos garante, futuramente, menos perdas de pacientes e maior eficiência na coleta e catalogação dos dados. Outro fator muito importante a ser reconhecido foi o papel dos alunos de Iniciação Científica. Considero fundamental para a execução do trabalho o papel desses pesquisadores iniciantes, além da grande experiência que é a rica troca dessa relação.

Ano de 2011

Eram todas as sextas-feiras nosso trabalho de coleta de dados. Durante a semana, os alunos contactavam as pacientes e orientavam sobre o encaminhamento ao ADAB. Nesse dia, a atividade era intensa e exigia extraordinário controle de agenda, pois chegavam participantes em estágios diferentes da pesquisa, algumas para seleção e outras já selecionadas, para randomização. Existiam aquelas que estavam na fase inicial dos exames de imagem, outras que voltavam após quatro semanas de intervenção e ainda, mais tarde, as que já estavam concluindo as oito semanas, e retornavam para realizar a avaliação final e mais importante, e que permitiria a análise do desfecho da pesquisa.

Eram muitas as atribuições e uma equipe responsável e atuante é indispensável. Era preciso aplicar questionário clínico, fazer exame físico completo, solicitar, checar e registrar exames bioquímicos, saber dos eventos adversos, realizar ecocardiograma, ultrassonografia das carótidas e o exame fundamental da pesquisa, a Vasodilatação

Mediada por fluxo. Tudo isso com os devido registros nas suas pastas de arquivos. Após finalizada a manhã, conforme uma planilha de rodízio entre nós pesquisadores, as alíquotas de sangue eram transportadas de carro, para um segundo laboratório, qualificado e de referência, onde o exame de PCR, pelo método nefelométrico, era realizado. Foram seguidas as normas para transporte de material biológico, quanto a embalagem externa, etiquetagem, identificação e temperatura de conservação.

Que alegria quando tudo dava certo, além do orgulho pelo andamento da pesquisa. Mas, nem tudo segue perfeito em pesquisa, e muitas vezes ficamos estressados com algumas situações, que depois serviriam para corrigir erros e outras até para fazer rir.

Já havíamos obtido alguns dados iniciais e fizemos a primeira análise preliminar, usando o programa SPSS. Os resultados, ainda incipientes, serviram como motivação para prosseguir, mas não permitiam ainda conclusões nas análises. Ainda assim, participamos de três congressos, o Brasileiro, o Norte-Nordeste e o Bahiano, levando quatro temas-livres. Foi grande para todos nós a alegria de ganhar o prêmio de melhor tema-livre poster, e ainda maior, para a aluna Carolina Garcez que apresentou o trabalho, intitulado “Influência da Inflamação na Função Endotelial em Obesas sem Dislipidemia Significativa”.

A concordância entre métodos manual e semiautomático na aferição da espessura médio-intimal carotídea foi um dos temas apresentados e, posteriormente, foi o que mais nos interessou em trabalhar com as análises dos dados, para quando fosse alcançado o n amostral. Fazendo parte desse braço da pesquisa, a aluna Isis Vasconcelos contou com minha orientação na sua Monografia.

Ano de 2012

Concluimos a fase de coleta dos dados no final do ano de 2012. Era hora de rever o banco, suas lacunas, buscar dados que faltavam e corrigir outros. Isso é muito importante e deve ser minuciosamente trabalhado, pois os resultados dependem da precisão das medidas feitas e como elas foram registradas. Um exemplo pessoal foi uma vírgula no lugar errado, que, até ser descoberta, transformou o desvio padrão em valor impróprio para a média.

Participamos do Primeiro Simpósio dos Orientandos do Professor Luis Claudio Correia, em agosto de 2012, quando cada pós-graduando teve a oportunidade de apresentar seus projetos e seus resultados, preliminares ou finais. Foi um dia inteiro de debates intensos sobre os trabalhos, com críticas gerais e discussões, tendo o resultado sido muito proveitoso para todos, para colher as sugestões dos colegas e do orientador, para rever falhas em métodos e delineamentos e aprimorar análises.

Retomamos a análise da espessura médio-carotídea e produzimos o segundo artigo intitulado “Acurácia e Precisão do Método Ultrassonográfico Manual de Aferição da Espessura Médio-intimal Carotídea tendo como Referência o Método Semiautomático”. A trajetória de cada artigo durante o doutorado revela-se como uma “pós” dentro de outra “pós”, visto que seguimos várias etapas de sua confecção, com intensas discussões, sempre muito ricas em aprendizado, envolvendo metodologia, estatística, ética e interpretação das evidências. Esse trabalho foi enviado, primeiramente, aos Arquivos Brasileiros de Cardiologia, contudo, a revista considerou que o tema, apesar de relevante, não se encaixava no seu escopo, sugerindo-nos submeter a outra revista. Não há como negar, sempre sentiremos algum desapontamento por nosso artigo não ser aceito. Ainda assim, nesse processo, devemos aproveitar a oportunidade de melhorar nosso trabalho, inclusive analisando as sugestões da revisão crítica feita pelos revisores.

Três alunas de Iniciação Científica apresentaram suas monografias com temas de nossa pesquisa, no ano de 2012: Carolina Garcez Varela (Avaliação da Influência da Inflamação na Função Endotelial em Mulheres com Sobrepeso e Obesidade), Patrícia Fontes da Costa Silva (Avaliação da Associação entre Aterosclerose Subclínica e Função Diastólica) e Isadora Bulhões Maia (Avaliação da Influência dos Marcadores Metabólicos e Pressóricos na Carga Aterosclerótica de Pacientes com Excesso de Peso).

Produzimos também três temas-livres para os Congressos, com os títulos “Impacto dos marcadores de risco clássicos na função diastólica do ventrículo esquerdo em pacientes com excesso de peso; Influência dos marcadores de risco na função endotelial em pacientes com excesso de peso e Associação Independente da Adiposidade Abdominal com Carga Aterosclerótica”.

Ano de 2013

Nosso artigo “Acurácia e Precisão do Método Ultrassonográfico Manual de Aferição da Espessura Médio-intimal Carotídea tendo como Referência o Método Semiautomático” foi aceito pela Revista Brasileira de Ecocardiografia e Imagem Cardiovascular.

As análises finais dos dados da pesquisa se deram no último ano do doutorado, realizadas com interesse ainda maior, pois responderiam ao objetivo principal do trabalho da tese e também do artigo, cujo desenho foi um Ensaio Clínico Randomizado Duplo-cego Placebo-controlado. Consideramos ter feito esse estudo com todo rigor metodológico que exige um Ensaio Clínico, com intenso controle e gerenciamento, além de claras especificações prévias da seleção dos grupos, das intervenções, da execução no seguimento e da aferição dos desfechos.

Interpretamos e discutimos os resultados que constituem a obra dessa tese e o artigo terceiro submetido, antes da qualificação do doutorado, à revista *Atherosclerosis*, intitulado “Influence of High-dose Statin Therapy *versus* Low-dose Statin Therapy Combined with Ezetimibe on Endothelial Function: A Randomized Clinical Trial”. Entretanto, em comunicado recebido do editor da revista, fomos informados que o tema é original e relevante mas, atualmente, a *Atherosclerosis* rejeita mais de 70% do artigos recebidos. Fomos arrojados, é fato, mas, por acreditar na qualidade do artigo e que merece empenho para publicação em revista de bom impacto. Estamos novamente revisando o manuscrito que será, dessa vez, submetido à revista *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, tendo 6,33 de fator de impacto, e considerada pela dedicação ao estudo da aterosclerose e trombose em relação com a biologia vascular.

A fase final do doutorado envolveu um maior desgaste psicológico do que as etapas anteriores, que se caracterizaram mais por desgaste laboral. Nessa fase, o doutorando que necessita focar nas exigências acadêmicas e investir na qualidade da sua produção, pode não equacionar bem essas atribuições com a questão do cumprimento do prazo.

Na reflexão que faço sobre o sentimento geral de todo o processo do Doutorado predomina alegria, por ter sido de intenso ganho em conhecimento e experiência, o que me deixa muito gratificada. Desse modo, finalizo parafraseando o grande educador e filósofo Paulo Freire: A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.

REFERÊNCIAS

- (1) Fonseca FA, Izar MC. Primary prevention of vascular events in patients with high levels of C-reactive protein: the JUPITER study. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2009 September;7(9):1041-56.
- (2) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994 November 19;344(8934):1383-9.
- (3) Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. 1992. *Atheroscler Suppl* 2004 October;5(3):67-80.
- (4) Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 1996 October 19;348(9034):1079-82.
- (5) Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995 February 23;332(8):481-7.
- (6) Guo H, Shi Y, Liu L, Sun A, Xu F, Chi J. Rosuvastatin inhibits MMP-2 expression and limits the progression of atherosclerosis in LDLR-deficient mice. *Arch Med Res* 2009 July;40(5):345-51.
- (7) Obi C, Wysokinski W, Karnicki K, Owen WG, McBane RD. Inhibition of platelet-rich arterial thrombus in vivo: acute antithrombotic effect of intravenous HMG-CoA reductase therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 September;29(9):1271-6.
- (8) Ridker PM, Cannon CP, Morrow D et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005 January 6;352(1):20-8.
- (9) Liao JK. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 2005 September 5;96(5A):24F-33F.
- (10) Lennernas H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* 1997 May;32(5):403-25.
- (11) Bellosta S, Bernini F, Ferri N et al. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1998 April;137 Suppl:S101-S109.
- (12) Davidson MH, McGarry T, Bettis R et al. Ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002 December 18;40(12):2125-34.
- (13) Fichtlscherer S, Schmidt-Lucke C, Bojunga S et al. Differential effects of short-term lipid lowering with ezetimibe and statins on endothelial function in patients with CAD: clinical evidence for 'pleiotropic' functions of statin therapy. *Eur Heart J* 2006 May;27(10):1182-90.

- (14) Ostad MA, Eggeling S, Tschentscher P et al. Flow-mediated dilation in patients with coronary artery disease is enhanced by high dose atorvastatin compared to combined low dose atorvastatin and ezetimibe: results of the CEZAR study. *Atherosclerosis* 2009 July;205(1):227-32.
- (15) Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Kosugi R et al. Effects of ezetimibe add-on therapy for high-risk patients with dyslipidemia. *Lipids Health Dis* 2009;8:41.
- (16) Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000 April 6;404(6778):635-43.
- (17) Esposito K, Pontillo A, Di PC et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003 April 9;289(14):1799-804.
- (18) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002 December 19;420(6917):868-74.
- (19) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 January 14;340(2):115-26.
- (20) Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993;11:767-804.
- (21) Gimbrone MA, Jr., Bevilacqua MP, Cybulsky MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion in inflammation and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1990;598:77-85.
- (22) Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol* 1985 December;121(3):394-403.
- (23) Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2006 June;368(1-2):33-47.
- (24) Bujak M, Frangogiannis NG. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009 May;57(3):165-76.
- (25) Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004 June 1;109(21 Suppl 1):II27-II33.
- (26) Hakim FA, Pflueger A. Role of oxidative stress in diabetic kidney disease. *Med Sci Monit* 2010 February;16(2):RA37-RA48.
- (27) Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2008 October;10(10):1713-65.
- (28) Chan NN, Colhoun HM, Vallance P. Cardiovascular risk factors as determinants of endothelium-dependent and endothelium-independent vascular reactivity in the general population. *J Am Coll Cardiol* 2001 December;38(7):1814-20.

- (29) Zeiher AM, Schachinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 1995 September 1;92(5):1094-100.
- (30) Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2001 April;73(4):673-86.
- (31) Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997 December;81(6):970-6.
- (32) Schachinger V, Britten MB, Elsner M, Walter DH, Scharrer I, Zeiher AM. A positive family history of premature coronary artery disease is associated with impaired endothelium-dependent coronary blood flow regulation. *Circulation* 1999 October 5;100(14):1502-8.
- (33) Seeger FH, Haendeler J, Walter DH et al. p38 mitogen-activated protein kinase downregulates endothelial progenitor cells. *Circulation* 2005 March 8;111(9):1184-91.
- (34) Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res* 1997 November;81(5):885-92.
- (35) Matz RL, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction : potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging* 2003;20(7):527-50.
- (36) Matz RL, de Sotomayor MA, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol* 2000 September;131(2):303-11.
- (37) Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 1993 August;92(2):652-62.
- (38) Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation* 1997 July 15;96(2):379-82.
- (39) Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L et al. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* 2001 August;38(2):274-9.
- (40) Crisostomo LM, Souza CA, Mendes CM, Coimbra SR, Favarato D, Luz PL. Vascular and metabolic response to statin in the mildly hypertensive hypercholesterolemic elderly. *Clinics (Sao Paulo)* 2008 October;63(5):589-94.
- (41) Economides PA, Caselli A, Tiani E, Khaodhiar L, Horton ES, Veves A. The effects of atorvastatin on endothelial function in diabetic patients and subjects at risk for type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 February;89(2):740-7.

- (42) Ntaios G, Gatselis NK, Makaritsis K, Dalekos GN. Adipokines as mediators of endothelial function and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2013 April;227(2):216-21.
- (43) Jiang ZY, Lin YW, Clemont A et al. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 1999 August;104(4):447-57.
- (44) Chatsuriyawong S, Gozal D, Kheirandish-Gozal L et al. Genetic variance in Nitric Oxide Synthase and Endothelin Genes among children with and without Endothelial Dysfunction. *J Transl Med* 2013 September 25;11(1):227.
- (45) Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 April;19(4):972-8.
- (46) Festa A, D'Agostino R, Jr., Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000 July 4;102(1):42-7.
- (47) Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR et al. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet* 1999 May 15;353(9165):1649-52.
- (48) Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001 July 18;286(3):327-34.
- (49) Romero-Corral A, Sert-Kuniyoshi FH, Sierra-Johnson J et al. Modest visceral fat gain causes endothelial dysfunction in healthy humans. *J Am Coll Cardiol* 2010 August 17;56(8):662-6.
- (50) Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK et al. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet* 2006 August 19;368(9536):666-78.
- (51) De KL, Merchant AT, Pogue J, Anand SS. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur Heart J* 2007 April;28(7):850-6.
- (52) Villela NR, Aguiar LG, Bahia L, Bottino D, Bouskela E. Does endothelial dysfunction correlate better with waist-to-hip ratio than with body mass index or waist circumference among obese patients? *Clinics (Sao Paulo)* 2006 February;61(1):53-8.
- (53) Guo Z, Hensrud DD, Johnson CM, Jensen MD. Regional postprandial fatty acid metabolism in different obesity phenotypes. *Diabetes* 1999 August;48(8):1586-92.

- (54) Votruba SB, Jensen MD. Regional fat deposition as a factor in FFA metabolism. *Annu Rev Nutr* 2007;27:149-63.
- (55) Toda N, Okamura T. Obesity impairs vasodilatation and blood flow increase mediated by endothelial nitric oxide: An overview. *J Clin Pharmacol* 2013 September 9.
- (56) Wang J, Wang H, Luo W et al. Leptin-induced endothelial dysfunction is mediated by sympathetic nervous system activity. *J Am Heart Assoc* 2013 October;2(5):e000299.
- (57) Wong ND, Sciammarella MG, Polk D et al. The metabolic syndrome, diabetes, and subclinical atherosclerosis assessed by coronary calcium. *J Am Coll Cardiol* 2003 May 7;41(9):1547-53.
- (58) Kim JA, Montagnani M, Chandrasekran S, Quon MJ. Role of lipotoxicity in endothelial dysfunction. *Heart Fail Clin* 2012 October;8(4):589-607.
- (59) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 November 27;288(5789):373-6.
- (60) Kelm M. Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 January;282(1):H1-H5.
- (61) Rassaf T, Kleinbongard P, Kelm M. The L-arginine nitric oxide pathway: avenue for a multiple-level approach to assess vascular function. *Biol Chem* 2006 October;387(10-11):1347-9.
- (62) Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003 October 1;42(7):1149-60.
- (63) Cox DA, Vita JA, Treasure CB et al. Atherosclerosis impairs flow-mediated dilation of coronary arteries in humans. *Circulation* 1989 September;80(3):458-65.
- (64) Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial flow-mediated dilation predicts incident cardiovascular events in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 2007 May 8;115(18):2390-7.
- (65) Endo A. A historical perspective on the discovery of statins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010;86(5):484-93.
- (66) Fonseca FA. [Pharmacokinetics of statins]. *Arq Bras Cardiol* 2005 October;85 Suppl 5:9-14.
- (67) Bays H, Stein EA. Pharmacotherapy for dyslipidaemia--current therapies and future agents. *Expert Opin Pharmacother* 2003 November;4(11):1901-38.

- (68) Scharrtl M, Bocksch W, Koschyk DH et al. Use of intravascular ultrasound to compare effects of different strategies of lipid-lowering therapy on plaque volume and composition in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001 July 24;104(4):387-92.
- (69) Antoniades C, Bakogiannis C, Tousoulis D et al. Preoperative atorvastatin treatment in CABG patients rapidly improves vein graft redox state by inhibition of Rac1 and NADPH-oxidase activity. *Circulation* 2010 September 14;122(11 Suppl):S66-S73.
- (70) Antoniades C, Bakogiannis C, Leeson P et al. Rapid, direct effects of statin treatment on arterial redox state and nitric oxide bioavailability in human atherosclerosis via tetrahydrobiopterin-mediated endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation* 2011 July 19;124(3):335-45.
- (71) Antonopoulos AS, Margaritis M, Lee R, Channon K, Antoniades C. Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials. *Curr Pharm Des* 2012;18(11):1519-30.
- (72) Albert MA, Danielson E, Rifai N, Ridker PM. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA* 2001 July 4;286(1):64-70.
- (73) Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet* 2009 April 4;373(9670):1175-82.
- (74) Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002 February 12;105(6):739-45.
- (75) Kosoglou T, Statkevich P, Johnson-Levonas AO, Paolini JF, Bergman AJ, Alton KB. Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. *Clin Pharmacokinet* 2005;44(5):467-94.
- (76) Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 June 7;102(23):8132-7.
- (77) Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation* 2002 October 8;106(15):1943-8.
- (78) Park SW. Intestinal and hepatic niemann-pick c1-like 1. *Diabetes Metab J* 2013 August;37(4):240-8.
- (79) Bays HE, Moore PB, Drehobl MA et al. Effectiveness and tolerability of ezetimibe in patients with primary hypercholesterolemia: pooled analysis of two phase II studies. *Clin Ther* 2001 August;23(8):1209-30.
- (80) Knopp RH, Dujovne CA, Le BA, Lipka LJ, Suresh R, Veltri EP. Evaluation of the efficacy, safety, and tolerability of ezetimibe in primary hypercholesterolaemia: a

- pooled analysis from two controlled phase III clinical studies. *Int J Clin Pract* 2003 June;57(5):363-8.
- (81) Gagne C, Bays HE, Weiss SR et al. Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2002 November 15;90(10):1084-91.
- (82) Melani L, Mills R, Hassman D et al. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Eur Heart J* 2003 April;24(8):717-28.
- (83) Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation* 2002 October 8;106(15):1943-8.
- (84) Simon JS, Karnoub MC, Devlin DJ et al. Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment. *Genomics* 2005 December;86(6):648-56.
- (85) Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 2004 August 6;305(5685):869-72.
- (86) Kosoglou T, Meyer I, Veltri EP et al. Pharmacodynamic interaction between the new selective cholesterol absorption inhibitor ezetimibe and simvastatin. *Br J Clin Pharmacol* 2002 September;54(3):309-19.
- (87) Kerzner B, Corbelli J, Sharp S et al. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with lovastatin in primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2003 February 15;91(4):418-24.
- (88) Ballantyne CM, Houri J, Notarbartolo A et al. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation* 2003 May 20;107(19):2409-15.
- (89) Kastelein JJP, Akdim F, Stroes ESG et al. Simvastatin with or without Ezetimibe in Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 2008 April 3;358(14):1431-43.
- (90) Cannon CP, Giugliano RP, Blazing MA et al. Rationale and design of IMPROVE-IT (IMProved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial): comparison of ezetimibe/simvastatin versus simvastatin monotherapy on cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2008 November;156(5):826-32.
- (91) Settergren M, Bohm F, Ryden L, Pernow J. Cholesterol lowering is more important than pleiotropic effects of statins for endothelial function in patients with dysglycaemia and coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008 July;29(14):1753-60.

- (92) Araujo DB, Bertolami MC, Ferreira WP et al. Pleiotropic effects with equivalent LDL-cholesterol reduction: comparative study between simvastatin and simvastatin/ezetimibe co-administration. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009 September 18.
- (93) Liu PY, Liu YW, Lin LJ, Chen JH, Liao JK. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 2009 January 6;119(1):131-8.
- (94) Mraiche F, Cena J, Das D, Vollrath B. Effects of statins on vascular function of endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2005 March;144(5):715-26.
- (95) Fichtlscherer S, Schmidt-Lucke C, Bojunga S et al. Differential effects of short-term lipid lowering with ezetimibe and statins on endothelial function in patients with CAD: clinical evidence for 'pleiotropic' functions of statin therapy. *Eur Heart J* 2006 May;27(10):1182-90.
- (96) Kawagoe Y, Hattori Y, Nakano A et al. Comparative study between high-dose fluvastatin and low-dose fluvastatin and ezetimibe with regard to the effect on endothelial function in diabetic patients. *Endocr J* 2011;58(3):171-5.
- (97) Westerink J, Deanfield JE, Imholz BP et al. High-dose statin monotherapy versus low-dose statin/ezetimibe combination on fasting and postprandial lipids and endothelial function in obese patients with the metabolic syndrome: The PANACEA study. *Atherosclerosis* 2013 March;227(1):118-24.
- (98) Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation* 2005 May 10;111(18):2356-63.
- (99) Gounari P, Tousoulis D, Antoniadou C et al. Rosuvastatin but not ezetimibe improves endothelial function in patients with heart failure, by mechanisms independent of lipid lowering. *Int J Cardiol* 2010 June 25;142(1):87-91.
- (100) Maki-Petaja KM, Booth AD, Hall FC et al. Ezetimibe and simvastatin reduce inflammation, disease activity, and aortic stiffness and improve endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Am Coll Cardiol* 2007 August 28;50(9):852-8.
- (101) Murphy SA, Cannon CP, Wiviott SD, McCabe CH, Braunwald E. Reduction in recurrent cardiovascular events with intensive lipid-lowering statin therapy compared with moderate lipid-lowering statin therapy after acute coronary syndromes from the PROVE IT-TIMI 22 (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 22) trial. *J Am Coll Cardiol* 2009 December 15;54(25):2358-62.
- (102) Lennernas H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* 1997 May;32(5):403-25.

- (103) Khan T, Hamilton MP, Mundy DI, Chua SC, Scherer PE. Impact of Simvastatin on Adipose Tissue: Pleiotropic Effects in Vivo. *Endocrinology* 2009 October 9.
- (104) Davidson MH, McGarry T, Bettis R et al. Ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002 December 18;40(12):2125-34.
- (105) Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 August;24(8):e149-e161.
- (106) Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 2002 February 19;105(7):804-9.
- (107) Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials 20. *BMJ* 2010;340:c332.
- (108) Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN et al. Evidence for gene-environmental interactions in Utah families with hypertension, dyslipidaemia and early coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1992;20:1-6.
- (109) Anjos LA. [Body mass index (body mass/body height-2) as indicator of nutritional status in adults: review of the literature]. *Rev Saude Publica* 1992 December;26(6):431-6.
- (110) Rifai N, Tracy RP, Ridker PM. Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. *Clin Chem* 1999 December;45(12):2136-41.
- (111) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972 June;18(6):499-502.
- (112) Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2004 August 4;44(3):720-32.
- (113) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the I. *J Am Coll Cardiol* 2002 January 16;39(2):257-65.
- (114) Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L, Marwick TH. The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol* 2004 February 18;43(4):616-23.
- (115) Bots ML, Westerink J, Rabelink TJ, de Koning EJ. Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response. *Eur Heart J* 2005 February;26(4):363-8.

- (116) Gardin JM, Adams DB, Douglas PS et al. Recommendations for a standardized report for adult transthoracic echocardiography: a report from the American Society of Echocardiography's Nomenclature and Standards Committee and Task Force for a Standardized Echocardiography Report. *J Am Soc Echocardiogr* 2002 March;15(3):275-90.
- (117) Lang RM, Bierig M, Devereux RB et al. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr* 2006 March;7(2):79-108.
- (118) Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation* 1977 April;55(4):613-8.
- (119) Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr* 2008 February;21(2):93-111.
- (120) Wattanakit K, Folsom AR, Chambless LE, Nieto FJ. Risk factors for cardiovascular event recurrence in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Am Heart J* 2005 April;149(4):606-12.
- (121) Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986 December;74(6):1399-406.
- (122) Gepner AD, Keevil JG, Wyman RA et al. Use of carotid intima-media thickness and vascular age to modify cardiovascular risk prediction. *J Am Soc Echocardiogr* 2006 September;19(9):1170-4.
- (123) Kanters SD, Algra A, van Leeuwen MS, Banga JD. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements: a review. *Stroke* 1997 March;28(3):665-71.
- (124) Montauban van Swijndregt AD, De Lange EE, De GE, Ackerstaff RG. An in vivo evaluation of the reproducibility of intima-media thickness measurements of the carotid artery segments using B-mode ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1999 March;25(3):323-30.
- (125) Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der GY. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation* 1999 August 31;100(9):951-7.
- (126) Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 2004 December 17;1(1):6.
- (127) Law M, Rudnicka AR. Statin safety: a systematic review. *Am J Cardiol* 2006 April 17;97(8A):52C-60C.

- (128) Wiviott SD, Cannon CP. The safety and efficacy of achieving very low LDL-cholesterol concentrations with high dose statin therapy. *Curr Opin Lipidol* 2006 December;17(6):626-30.
- (129) Emberson JR, Kearney PM, Blackwell L et al. Lack of effect of lowering LDL cholesterol on cancer: meta-analysis of individual data from 175,000 people in 27 randomised trials of statin therapy. *PLoS One* 2012;7(1):e29849.
- (130) Black DM. A general assessment of the safety of HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Curr Atheroscler Rep* 2002 January;4(1):34-41.
- (131) Goldberg AC, Sapre A, Liu J, Capece R, Mitchel YB. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Mayo Clin Proc* 2004 May;79(5):620-9.
- (132) Siasos G, Chrysohoou C, Tousoulis D et al. The impact of physical activity on endothelial function in middle-aged and elderly subjects: the ikaria study. *Hellenic J Cardiol* 2013 March;54(2):94-101.
- (133) Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997 January 7;95(1):76-82.
- (134) Nochioka K, Tanaka S, Miura M et al. Ezetimibe improves endothelial function and inhibits Rho-kinase activity associated with inhibition of cholesterol absorption in humans. *Circ J* 2012;76(8):2023-30.
- (135) Gemignani V, Faita F, Ghiadoni L, Poggianti E, Demi M. A system for real-time measurement of the brachial artery diameter in B-mode ultrasound images. *IEEE Trans Med Imaging* 2007 March;26(3):393-404.
- (136) Meirelles CM, Leite SP, Montenegro CA, Gomes PS. Reliability of brachial artery flow-mediated dilatation measurement using ultrasound. *Arq Bras Cardiol* 2007 September;89(3):160-83.
- (137) Murphy SA, Cannon CP, Wiviott SD, McCabe CH, Braunwald E. Reduction in recurrent cardiovascular events with intensive lipid-lowering statin therapy compared with moderate lipid-lowering statin therapy after acute coronary syndromes from the PROVE IT-TIMI 22 (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 22) trial. *J Am Coll Cardiol* 2009 December 15;54(25):2358-62.
- (138) Garcia MM, Lima PR, Correia LC. Prognostic value of endothelial function in patients with atherosclerosis: systematic review. *Arq Bras Cardiol* 2012 September;99(3):857-65.
- (139) Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet* 2012 August 11;380(9841):581-90.

ANEXOS DA TESE

Anexo 1. Registro no Arquivo do Clinical trials.gov

Anexo 2. Questionário clínico e exame físico

Anexo 3. Exames laboratoriais e Cálculo do Escore de Risco de Framingham

Anexo 4. Vasodilatação mediada por fluxo e vasodilatação mediada por nitrato

Anexo 5. Protocolo seguido no exame da Vasodilatação mediada por fluxo

Anexo 6. Ecocardiograma e Ultrassonografia de carótidas

Anexo 7. Registro de eventos adversos

Anexo 8 Questionário Internacional de Atividade Física – versão curta (IPAQ)

Anexo 9. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 10. Adendo do Comitê de ética em Pesquisa

Anexo 11. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 12. Orçamento da pesquisa

Anexo 1.
 Registro clinical
 trial.gov

ClinicalTrials.gov archive *Linking patients to medical research*
A service of the U.S. National Institutes of Health Developed by the National Library of Medicine

[← History of this study](#) [↑ Current version of this study](#)

View of NCT01241097 on 2010_11_15

ClinicalTrials Identifier: NCT01241097

Descriptive Information

Brief title Pleiotropism of Statin Therapy in High Dose Versus Low Dose Combined With Ezetimibe

Official title Comparison of the Effect on Endothelial Function of Statin Therapy in High Dose Versus Low Dose Combined With Ezetimibe

Brief summary

- To test the hypothesis that therapy with high dose statin provides endothelial superior benefit to the same cholesterol lowering with low-dose statin combined with ezetimibe.
- To test the hypothesis that therapy with high dose statin provides anti-inflammatory effect than the same reduction of cholesterol with low dose of statin plus ezetimibe

Detailed description

Randomized, double-blind, placebo-controlled study. Inclusion Criteria: Obese women with body mass index (BMI) > 25 kg / m², aged 18 years and LDL-C > 100 mg / dl For treatment with simvastatin 80 mg, the participant will receive two identical vials, each containing a simvastatin 40 mg. For treatment with the combination simvastatin 10 mg and ezetimibe 10 mg, the participant will receive two identical bottles, one bottle with simvastatin 10 mg, and another bottle with ezetimibe 10mg. In the control group, each participant will receive two identical bottles, each bottle containing inert tablets. Each group with 20 participants.

Dependent Variable (Final Primary Outcome): Percentage change vasodilation of brachial artery flow-mediated, after treatment for eight weeks. Covariates: clinical, biochemical markers and ultrasound.

Phase	N/A
Study type	Interventional
Study design	Other
Study design	Randomized

Study design	Double Blind (Subject, Caregiver, Investigator)
Study design	Dose Comparison
Study design	Parallel Assignment
Study design	Safety/Efficacy Study

Anexo 2.

Questionário clínico e exame físico

QUESTIONÁRIO

Nome:	Data:
Data de nascimento:	
Cor da pele autodeclarada:	Escolaridade:
End:	
Telefone:	

Questionário de sintomas:

Sintoma	Sim	Não
Dispnéia		
Palpitações		
Dor torácica		
Tonturas		
Síncope		
Outros		

Questionário dos Hábitos

Hábito	Sim	Não
Tabagismo		
Ex-tabagista		
Sedentarismo		
Etilismo		
Controle alimentar		

Questionário de antecedentes médicos

Dado	Sim	Não
HAS		
Diabetes		
Hiperglicemia		
Marcapasso		
Dislipidemia		
Doença renal		
Arritmias		
Tireóide (hipo ou hiper)		

Doença cardio-vascular		
Lupus Eritematoso		
TRH		
Uso de estatina ou fibrato		
Uso medicações outras		
Processo inflamatório		
Antecedentes familiares		
Outros...		

EXAME FÍSICO

Peso: Kg	Alt: m	IMC: kg/m²	TA: mmHg	FC: bpm	C: cm	Q: cm
C/Q:	ACV:	AR:	VMG:	Ext:	Boca	Garganta
Ouvido	Articular	Pele				

Outros achados do exame físico:

Anexo 3.**Ficha dos exames laboratoriais**

Nome:
Data:

Exames laboratoriais:

Exame	Basal	4 semanas	8 semanas
Colesterol Total			
HDL			
LDL			
Triglicérides			
Glicemia			
PCR			
Uréia			
Creatinina			
AST			
ALT			
GGT			
CPK			

Escore de Risco de Framingham

Total de pontos:

Risco absoluto em 10 anos (%):

Classificação: () Baixo risco () Médio Risco () Alto Risco

Outros exam

Anexo 4.

Vasodilatação mediada por fluxo da artéria braquial

EXAME DE VASODILATAÇÃO MEDIADA POR FLUXO

Nome:			
Data:			
Peso:	Kg	Altura:	m

Período: Basal () 4 semanas () 8 semanas () Jejum de 12
para laboratório SIM () NÃO ()

Fase Dependente do Endotélio

Velocidade em cm/s e Diâmetro em mm

Basal		
VSP=	VDP=	Velocidade média=
Diâmetro (A)		

Hiperemia reativa		
VSP=	VDP=	Velocidade média (VMF)=
Diâmetro (B)		

Dilatação mediada por fluxo	
% DMF= (B-A)/A	

Fase dependente de nitrato

Basal		
VSP=	VDP=	Velocidade média=
Diâmetro (C)		

Nitrato		
VSP=	VDP=	Velocidade média (VMN)=
Diâmetro (D)		

Dilatação mediada por nitrato	
% DMN= (D-C)/C	

Função da musculatura lisa do vaso	
VMF/ VMN	

Anexo 5.

Protocolo da vasodilatação mediada por fluxo da artéria braquial

Protocolo da VMF

1. Medir a TA sistólica (braço esquerdo)
2. Descanso de *10 minutos* antes do exame (braço direito)
3. Basal: Corte longitudinal da artéria braquial em fossa antecubital – gravar trigado no ECG
4. Inflar esfigmomanômetro 50 mmHg acima da TA sistólica – permanecer por *5 minutos*
5. Desinflar
6. Gravar imagem longitudinal- *de 30 segundos a 2 minutos*
 - Doppler fluxo- *imediatamente e até 15 segundos* após desinflar □ Diâmetro- *45 a 60 segundos* após desinflar
7. Descansar *10 minutos*
8. Nova imagem basal
9. Nitrato sublingual
10. Gravar no *4º minuto* após nitrato

Medidas:

Diâmetros

- fazer 3 medidas e tirar a média
- Final da diástole – onda R do ECG
- Reportar % de mudança
- Reportar mudança absoluta

Doppler fluxo

- VSP, VDP, VTI

Anexo 6.

Ecocardiograma e ultrassonografia de carótidas

Nome:			
Peso:	Kg	Altura:	m
Data:			

Ecocardiograma

Medidas modo M e bidimensionais

VED=	mm	VES=	mm	SIV=	mm	PP=	mm	FE=	%
AE=	mm	AEVol.=	cm ³	AO=	mm	Massa=	g	IMVE=	g/m ²
AEárea=		cm ²							
Calcificação de VAO ()SIM ()NÃO				Calcificação de VM ()SIM ()NÃO					

Doppler do fluxo mitral

E=	ms	A=	ms	E/A=		EF=		TRIV=	ms
----	----	----	----	------	--	-----	--	-------	----

Doppler Tecidual em anel lateral da valva mitral

E'=	ms	A'=	ms	E'/A'=	ms	E/E'=	S=
-----	----	-----	----	--------	----	-------	----

Doppler Tecidual em anel septal

E'=	ms	A'=	ms	E'/A'=	ms	E/E'=	S=
-----	----	-----	----	--------	----	-------	----

Ultrassonografia das carótidas

Espessura médio-intimal- Medida manual

Lado direito (distante) - Medida manual

ACCD ¹ =	mm	ACCD ² =	mm	ACCD ³ =	mm
---------------------	----	---------------------	----	---------------------	----

Lado direito (distante) - Medida semiautomática

Máxima=	mm	Média=	mm
---------	----	--------	----

Lado esquerdo: (distante) - Medida manual

ACCE ¹ =	mm	ACCE ² =	mm	ACCE ³ =	mm
---------------------	----	---------------------	----	---------------------	----

Lado esquerdo (distante) - Medida semiautomática

Máxima=	mm	Média=	mm
---------	----	--------	----

Presença de placa(s) de ateroma: () Sim () Não

Se sim, sombra acústica: () Sim () Não

Anexo 7.

Ficha de Eventos Adversos

Nome:	Data:
() 4 semanas	() 8 semanas

Eventos Maiores	Data da ocorrência	Sintoma como referido	Dados de exame Físico	Dados de Laboratório
Elevação de CPK				
Elevação de transaminases				
Ins. Renal				
Morte				
Pancreatite				
Icterícia colestática				

Eventos Intermediários	Data da ocorrência	Sintoma como referido	Dados de exame Físico	Dados de Laboratório
Mialgia				
Diarréia				
Vômitos				
Cefaléia				
Tontura				
Edema angioneurótico				
Parestesia				
Neuropatia periférica				
Anorexia				
Erupção cutânea				

Eventos Menores outros	Data da ocorrência	Sintoma como referido	Dados de exame Físico	Dados de Laboratório
Constipação				
Flatulência				
Dispepsia				
Dor abdominal				
Cefaléia				
Náusea				
Astenia				
Insônia				
Alopecia				
Prurido				

Anexo 8.

Questionário internacional de atividade física –

VERSÃO CURTA -

Nome: _____ Data: _____

_____/_____/_____

Idade : _____ Sexo: F () M ()



As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação !

Para responder as questões lembre que:

atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal

atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por **pelo menos 10 minutos contínuos** em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício? dias _____ por **SEMANA**

() Nenhum

Artigo de Revisão

1b Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**? horas: _____

Minutos: _____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar

moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO**

INCLUA CAMINHADA) dias _____ por SEMANA () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**? horas: _____ Minutos: _____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração. dias _____ por SEMANA () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**? horas: _____ Minutos: _____

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentado durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

Artigo de Revisão

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

_____horas ____minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de**

final de semana? _____horas ____minutos

Anexo 9.

Aprovação do comitê de ética em pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
OFÍCIO N. 03/2010

Salvador, 15 de janeiro de 2010.

Referente ao Protocolo N°157/2009

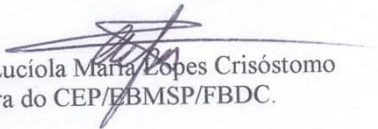
“Comparação do efeito endotelial da terapia com estatina em alta dose versus baixa dose associada a ezetimibe”

PARECER

O CEP-Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências, após análise do ponto de vista bioético do citado Protocolo, considera que o mesmo atende aos princípios éticos em pesquisa em seres humanos, segundo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP- CNS- MS).

Diante do exposto julga o protocolo supracitado **APROVADO**.
Lembramos a necessidade do envio de relatório do andamento da pesquisa dentro do cronograma citado no mesmo protocolo.

Saudações,


Prof. Dra. Luciola Maria Lopes Crisóstomo
Coordenadora do CEP/EBMSP/FBDC.

Ilma. Sra..
PROF^a.: Maristela Magnavita Oliveira Garcia
End.: Rua Artesão João da Prata, 268/202
Bairro: Alto do Itaigara
CEP: 41.815-210
Salvador - BA

Av. D. João VI, 274 – Brotas / CEP 40285-001 – Salvador-BA

Fone: (71) 3424-4000. E-mail: bahiana@bahiana.edu.br. www.bahiana.edu.br

Anexo 10.

Adendo do comitê de ética em pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA EBMSP

PARECER

Nº Protocolo 157/2009 = ADENDO (01/08/10)

Titulo: Comparação do efeito endotelial da terapia com estatina em alta dose versus baixa dose associada a ezetimiba.

Instituição: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

Pesquisador responsável: Maristela Magnavita Oliveira Garcia

Orientador: Luis Cláudio Lemos Correia

Curso: Pós-Graduação/Doutorado

Os pesquisadores apresentam solicitação de avaliação bioética relativa a modificações de protocolo de pesquisa número 157/2009, analisado e julgado por este CEP-EBMSP, com parecer aprovado. Os pesquisadores referem na documentação atualmente apresentada que, as modificações referem-se a:

1 – Redução no ponto do corte do IMC estabelecidos nos critérios de inclusão, antes de 30 kg/m² para obesidade para sobrepeso, ou seja 25kg/m² O que se justifica pelo fato de alterações vasculares e metabólicas se relacionarem também a sobrepeso.

2 – Inclusão de um grupo placebo, aos dois grupos anteriores (sinvastatina+ezetimiba e apenas sinvastatina) o que se justifica pela necessidade de evitar o erro tipo II. Assim, o número amostral foi aumentado em vinte pacientes, antes quarenta, atualmente 60 .

3 – O placebo será produzido em farmácia de manipulação, como tablete inertes, com características de formato e cor semelhantes às substâncias ativas. As embalagens de cada grupo são idênticas. Os pesquisadores informam que a utilização do placebo nesta pesquisa não comprometerá a saúde dos sujeitos participantes, pois a intervenção durará apenas oito semanas e, envolve mulheres acompanhadas no ambulatório de obesidade com excesso de peso, portadoras de LDL maior ou igual a 100mg/dl, que não fazem uso de estatina. Contudo, as que porventura, se apresentarem na seleção com indicação formal e imediata para uso de estatina(ex: quadro ou passado de infarto, angina, AVC, placas instáveis na ultrassonografia de

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

carótidas) não serão incluídas e serão tratadas. Além disso, se alguma participante desenvolver qualquer uma das situações descritas acima será afastada da pesquisa e iniciada a terapia com estatina necessária. Um dos pesquisadores tem controle da randomização, enquanto os demais são cegos.


4 – Diante do exposto os pesquisadores informam que o desenho do estudo passa a ser um ensaio clínico randomizado, duplo cego, placebo controlado, antes apenas ensaio clínico randomizado.

5 – O Termo de Compromisso Livre e Esclarecido (TCLE) atual, se encontra anexo ao adendo e refere a existência do grupo placebo e randomização (mencionado como sorteio) em linguagem clara ao sujeito.

Considerações finais: Os dados informados pelos pesquisadores demonstram que, houve modificações na metodologia, contudo, estas, não modificam significativamente o método e as técnicas, além do que, as justificativas apoiam-se em embasamento concreto. O título, objetivos, e demais aspectos do protocolo de pesquisa não sofreram qualquer modificação. Diante do exposto consideramos que as modificações ao protocolo 157/2009, atendeu aos princípios bioéticos em Pesquisa, segundo Resolução 196/96 e não modificam significativamente os propositos e metodologia da Pesquisa. Assim aprovamos o Adendo.

Conclusão : ADENDO AO PROTOCOLO 157/2009 APROVADO.

Salvador 01 de setembro de 2010


Lucíola Maria Lopes Crisostomo
Coordenadora do CEP/EBMSP/FBDC

Av. D. João VI, 274 – Brotas / CEP 40285-001 – Salvador-BA
Fones: (071) 2101-1900 – Email: bahiana@bahiana.edu.br - www.bahiana.edu.br



Anexo 11.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Comparação do Efeito Endotelial da Terapia com Estatina em Alta
Dose versus Baixa Dose Associada a Ezetimibe**

Instituição: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

A Sra. está sendo convidado a participar da pesquisa “Comparação do Efeito Endotelial da Terapia com Estatina em Alta Dose versus Baixa Dose Associada a Ezetimibe”, com o objetivo de comparar duas opções de tratamento usadas para reduzir colesterol, quanto a seu efeito na função das artérias, mais especificamente na camada interna de revestimento, o endotélio.

O tema da disfunção endotelial é importante, pois está relacionado a aumento do risco de eventos cardiovasculares, por isto é necessário conhecer melhores tratamentos que possam reduzir estes riscos.

Os participantes desta pesquisa responderão ao questionário, que traz questões, como idade, peso, tabagismo, atividade física, uso de medicações, dentre outras. Também serão colhidas amostras de sangue para exames laboratoriais, em três momentos da pesquisa (no início; no meio, com 4 semanas; e no final, com oito semanas). Os exames laboratoriais serão: glicemia (açúcar), colesterol total e frações, triglicérides, enzimas do fígado (AST e ALT), função dos rins (uréia e creatinina) e proteína C reativa de alta sensibilidade (inflamação).

A coleta de sangue será realizada em uma das veias do braço, com material descartável, podendo causar desconforto semelhante a uma injeção na veia e em alguns casos deixar uma mancha roxa, que habitualmente melhora em algumas horas ou poucos dias.

Serão realizados exames de ecocardiograma (estuda a anatomia e função do coração) e ultrassonografia das carótidas (exame da artéria do pescoço). Estes exames não são invasivos e não causam dor ou desconforto.

Será realizado o teste da vasodilatação arterial mediada por fluxo, que é uma ultrassonografia da artéria do braço para medir o grau de sua dilatação. Será inflado e

Artigo de Revisão

desinflado o aparelho de pressão no braço. Este procedimento pode causar algum desconforto porque aperta o braço durante poucos minutos. Depois, numa segunda fase, será usado via sublingual uma medicação de nitrato (isordil). Esta medicação pode causar efeitos secundários como dor de cabeça e hipotensão (queda na pressão arterial). O médico responsável estará monitorando o paciente durante todo o período, e o exame será realizado somente se as condições clínicas forem estáveis no momento. No caso de pressão baixa será adotada posição horizontal com elevação dos membros inferiores, sendo mantida nesta posição até sua total recuperação. Se não for suficiente para resolver o problema, será utilizado soro venoso.

Todos os participantes serão sorteados entre três possíveis grupos de intervenção, que são: para receber o tratamento para colesterol com medicação com dose alta; para receber o tratamento com medicação de dose baixa combinada com outra que também reduz lipídios; ou ainda para uso de placebo, que é uma substância inerte, ou seja, sem efeito terapêutico. Os participantes serão acompanhados e repetirão exames de controle, monitorizando os efeitos medicamentosos e os possíveis efeitos colaterais.

Os possíveis efeitos adversos, embora raros, são os seguintes: miosite (dor muscular) e alterações nas funções do fígado e rins, que serão monitorados com os exames de laboratório, sendo interrompido o tratamento, a qualquer instante, no caso de ocorrer elevação das taxas do fígado acima de três vezes o limite normal ou se ocorrer elevação da taxa do músculo acima de dez vezes o limite normal. Estes efeitos são reversíveis com a suspensão do remédio. Se houver intolerância a medicação, a pesquisadora deve ser contactada, para avaliar e, se necessário, suspender a medicação.

Os resultados desta pesquisa serão divulgados em congressos e revistas científicas. Os pesquisadores garantem guardar sigilo em relação à identidade dos participantes. Também garantem esclarecimento em relação a qualquer dúvida, antes e durante o curso da pesquisa, e todos estão livres para recusar a participar da pesquisa, assim como retirar este consentimento a qualquer momento, sem penalização ou prejuízo ao seu cuidado.

Não haverá remuneração aos participantes. Serão fornecidas pelo laboratório amostras de sinvastatina, em dose habitual, para as pacientes que precisarem manter a medicação após o estudo, pelo prazo de três meses.

Artigo de Revisão

Serão entregues os laudos dos exames de ecocardiografia e o Doppler de carótidas com medida da espessura médio-intimal para todos os participantes do trabalho.

Os indivíduos que necessitarem, serão encaminhados para acompanhamento em ambulatório, onde continuarão o tratamento e vigilância.

Pesquisador responsável: Dra. Maristela Magnavita Oliveira Garcia
(cardiologista- CREMEB 9834)

Tel.(71) 99739981; 21086600.

Este termo é composto de duas vias de igual conteúdo, sendo a primeira para arquivamento pelo pesquisador, e a segunda para o paciente ou seu representante legal.

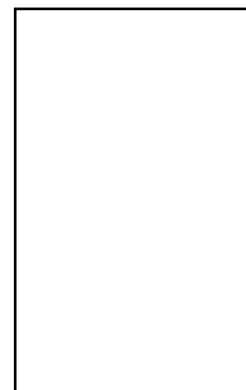
Eu,.....dou meu consentimento para participar desta pesquisa, após ter lido, recebido esclarecimentos e compreendido.

Salvador , ____/____/____

Assinatura do Participante ou digital (no retângulo ao lado)

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Assinatura da testemunha



Em caso de dúvida ou denúncia contactar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – Av. D. João VI, 274 – Brotas - CEP. 40.285-01- Salvador-BA. Tel.:(71) 2101-1900

Anexo 12.

ORÇAMENTO

Laboratório

Exame	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Colesterol total	80	1,85	148,00
HDL-c	80	3,51	120,80
Triglicérides	80	3,51	120,80
PCR-as	120	16,00	1.920,00
Glicemia	80	1,85	148,00
Uréia	120	1,85	222,00
Creatinina	120	1,85	222,00
AST	120	2,01	241,20
ALT	120	2,01	241,20
GGT	120	2,01	241,20
CPK	120	8,70	1.044,00
			4.669,20

Os preços desta tabela são referentes a valores da Tabela Unificada do SUS. Os custos referentes a realização destes exames serão pagos ao Laboratório Central, vinculado ao Ambulatório de Obesidade da Escola Bahiana de Medicina, através de verbas de fundo de pesquisa da Instituição e dos pesquisadores envolvidos.

Exames de ultrassonografia

Exame	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
Ecocardiograma	80	100,00	8.000,00
Carótidas	80	80,00	6.400,00
Função endotelial	80	80,00	6.400,00
Nitrato sublingual	80	0,25	20,00
			20.820,00

Os exames de ecocardiograma, ultrassonografia de carótidas e vasodilatação mediada por fluxo serão realizados pela pesquisadora principal. Não haverá pagamento para a realização dos mesmos.

O nitrato sublingual, dinitrato de isossorbida, que será usado no exame de vasodilatação mediada por fluxo foi doação do Laboratório Sigma Farma (EMS), que corresponde ao Isordil sublingual de 5 mg. Não há nenhuma vinculação dos pesquisadores com o respectivo laboratório, sem compromissos ou conflitos de interesse de qualquer espécie.

Artigo de Revisão

O aparelho de ultrassonografia que será utilizado para realização dos exames é da marca GE, modelo VIVID 3, dotado de transdutores linear e setorial, que já pertence a Instituição, e foi obtido através de financiamento a pesquisa da FAPESB, tendo custo estimado de R\$ 100.000,00

Medicações (sinvastatina 80 mg e combinação sinvastatina 10 + ezetimiba10) durante 8 semanas de pesquisa (56 dias)

Medicação	Quantidade	Valor unitário(R\$)	Valor Total (R\$)
Sinvastatina 80 mg	56	0,83	46,48
Sinvastatina10+ezetimiba10	56	2,96	165,76
Placebo	56	2	112,00
			324,24

As medicações utilizadas na pesquisa foram provenientes de doação do Laboratório Merck Sharp Dohme (MSD), que ofereceu amostras de Vytarin 10/10. O Laboratório Biolab forneceu Vaslip 80 mg.

Os pesquisadores pagaram a farmácia Fórmula de manipulação para elaborar os comprimidos inertes de placebo e compraram frascos idênticos para o acondicionamento dos comprimidos referentes aos grupos de tratamento.

Não há nenhuma vinculação dos pesquisadores com os respectivos laboratórios, não existindo, portanto, compromissos ou conflitos de interesse de qualquer espécie.

Nenhum exame, medicação ou procedimento realizado foi cobrado do paciente.

Não houve recompensa financeira aos participantes.

ANEXOS DOS ARTIGOS

Anexo 1.

ARTIGO 1. VALOR PROGNÓSTICO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL

“Valor Prognóstico da Função Endotelial Avaliada por Vasodilatação Mediada por Fluxo da Artéria Braquial em Portadores de Aterosclerose: Revisão Sistemática”

Anexo 2.

ARTIGO 2. AFERIÇÃO DA ESPESSURA MÉDIO-INTIMAL CAROTÍDEA

“Acurácia e Precisão do Método Ultrassonográfico Manual de Aferição da Espessura Médio-intimal Carotídea tendo como Referência o Método Semiautomático”

Anexo 3.

ARTIGO 3. ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

“Influence of High-dose Statin Therapy *versus* Low-dose Statin Therapy Combined with Ezetimibe on Endothelial Function: A Randomized Clinical Trial”

Anexo 1.

ARTIGO 1

Título:

Valor Prognóstico da Função Endotelial em Portadores de Aterosclerose: Revisão Sistemática

PUBLICADO:

Arquivos Brasileiros de Cardiologia 99: 857-64, 2012.

Anexo 1: Artigo em português – (anexo em pdf)



Artigo de Revisão

Valor Prognóstico da Função Endotelial em Portadores de Aterosclerose: Revisão Sistemática

Prognostic Value of Endothelial Function in Patients with Atherosclerosis: Systematic Review

Maristela Magnavita Oliveira Garcia, Paulo Roberto Passos Lima, Luis Claudio Lemos Correia

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) - Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências (FDBC), Salvador, BA – Brasil

Resumo

A Vasodilatação Mediada por Fluxo (VMF) da artéria braquial, por meio da ultrassonografia, é um método de avaliação da função endotelial que pode oferecer informações fisiopatológicas, diagnósticas e prognósticas.

A realização dessa revisão sistemática objetivou avaliar o nível de evidência na literatura a respeito da capacidade preditora da função endotelial, medida pela VMF da artéria braquial, por meio da ultrassonografia, quanto a eventos cardiovasculares, em indivíduos portadores de aterosclerose.

Foram realizadas buscas nas bases de dados MEDLINE, SCIELO e LILACS e selecionados estudos de coorte prospectivos, em seres humanos, que analisaram o valor prognóstico da função endotelial medida pela VMF da artéria braquial, em populações portadoras de doença aterosclerótica, periférica ou coronariana. Trabalhos com evidentes vieses metodológicos foram excluídos.

A seleção final constituiu-se de 15 estudos. Dos 13 estudos que, na análise univariada, mostraram significância estatística do método da VMF na predição de eventos cardiovasculares, 12 deles demonstraram sua capacidade preditora independente, em análise multivariada. Em nenhum dos trabalhos foi descrito valor prognóstico incremental em relação a modelos preditores tradicionais, como escore de Framingham. Resultados de três trabalhos sugerem que o método agrega valor prognóstico a marcadores isolados como: Índice Tornozelo-Braquial (ITB), diabetes e Proteína C Reativa (PCR) de alta sensibilidade.

Em conclusão, a VMF da artéria braquial prediz risco cardiovascular, porém não é estabelecido seu valor preditor incremental a modelos prognósticos clínicos, não havendo, até o momento, evidências sólidas que amparem seu uso na rotina clínica para predição de risco cardiovascular.

Palavras-chave

Função endotelial; vasodilatação mediada por fluxo; artéria braquial; prognóstico; aterosclerose.

Correspondência: Luis Claudio Lemos Correia •

Av. Princesa Leopoldina, 19/402 - Graça - CEP 40150-080
Salvador, BA - Brasil

E-mail: lccorreia@cardiol.br; lccorreia@terra.com.br

Artigo recebido em 06/01/12; revisado em 10/01/12; aceito em 09/04/12.

Introdução

No Brasil, as doenças do aparelho circulatório são responsáveis pela maior mortalidade proporcional por grupos de causas (32%), sendo as doenças isquêmicas do coração a segunda taxa mais elevada de mortalidade, de 48,5 por 100 mil habitantes ao ano¹. Portanto, a estratificação de risco de eventos cardiovasculares em portadores de algum grau de aterosclerose é uma área importante de pesquisa, em busca de marcadores aprimorados da avaliação prognóstica, numa tentativa de modificar a evolução clínica.

A disfunção endotelial participa como elemento-chave na aterogênese, e todos os fatores de risco maiores para doença cardiovascular estão a ela associados, além de ter comprovado envolvimento nos processos isquêmicos agudos, relacionando-se diretamente com a instabilização da placa aterosclerótica.

Os estudos pioneiros de Furchgott e Zawadzki² comprovaram o papel do endotélio na regulação do tônus vascular e que o método da Vasodilatação Mediada por Fluxo (VMF) da artéria braquial permite avaliar a função endotelial, sendo capaz de fornecer informações fisiopatológicas e diagnósticas. A VMF mede as mudanças do diâmetro da artéria braquial em resposta ao aumento de fluxo por hiperemia reativa (resposta dependente do endotélio) e nitrato sublingual (não dependente do endotélio), como padronizado pela International Brachial Artery Reactivity Task Force³. Quanto às técnicas usadas, a automatizada é mais robusta e acurada⁴; contudo, a técnica manual também é

confiável, possibilitando seu uso para diagnóstico e monitoramento da função endotelial⁵. Nesta atual revisão, pretende-se avaliar o método quanto aos seus dados prognósticos.

Apesar das relevantes informações que a VMF da artéria braquial oferece e de ter o endotélio importante papel na aterosclerose, os trabalhos sobre função de marcador prognóstico são bastante recentes e estão emergindo como uma perspectiva para o arsenal avaliador de risco individual e mesmo de potenciais alvos terapêuticos. Contudo, como toda evolução do conhecimento, as publicações nessa área surgem revelando heterogeneidade quanto a aspectos metodológicos, que comprometem uma conclusão segura a respeito do tema. Dessa forma, o intuito dessa revisão foi, especialmente, organizar as informações da literatura para saber se o conhecimento científico, disponível até o momento, permite concluir sobre a capacidade preditora da função endotelial quanto a eventos cardiovasculares, em indivíduos portadores de aterosclerose.

Métodos

Pesquisa da literatura

A base de dados MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System) foi a principal fonte para revisão sistematizada de trabalhos sobre o tema. Para pesquisa de trabalhos não indexados no MEDLINE e realizados na América Latina, foram utilizadas as bases de dados SCIELO (Scientific Electronic Library Online) e LILACS (Literatura LatinoAmericana e do Caribe em Ciências da Saúde), aplicando-se as mesmas palavras-chave do MEDLINE. As referências de cada artigo original e de artigos de revisão foram checadas a fim de selecionar estudos que não tenham sido identificados pela pesquisa nas bases de dados.

Inicialmente, o dicionário MeSH (*Medical Subject Heading Terms*) foi utilizado para definição dos termos para pesquisa nos títulos dos trabalhos. As expressões *endothelial function* ou *endothelial dysfunction* ou *flow mediated vasodilation* ou *reactive hyperemia* foram escolhidas para combinação com os termos *prognosis* ou *prognostic value* ou *cardiovascular events* e com o termo *atherosclerosis*, totalizando 12 combinações de três termos, utilizando-se a conjunção AND. Após leitura dos títulos e dos resumos encontrados, os estudos com as seguintes características foram selecionados: estudos de coorte prospectivos, em seres humanos, com amostras superiores a 60 indivíduos, que analisaram a função endotelial,

especificamente, com o método não invasivo da VMF da artéria braquial e com populações portadoras de algum grau de aterosclerose, periférica ou coronariana. Trabalhos com evidentes vieses metodológicos foram excluídos.

Na compilação dos dados, para cada artigo, foram registrados: autor, perfil da população, tamanho da amostra, idade média dos sujeitos da pesquisa, desfechos considerados, período de seguimento, capacidade preditora e predição independente. Foram também analisados risco relativo e valor incremental, bem como o uso adequado das covariáveis.

Desfechos avaliados

Para seleção dos artigos foram considerados os eventos mais duros, como morte cardiovascular, infarto do miocárdio, angina instável e acidente vascular cerebral isquêmico. Não fizeram parte da análise principal desfechos menos robustos, como reestenose de *stent*, necessidade de revascularização, angioplastia ou ocorrência de arritmias cardíacas.

Critérios de avaliação da qualidade dos trabalhos

Os seguintes critérios foram avaliados para julgamento da qualidade dos estudos: se foi realizada análise multivariada, e caso positivo, se a metodologia de inclusão das covariáveis seguiu exigência de significância, além de e se todas aquelas consideradas importantes por plausibilidade biológica foram incluídas no modelo. Itens considerados relevantes, como análise do valor incremental, randomização da população, tamanho da amostra, cegamento, utilização do método padronizado da VMF, tempo de seguimento e técnica para coleta dos eventos, foram todos checados.

Resultados

Seleção dos estudos

Foram encontrados 217 trabalhos no MEDLINE, 10 no LILACS e um no SCIELO. As razões de não inclusão dos trabalhos foram: análise metodológica da função endotelial outra que não a VMF da artéria braquial; população de indivíduos sadios ou com outras patologias, mas sem aterosclerose, porque não eram coortes prospectivas ou eram estudos experimentais em modelos animais. A seleção dos registros identificados encontra-se no diagrama, segundo protocolo do PRISMA (*preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses*)⁶ (Figura 1).

Após a seleção, o conjunto final consistiu de 15 artigos (Tabela 1), todos na língua inglesa, da base de dados MEDLINE. Todos os trabalhos selecionados foram com indivíduos portadores de aterosclerose, tanto na Doença Arterial Periférica (DAP) como na coronariana (DAC), em

situação estável e em fase aguda da síndrome. O período das publicações foi entre 2000 e 2009.

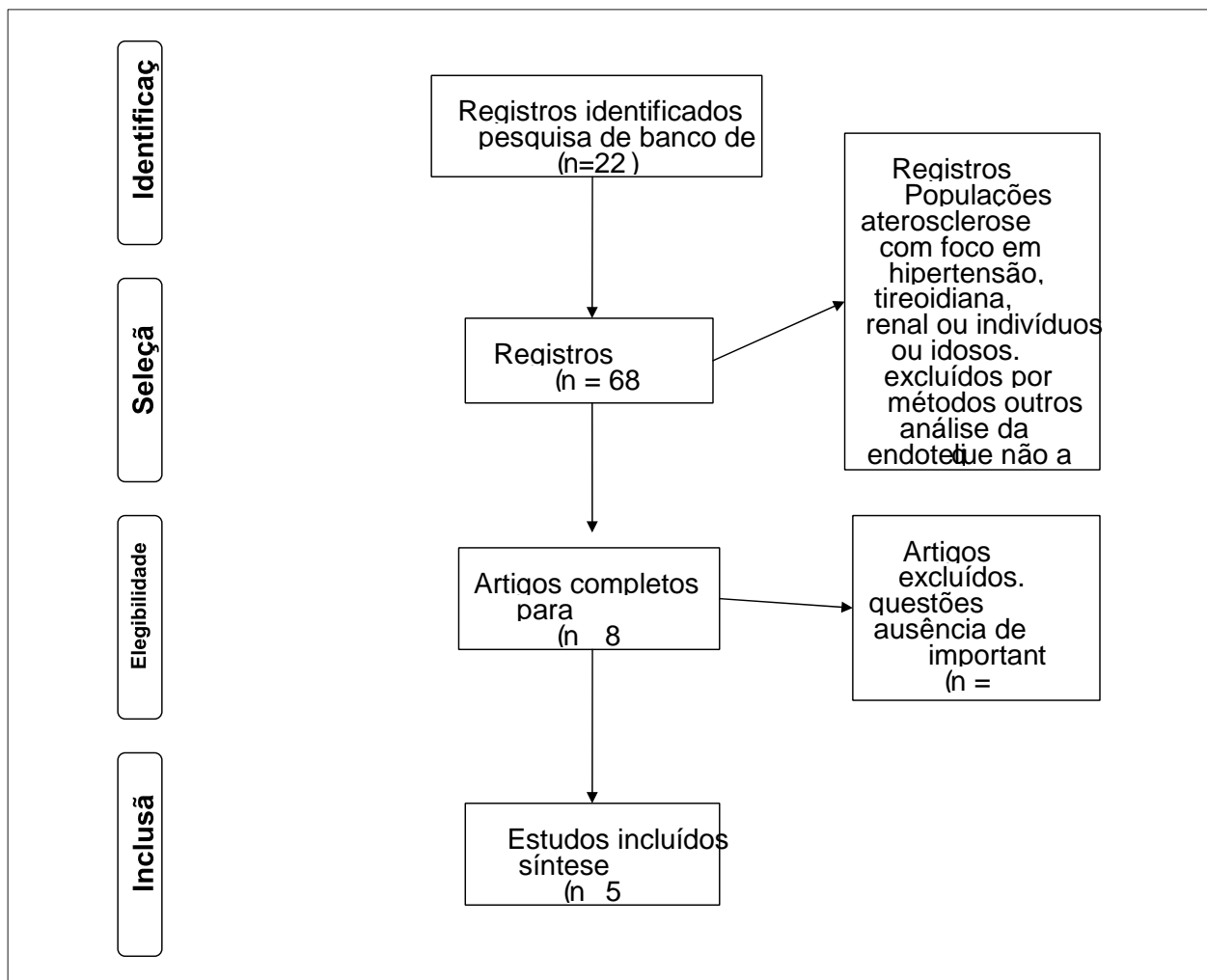
Características dos estudos

A busca para avaliar a capacidade preditora do método da VMF, em portadores de aterosclerose, iniciou-se recentemente, em 2000⁷. As amostras populacionais foram de no mínimo de 73 até no máximo de 444 participantes^{7,8}.

Tanto revistas especializadas de imagem quanto as de

A utilização da metodologia correta na aferição da vasodilatação endotélio dependente não sofreu variação significativa entre os trabalhos, embora falte a citação da diretriz mais recente³, publicada em 2002, em metade das publicações que surgiram após este artigo. A aferição da vasodilatação não dependente do endotélio, com uso de nitrato, variou significativamente, tendo, inclusive, faltado em número expressivo dos participantes de alguns estudos^{11,13}.

De modo geral, pode-se considerar satisfatória a qualidade dos trabalhos apresentados, tendo como



pesquisa clínica publicaram trabalhos sobre o tema, sendo nestas últimas o maior predomínio de artigos relacionados a esta revisão. Revista de prestígio internacional, como o *Journal of The American College of Cardiology*, abrange quatro dos 15 artigos selecionados⁸⁻¹¹. Publicações nacionais de ensaios clínicos randomizados sobre o tema específico da revisão não foram encontradas. Existe registro nacional de uma revisão com portadores de diabetes tipo 1, concluindo que a detecção precoce da disfunção endotelial tem valor prognóstico para o desenvolvimento de complicações vasculares e sugerindo que pode ser importante em estratégias de prevenção primária de eventos cardiovasculares¹².

parâmetros para julgamento a preocupação na inclusão de covariáveis importantes e realização rotineira de análise multivariada. No entanto, ficou prejudicada a avaliação do valor incremental sobre marcadores ou escores estabelecidos.

As investigações em portadores de DAP foram publicadas em quatro estudos e demonstraram ser a disfunção endotelial preditora independente de eventos cardiovasculares nos pacientes clínicos e nos cirúrgicos. Os desfechos

Fig. 1 – Diagrama da seleção dos registros para a revisão sistemática

cardiovasculares considerados nesses estudos foram: morte de causa cardíaca, infarto do miocárdio, angina instável, insuficiência cardíaca, procedimento de revascularização miocárdica e acidente vascular cerebral.

Foram 11 artigos publicados a respeito do valor preditor da função endotelial avaliada pelo método ultrassonográfico da VMF da artéria braquial, quanto ao risco de eventos cardiovasculares em indivíduos coronarianos. Desses, os três trabalhos em populações com síndrome coronariana clássica confirmaram positivamente sua capacidade preditora, sendo dois em infarto agudo do miocárdio (IAM) sem supradesnivelamento e um em IAM com supradesnivelamento do segmento ST.

Oito estudos que contemplaram diversos espectros da coronariopatia, como doença estável, selecionados para implante de *stent*, portadores de dor torácica ou de teste isquêmico alterado encaminhados para cateterismo, revelaram discordantes informações do valor prognóstico do método, sendo cinco favoráveis e três, opostamente, negando qualquer potencial de predição.

Análise do valor prognóstico

As evidências disponíveis são crescentes, porém ainda são poucas as publicações que exploraram o tema do valor prognóstico da hiperemia reativa. Todos os trabalhos reconhecem a importância da função endotelial; contudo, a valorização da sua capacidade prognóstica mostra-se controversa.

Será analisado o valor prognóstico da VMF em portadores de aterosclerose, quanto a três aspectos: o valor prognóstico geral (análise univariada), o valor prognóstico independente (análise multivariada) e o valor prognóstico incremental (estatística C). Nesses tópicos, serão apresentadas as evidências da importância prognóstica da VMF em diferentes populações portadoras de doença aterosclerótica, permitindo observar as diferenças entre os trabalhos e a influência da doença nos resultados.

Tabela 1 - Características dos Ensaios Clínicos que Avaliaram a Capacidade Preditora de Eventos Cardiovasculares da Vasodilatação Mediada por Fluxo em Portadores de Aterosclerose

Autor Revista Ano (ref)	População	N	Idade (anos)	Desfechos	Seguimento (meses)	Predi-ção (univariada)	Predição Independente (multivariada)	Qualidade do ajuste (covariáveis)	Valor Incremental *
Akcakoyun, Coron Artery Dis, 2008	DAC-PTCA	135	58 ± 10	Eventos CV (morte cardíaca, IM, AI, IMSST, AVC, e reestenose intra-stent)	12	Sim	Sim	Boa	Não testou
Brevetti, Circulation, 2003	DAP	131	63 ± 10	IM fatal e não fatal, AI, RM, isquemia extremidades inferiores	23 ± 10	Não	Sim	Regular	Não testou (relação com ITB)
Chan, J Am Coll Cardiol, 2003	DAC	152	56 ± 6	Morte de causa vascular, AVC, IM, AI, eventos periféricos, Revascularização-endarterectomia de carótida, PTCA, RM)	34 ± 10	Sim	Sim VMF/DMN	Regular	Não testou
Fathi, J Am Coll Cardiol, 2004	Risco de eventos coronarianos	444	58 ± 14	Eventos CV e morte por todas as causas	24(10-24)	Sim	Não	Boa	Não testou
Frick, J Am Coll Cardiol, 2005	Encaminhados para CAT	398	54 ± 9	Eventos CV: morte cardíaca, IM, PTCA, RM, piora angina	39 ± 12	Não	Não	Regular	Não testou
Gokce, Circulation, 2002	DAP-(pré-op)	187	67±11	Eventos pós-op: Morte cardíaca, IM, AI, FV isquêmica, AVC	01	Sim	Sim	Boa	Não testou
Gocke, J Am Coll Cardiol, 2003	DAP-(pré-op)	199	67 ± 10	Morte cardíaca, IM, AI, AVC	14	Sim	Sim	Boa	Não testou
Guazzi M, Int J Cardiol, 2009	IAMSSST	179	65 ± 10	IAM, IC, RM, PTCA	14 ± 9,5	Sim	Sim	Boa	Não testou (relação com diabetes)

Artigo de Revisão

Huang AL, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007	DAP-(pré-op)	267	66 ± 11	Morte cardíaca, IM, AI, AVC	10	Sim	Sim	Boa	Não testou
Huang PH, Clin Cardiol, 2007	Dor precordial típica	205	63 ± 14	IM, hospitalização por IC, PTCA, RM, AVC	24(8-37)	Sim	Sim	Regular	Não testou (relação com PCRas)
Karatzis, Am J Cardiol, 2006	SCASSST	98	63 ± 11	Morte CV, IM, AVC, AI	25 ± 6	Sim	Sim	Boa	Não testou
Neunteufl, Am J Cardiol, 2000	Encaminha dos para CAT (mista)	73	49 ± 11	Morte, IM, PTCA, RM	60(53-66)	Sim	Sim	Boa	Não testou
Takase, Cardiovascular Ultrasound, 2008	DAC	103	62 ± 9	Morte cardíaca, IM, AI, IC aguda por isquemia	50 ± 15	Sim	Sim	Boa	Não testou
Veneri, Int J Cardiol, 2007	Dor precordial	195	60 ± 10	Morte, IAM, RM	27	Não	Não	Boa	Não testou
Wang, Coron Artery Dis, 2009	IAMCSST/PTCA primária de resgate bem sucedida	101	62 ± 9	Eventos CV	12 ± 3	Sim	Sim	Boa	Não testou

*Valor incremental é testado pela estatística-C (área abaixo da curva ROC) do modelo preditor usual (ex: Escore de Framingham) com a estatística-C de um novo modelo preditor formado da associação do modelo usual com o novo marcador em questão. Considera-se que o novo marcador agrega valor prognóstico se existir um incremento de pelo menos 0,05 na estatística-C.

DAP-doença arterial periférica; DAC-doença arterial coronariana; CAT-cateterismo cardíaca; IAMSSST-infarto agudo do miocárdio sem supradesnívelamento do segmento ST; SCASSST-síndrome coronariana aguda sem supradesnívelamento do segmento ST; PTCA-angioplastia coronariana percutânea; AI- angina instável; AVC-acidente vascular cerebral; RM- revascularização miocárdica; FV-fibrilação ventricular; IC-insuficiência cardíaca; ITB-índice tornozelo-braquial; PCRas-proteína C reativa de alta sensibilidade.

Análise geral do valor prognóstico da VMF

Valor prognóstico da VMF

A análise univariada para avaliar a capacidade preditora da VMF quanto a eventos cardiovasculares, na maioria dos estudos (13 dos 15), revelou significância estatística favorável ao método. Os resultados se repetem com diferentes pontos de corte para a VMF e também para perfis clínicos distintos. Apenas dois trabalhos, avaliando populações de coronariopatas, encontraram resultados diferentes e contrários ao valor prognóstico do método.

No estudo de Frick e cols.¹⁰, em uma população de 398 indivíduos encaminhados para cateterismos devido a dor torácica ou teste ergométrico positivo, não houve diferença no número de eventos entre os grupos abaixo e acima da mediana da VMF da artéria braquial, no seguimento de 39 ± 12 meses (HR 1,52; 95% IC 0,75 – 3,08, p = 0,24). Foram espessura médio-intimal da artéria braquial e presença de doença coronariana na angiografia que apresentaram capacidade preditora, de forma que esses resultados demonstraram maior valor para a morfologia do que para a função do endotélio. Contudo, há que registrar que esse trabalho não cita se suspendeu estatina antes de aferir a VMF e causa admiração ter sido acima do esperado a VMF de 7,6% para uma população supostamente isquêmica.

De forma semelhante, numa população de 195 pacientes internados com síndrome de dor torácica, Venneri e cols.¹⁴ não obtiveram significância preditora na análise univariada para a VMF, sendo as medidas de índice de massa do ventrículo esquerdo, fração de ejeção e doença coronariana, as variáveis que se mostraram preditores.

Valor prognóstico independente da VMF

Dos 13 estudos que mostraram, na análise univariada, significância estatística do método da VMF na predição de eventos cardiovasculares, 12 deles, também na análise multivariada, demonstraram sua capacidade preditora independente.

Na análise da qualidade das covariáveis utilizadas nas análises multivariadas, observou-se que muitos autores optaram por realizar ajustes baseados, exclusivamente, em significâncias demonstradas previamente nas análises univariadas. Caberia, em algumas situações, incluir variáveis, por plausibilidade biológica e por prévias evidências, como a inclusão de diabetes e de outros fatores clássicos de risco. Nesse contexto, pode-se citar o trabalho de Huang e cols.¹⁵, em DAC, que na análise multivariada ajustou apenas para as covariáveis significativamente relacionadas a eventos cardiovasculares da univariada (idade, hipertensão, vasodilatação mediada por fluxo (VMF) e proteína C reativa

altamente sensível (PCRAS)), bem como o trabalho de Brevetti e cols.¹⁶, em DAP (dislipidemia, hipertensão, AVC prévio, índice tornozelo-braquial (ITB) e VMF). Não se detectou, ainda de forma mais representativa, em nenhuma das análises, ajuste para um modelo completo, como Framingham ou GRACE.

A avaliação do curto prognóstico pós-operatório, de 30 dias, em uma população grave de 187 indivíduos portadores de DAP, incluindo pacientes cirúrgicos de endarterectomia carotídea, *by-pass* arterial periférico, aneurisma aórtico e amputação, demonstrou a capacidade preditora independente da disfunção endotelial, medida pela reduzida VMF da artéria braquial para eventos cardiovasculares (*odds ratio* (OR) 9,0; 95% IC 1,2 - 68; $p = 0,03$), juntamente com a variável idade, que também foi preditora (OR 2,0; 95% IC 1,2 - 3,3; $p = 0,006$). Também ficou demonstrado, na Curva de Kaplan-Meier, que no mais alto tercil de VMF, maior que 8,1%, sendo relativamente normal a função endotelial, o risco de eventos foi muito baixo¹³. Os mesmos autores, no ano seguinte, publicaram o valor preditor para um período mais longo de seguimento, de 1,2 ano, confirmando por meio do modelo de regressão de Cox que a VMF é preditora independente de risco cardiovascular, bem como também são idade e cirurgia mais invasiva, como a endarterectomia carotídea. Após para controlar essas duas covariáveis, a função endotelial manteve-se preditora independente, com OR 9,6; 95% IC 1,2 - 74, $p = 0,03$ ¹¹.

Huang e cols.¹⁷ confirmaram em 267 portadores de DAP encaminhados a cirurgia que tanto a reduzida dilatação arterial quanto a baixa velocidade de fluxo apresentam capacidade preditora de risco cardiovascular (OR 4,2; 95% IC 1,8 - 9,8; $p = 0,001$ e OR 2,7; 95% IC 1,2 - 5,9; $p = 0,0018$, respectivamente), mesmo quando ajustadas a outras variáveis de risco.

Nesses estudos, foi interessante constatar que a vasodilatação mediada por nitrato (VMN), ou seja, a não dependente do endotélio, não apresentou significativo valor prognóstico na predição de risco cardiovascular.

O estudo inicial em doença coronariana descreveu os resultados do seguimento de uma média de cinco anos de uma pequena coorte de 73 indivíduos, quanto à ocorrência de morte, infarto, angioplastia coronariana e revascularização cirúrgica, tendo dividido a população abaixo e acima de 10% de VMF da artéria braquial. Encontraram maior número de eventos no grupo com VMF menor do que 10% (50% X 15%, $p = 0,002$). Na análise multivariada, correlacionaram-se com eventos tanto VMF quanto VMN, e também gênero, com OR de 0,75, 1,25 e 3,9, respectivamente. Neste trabalho, contudo, apesar de encaminhados para cateterismo, não há clara descrição clínica, eletrocardiográfica ou enzimática para a caracterização de síndrome coronariana aguda (SCA), sendo uma população heterogênea quanto à doença coronariana. O ponto de corte de 10% é considerado alto (valor normal) para uma população com doença coronariana, podendo justificar por que não ocorreram mortes nos cinco anos de evolução, e também por que quando ajustado para DAC (estenose $\geq 30\%$ em mais de um vaso) nenhum desses fatores permaneceu significativamente correlacionado⁷.

A capacidade preditora do *status* estrutural e funcional do sistema arterial, quanto a eventos coronarianos em portadores de DAC, foi analisada de forma multivariada, demonstrando que VMF/VMN e área da placa aterosclerótica revelavam capacidade preditora independente para eventos. Observa-se nesse trabalho que a VMF isoladamente foi preditora apenas na análise univariada ($p = 0,03$)⁹.

O estudo prospectivo de Akcakoyun e cols.¹⁸, com 135 pacientes encaminhados para implante eletivo de *stent*, demonstrou que o único preditor independente de eventos cardiovasculares e re-estenose intra *stent* foi a VMF, com ajuste na análise multivariada para os fatores de risco clássicos, comprimento e diâmetro do *stent*, sexo, índice de massa corporal (IMC) e tratamento medicamentoso. Contudo, a população estudada é proveniente de pacientes excluídos de um outro estudo¹⁹ que, entre outros fatores, excluiu aqueles indivíduos que apresentaram SCA e AVC, constituindo um viés de seleção. O ponto de corte observado de VMF nesse estudo para predição foi de 7,5%.

O primeiro trabalho em SCA sem supradesnivelamento do segmento ST foi com uma amostra populacional de 98 participantes, apenas do sexo masculino, tendo registrado 20 eventos cardiovasculares no seguimento de longo prazo. Os portadores no primeiro tercil de VMF (<1,9%) apresentaram significativo maior número de eventos do que aqueles acima desse valor. A regressão multivariada de Cox, ajustando para covariáveis adequadas, mostrou que VMF <1,9% teve capacidade preditora independente para eventos cardiovasculares (HR 3,035; 95% IC 1,148 - 8,023, $p = 0,025$)²⁰.

Em 101 pacientes com infarto do miocárdio com supradesnivelamento de ST, após angioplastia coronária, foram registrados 29 eventos em 12 meses de seguimento, permitindo a demonstração da capacidade preditora independente da VMF (HR 0,705; 95% IC 0,573 - 0,868. $p = 0,0010$), diabetes (HR 2,934; 95% IC 1,314 - 6,548. $p = 0,0086$) e fração de ejeção (HR 0,900; 95% IC 0,832 - 0,973. $p = 0,0082$), quando ajustados para covariáveis basais de risco. O ponto de corte sugerido nesse trabalho foi de 5,5% para significativo pior prognóstico nessa população²¹.

Contrariamente, o trabalho de Fathi e cols.⁸, que estudou uma coorte australiana, composta de 444 pacientes, por dois anos, a VMF, apesar de ser menor nos pacientes com eventos, não foi preditora independente de eventos cardiovasculares. Essa população, mista de risco para eventos cardiovasculares, provém de hospital terciário, com alta prevalência de renais e transplantados, porém não declaradamente isquêmicos ou portadores de aterosclerose. As médias de VMF foram consideradas baixas ($5,2 \pm 6,1\%$) e

compatíveis com estudos em pacientes portadores de DAC. Foi a espessura médiointimal carotídea (EMIC), o fator vascular, que independentemente, se associou com mortalidade. Numa análise do subgrupo de baixo risco, a VMF também não apresentou capacidade preditora independente, e apenas em indivíduos encaminhados a teste isquêmico foi verificado valor prognóstico independente, semelhantemente à EMIC.

Valor prognóstico incremental da VMF

Não existiu, em nenhum dos trabalhos revisados, análise de valor incremental, avaliada pela estatística-C em modelo multivariado, após incorporação do novo marcador, no caso, a VMF, a um escore de risco (Framingham, TIMI, GRACE) e o quanto essa incorporação agregaria ao desempenho desse escore.

Dos 15 trabalhos selecionados, apenas três analisaram se o método da VMF adiciona capacidade preditora em relação apenas a outro marcador prognóstico conhecido; contudo, os modelos empregados para testar tal hipótese não permitem conclusões definitivas.

Brevetti e cols.¹⁶ acompanharam 131 pacientes com claudicação, durante uma média de 23 meses, e concluíram que uma baixa VMF da artéria braquial possui independente capacidade preditora de risco. Os autores testaram se a VMF adiciona valor prognóstico ao ITB, que já é um índice estabelecido como poderoso marcador de risco. Nesse trabalho, a acurácia preditora de risco foi maior para a combinação dos dois índices VMF e ITB abaixo da mediana (risco relativo (RR) 13,0; 95% IC, 3,0 – 56,2; $p < 0,01$) do que o ITB (RR, 6,4; 95% IC, 1,4 – 29,1; $p < 0,02$) e a VMF (RR, 4,8; 95% IC, 1,1 – 23,3; $p < 0,05$), isoladamente. Pelo método utilizado para avaliação incremental, podemos apenas inferir a existência do valor adicional, tendo-se em conta que $OR > 3$ é capaz de promover um aumento clinicamente relevante na estatística-C ($> 0,05$). Como se tratou de análise univariada esse dado pode estar superestimado.

Em indivíduos com infarto do miocárdio sem supradesnivelamento do segmento ST, procurou-se demonstrar se a VMF agrega valor prognóstico a capacidade preditora do diabetes. Tanto VMF quanto diabetes apresentaram capacidade preditora independente, com boa acurácia demonstrada na curva ROC, de 63% e 67%, respectivamente. Seu melhor ponto de corte foi de 4,5%. Na análise de KaplanMeier, a sobrevida livre de eventos, no seguimento médio de 14 meses, foi significativamente menor para o grupo com diabetes e $VMF \leq 4,5\%$ conjuntamente (38,5%) do que para os demais grupos: sem diabetes e $VMF > 4,5\%$ (88,7%), sem diabetes e $VMF \leq 4,5\%$ (78,4%), com diabetes e $VMF > 4,5\%$ (67,7%)²². Além de a análise realizada não permitir conclusões sobre a capacidade incremental, a obtenção dos dados por meio de revisão de prontuários pode ser considerada uma limitação à validade interna desse trabalho.

Estudou-se também a VMF em relação ao marcador da PCRas em portadores com precordialgia típica e observou-se uma significativa pior sobrevida livre de eventos em 36 meses no grupo de $VMF < 6\%$ combinado com $PCRas \geq 1$ mg/dL, quando comparados com cada um isoladamente e com a combinação de $VMF \geq 6\%$ e $PCRas < 1$ mg/dL. Enquanto o RR para o grupo de $VMF \geq 6\%$ e $PCRas \geq 1$ mg/dL foi 3,36, para o grupo de $VMF < 6\%$ e $PCRas \geq 1$ mg/dL aumentou para 12,5 ($p = 0,014$)¹⁵.

Na população estudada por Takase e cols. foi demonstrado, pela Curva ROC, equivalência de acurácia da VMF com o teste ergométrico (0,67 x 0,64) e sua inferioridade da carga aterosclerótica dada pela EMIC (0,68). Os autores não testaram a capacidade incremental do método a nenhum marcador. Vale ressaltar que a maioria dos indivíduos não apresentava estenose coronariana significativa, mas de pelo menos 25% de estenose (DAC leve)²³.

Discussão

Em indivíduos sabidamente portadores de aterosclerose periférica, a técnica da VMF reforça o papel da disfunção endotelial na patogênese da doença cardiovascular e tem chances de tornar-se marcador substituto de risco cardiovascular. Na avaliação individual do risco cirúrgico, que depende do histórico prévio de comorbidades, do tipo de cirurgia e do grau de emergência do procedimento, a VMF pode se tornar um novo parâmetro de avaliação de risco, ajudando a identificar subgrupos de mais alto risco de eventos cardiovasculares agudos, e pode conduzir a estratégias diagnósticas e terapêuticas específicas para cada paciente. Contudo, não existem registros na literatura do valor prognóstico da VMF da artéria braquial em assintomáticos portadores de DAP, quando, certamente, a importância clínica da disfunção endotelial, mais precocemente diagnosticada, possibilitaria intervenções e mudança da evolução, com redução do risco futuro de eventos cardiovasculares.

As discordâncias nos resultados dos trabalhos podem se justificar pelas características diferentes das populações, distintas situações clínicas e também a diversidade de anatomia coronariana. Igualmente variabilidade e falta de emprego uniformizado do método da VMF, que ainda está em evolução, antes de se tornar uma ferramenta recomendada da prática clínica.

Os menores valores de VMF foram observados nos trabalhos em SCA. Mesmo entre eles, diferentes pontos de corte para a VMF foram detectados, com valor mais elevado na população de IAM com supradesnivelamento de segmento ST, comparativamente com as demais de IAM sem supradesnivelamento de ST, onde foram detectadas piores respostas dilatadoras, e onde o papel do endotélio parece ser ainda mais importante. Provavelmente o mecanismo fisiopatológico de maior instabilidade e de grande dependência do endotélio que envolve as SCA sem

Artigo de Revisão

supradesnivelamento explique esse achado, em virtude da situação vasoconstrictora e pró-trombótica da circulação coronária nessa situação específica.

A maioria dos trabalhos trata de populações selecionadas, portadoras de doença aterosclerótica, podendo incorrer no viés de “*workup bias*”, que em estudos prognósticos de seguimento pode levar a falso aumento de sensibilidade do método.

Não é possível comparar entre os trabalhos os diferentes RR para eventos encontrados, em razão da grande heterogeneidade entre eles, especialmente no aspecto da população selecionada. Observamos valores de RR de 0,7²¹ até maiores valores de 12,5¹⁵.

Quanto à análise de agregação de capacidade preditora do método, que depende da capacidade incremental e da capacidade de mudar o desfecho dos pacientes, essa não foi devidamente testada nos trabalhos, com um modelo multivariado clínico que levasse em conta todas as variáveis importantes.

É preciso também fazer considerações sobre o custo possível desse novo método, que por envolver ultrassonografia e demandar tempo considerável para o exame deverá ser maior do que exames laboratoriais e escores já estabelecidos. Da mesma forma, o método deverá enfrentar resistências para sua aceitabilidade quanto às questões práticas, e também da reprodutibilidade das suas medidas; portanto, dificilmente virá a substituir um marcador já padronizado na prática clínica.

Pode-se afirmar que a VMF preenche o conceito primário de que seus valores diferem entre os indivíduos com e sem resultado (desfecho); no entanto, ainda não é validada prospectivamente, ou seja, a VMF só prevê o desenvolvimento futuro de desfechos em situações específicas, como demonstraram os estudos de coorte prospectivos analisados. Ainda mais, o valor incremental do marcador em adicionar capacidade preditora a marcador padrão estabelecido não foi, realmente, documentado. Nos trabalhos com SCA, por exemplo, não se avaliou sua capacidade incremental aos escores já validados, como o escore TIMI ou GRACE. De fato, a utilização do método não mostrou, na maioria dos estudos, que melhora a estimativa de desfechos nos ensaios clínicos randomizados.

Adicionalmente, não há demonstrações da implicação do uso da VMF em alterar qualquer terapia já padronizada, não sendo assim comprovada a sua utilidade clínica na avaliação de risco. Em relação à avaliação de custo-efetividade, visto as constatações anteriores, não há justificativas na prática clínica para custos adicionais com este teste.

Serão necessários estudos que avaliem esse novo marcador quanto a sua capacidade incremental de predição sobre o que já temos estabelecido como marcadores de risco, ou seja, que utilizem testes estatísticos que identifiquem o quanto de significativa informação prognóstica incremental a VMF adiciona a um modelo de risco que inclua marcadores já estabelecidos. Apenas após essa comprovação será possível também analisar se a VMF possui importantes características para a clínica, como capacidade discriminadora (de pacientes que no futuro terão o desfecho daqueles que permanecerão livres do desfecho), de calibração (acurácia de prever qual a probabilidade de um indivíduo apresentar o desfecho) e de reclassificação (capacidade de refinar a estratificação de risco). Tais características, se demonstradas, poderiam influenciar na terapêutica e na evolução da doença.

Conclusão

A VMF da artéria braquial é um método validado para aferir a função endotelial e associa-se com fatores de risco cardiovascular. Contudo, apesar de suas fortes bases fisiopatológicas e dos resultados iniciais de predição de risco cardiovascular, ainda não está estabelecido seu valor preditor incremental a modelos prognósticos clínicos e não existem evidências sólidas que amparem seu uso na rotina clínica para predição de risco cardiovascular.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB (a partir de 2010).

O presente estudo foi parcialmente financiado por Programa de Bolsas de Apoio para Pesquisa em Cardiologia da SBC (ano de 2009).

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de doutorado de Maristela Magnavita Oliveira Garcia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Referências

1. Ministério da Saúde. Datasus. [Acesso em 2011 jun 10]. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br>. 2008.
2. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
3. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al.; International Brachial Artery Reactivity Task Force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(2):257-65.
4. Gemignani V, Fata F, Ghiadoni L, Poggianti E, Demi M. A system for real-time measurement of the brachial artery diameter in B-mode ultrasound images. *IEEE Trans Med Imaging*. 2007;26(3):393-404.
5. Meirelles C de M, Leite SP, Montenegro CA, Gomes PS. Reliability of brachial artery flow-mediated dilatation measurement using ultrasound. *Arq Bras Cardiol*. 2007;89(3):160-7, 176-83.
6. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ*. 2009;339:b2535.
7. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wöfl G, Kostner K, Maurer G, et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol*. 2000;86(2):207-10.
8. Fathi R, Haluska B, Isbel N, Short L, Marwick TH. The relative importance of vascular structure and function in predicting cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(4):616-23.
9. Chan SY, Mancini GB, Kuramoto L, Schulzer M, Frohlich J, Ignaszewski A. The prognostic importance of endothelial dysfunction and carotid atheroma burden in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(6):1037-43.
10. Frick M, Suessenbacher A, Alber HF, Dichtl W, Ulmer H, Pachinger O, et al. Prognostic value of brachial artery endothelial function and wall thickness. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(6):1006-10.
11. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(10):1769-75.
12. Bertoluci MC, Cé GV, da Silva AM, Puñales MK. [Endothelial dysfunction in type 1 diabetes]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(2):416-26.
13. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. 2002;105(13):1567-72.
14. Venneri L, Poggianti E, Jambrik Z, Varga A, Palinkas A, Picano E. The elusive prognostic value of systemic endothelial function in patients with chest pain syndrome. *Int J Cardiol*. 2007;119(1):109-11.
15. Huang PH, Chen JW, Lu TM, Yu-An Ding P, Lin SJ. Combined use of endothelial function assessed by brachial ultrasound and high-sensitive C-reactive protein in predicting cardiovascular events. *Clin Cardiol*. 2007;30(3):135-40.
16. Brevetti G, Silvestro A, Schiano V, Chiariello M. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk prediction in peripheral arterial disease: additive value of flow-mediated dilation to ankle-brachial pressure index. *Circulation*. 2003;108(17):2093-8.
17. Huang AL, Silver AE, Shvenke E, Schopfer DW, Jahangir E, Titas MA, et al. Predictive value of reactive hyperemia for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(10):2113-9.
18. Akcakoyun M, Kargin R, Tanalp AC, Pala S, Ozveren O, Akcay M, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events and restenosis in patients undergoing coronary stent implantation: a prospective study. *Coron Artery Dis*. 2008;19(5):337-43.
19. Kitta Y, Nakamura T, Kodama Y, Takano H, Umetani K, Fujioka D, et al. Endothelial vasomotor dysfunction in the brachial artery is associated with late in-stent coronary restenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(4):648-55.
20. Karatzis EN, Ikonomidis I, Vamvakou GD, Papaioannou TG, Protogerou AD, Andreadou I, et al. Long-term prognostic role of flow-mediated dilatation of the brachial artery after acute coronary syndromes without ST elevation. *Am J Cardiol*. 2006;98(11):1424-8.
21. Wang X, Guo F, Li G, Cao Y, Fu H. Prognostic role of brachial reactivity in patients with ST myocardial infarction after percutaneous coronary intervention. *Coron Artery Dis*. 2009;20(7):467-72.
22. Guazzi M, Reina G, Gripari P, Tumminello G, Vicenzi M, Arena R. Prognostic value of flow-mediated dilatation following myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2009;132(1):45-50.
23. Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A, et al. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1998;82(12):1535-8.

ANEXO 2

ARTIGO 2

Título:

“Acurácia e Precisão do Método Ultrassonográfico Manual de Aferição da Espessura Mediointimal Carotídea tendo como Referência o Método Semiautomático”

PUBLICADO:

Arq Bras Cardiol:imagem cardiovasc. 2013;26(4):276-283

Anexo 2: Artigo em português – (anexo em pdf)



Artigo Original

Acurácia e Precisão do Método Ultrassonográfico Manual de Aferição da Espessura Mediointimal Carotídea tendo como Referência o

Método Semiautomático

Accuracy and Precision of Ultrasound Manual Measurement of Carotid Intima-media Thickness having Semiautomatic Method as Reference

Maristela Magnavita Oliveira Garcia, Ana Marice Teixeira Ladeia, Isis Vasconcelos Lima, Carolina Garcez Varela, Patricia

Fontes da Costa Silva, Marília Galeffi Rodrigues, Maria de Lourdes Lima Silva, Armênio Costa Guimarães, Luis Claudio Lemos Correia

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) - Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências (FDBC), Salvador, BA – Brasil

Resumo

Fundamento: A tecnologia semiautomática de detecção de bordas para aferição da Espessura Mediointimal Carotídea (EMIC), além de oferecer menor tempo de exame, apresenta mínima variabilidade das medidas.

Objetivo: Testar a acurácia e a reprodutibilidade do método manual, tendo o semiautomático como referência.

Métodos: Seleccionadas mulheres do Ambulatório de Obesidade para aferição da EMIC. A avaliação do método manual (EMICmanual) foi realizada tomando-se a medida máxima do método semiautomático (EMICsamax) como referência, sendo utilizados teste de correlação de Pearson, grau de concordância e variabilidades inter e intraobservador nos dois modelos, além do teste de Kappa.

Resultados: Na amostra de 59 participantes, houve forte correlação da medida de EMICmanual com EMICsamax ($r = 0,84$, $p < 0,0001$) e boa concordância entre ambos os métodos, dada a pequena média das diferenças de $0,06 \pm 0,04$ mm das medidas, com limites de concordância no nível 95% entre $-0,02$ a $0,14$ mm. A concordância na definição de aterosclerose subclínica foi moderada, de 53%, (Kappa de 52% $p < 0,0001$). Observou-se forte correlação com os métodos manual e semiautomático, entre as medidas intra e interobservador e boa reprodutibilidade intraobservador das medidas de EMICmanual, com diferença média de $0,04 \pm 0,03$ mm e limites de concordância no nível 95% entre $-0,02$ a $0,10$ mm, semelhantemente às medidas de EMICsamax, que se repetiu na reprodutibilidade interobservador.

Conclusão: O método manual de aferição da EMIC pôde ser validado como método alternativo ao semiautomático.

Palavras-chave: Espessura Intima Média Carotídea; Ultrassonografia; Aterosclerose; Benchmarking.

Abstract

Background: The semiautomated ultrasound border detection technology for measurement carotid intima-media thickness (CIMT) provides shorter time of exam and minimal variability measures.

Objective: To evaluate the accuracy of the manual method, taking the semiautomated as reference and the reproducibility of the methods. **Methods:** Data were obtained from women of Ambulatory of Obesity directed to CIMT measurements determination. The evaluation of the manual method (manualCIMT) was performed, taking the maximum thickness of the semiautomated method (samaxCIMT) as reference. The statistical analyses used Pearson correlation, degree of agreement and inter and intraobserver variabilities in the two models and Kappa test.

Results: In the sample of 59 women, there was a strong correlation of manualCIMT with samaxCIMT ($r = 0.84$, $p < 0.0001$) and a good agreement between both methods, given the small mean difference of measures (0.06 ± 0.04 mm), with limits of agreement at 95% level between -0.02 to 0.14 mm. The agreement on the definition of subclinical atherosclerosis was moderate, 53% ($kappa$ 52%,

Correspondência: Luis C. L. Correia, MD, PhD

Av. Princesa Leopoldina 19/402, CEP 40.150-080, Salvador, Bahia – Brasil

E-mail: lccorreia@terra.com.br

Artigo recebido em 10/05/2013; aceito em 24/07/2013.

$p < 0.0001$). The correlation between manual and semiautomated measurements in intra and inter-observer analyses was strong. The intraobserver reproducibility for manualCIMT measures was good and similar of interobserver, with a mean difference of 0.04 ± 0.03 mm and limits of agreement at 95% level between -0.02 to 0.10 mm. For EMICsamax similar result was observed.

Conclusion: The manual method of measuring carotid intima-media thickness could be validated as an alternative method to semiautomated.

Keywords: Carotid Intima-Media Thickness; Ultrasonography; Atherosclerosis; Benchmarking.

Introdução

A Espessura Mediointimal Carotídea (EMIC) apresenta associação independente com fatores de risco cardiovasculares, com a carga aterosclerótica em diferentes sítios arteriais, eventos coronarianos e acidentes vasculares encefálicos. A progressão da EMIC também pode ser atenuada ou revertida com medidas de intervenção nos fatores de risco¹.

A medida da espessura mediointimal carotídea tem sido utilizada como desfecho substituto de eventos cardiovasculares em ensaios clínicos, por sua associação com fatores de risco para doença arterial coronariana e com eventos cardiovasculares²⁻⁶.

As primeiras alterações morfológicas da EMIC podem ser visualizadas pela ultrassonografia bidimensional, de forma não invasiva e com alta resolução de imagem. A nova tecnologia semiautomática de aferição da EMIC foi incorporada intencionando a redução do tempo do exame e da variabilidade das medidas, atribuídos ao método manual. Em virtude do mecanismo de detecção automática de bordas, a modalidade adiciona vantagem, especialmente para examinadores não experientes, pois o programa facilita a realização das medidas, com menor influência do operador, sem comprometimento da acurácia⁷. No entanto, tem custo mais elevado e não está disponível em todos os laboratórios de ultrassonografia.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo testar a acurácia do método manual, tendo o semiautomático como referência. Além disso, a reprodutibilidade dos métodos foi avaliada.

Metodologia

Seleção da amostra

Foram avaliadas as carótidas de 60 voluntárias do sexo feminino, com idade superior a 18 anos e $IMC \geq 25$ kg/m², provenientes do Ambulatório de Obesidade Docente Assistencial da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, no ano 2012. O trabalho obteve a aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública consoante à Declaração de Helsinki. Para essa pesquisa, foi excluída uma participante em razão de imagem inadequada para aferição do complexo mediointimal carotídeo, resultando 59 exames para análise.

Protocolo do estudo

Todas as participantes responderam ao questionário clínico estruturado e tiveram registrados seus dados antropométricos e de exame físico. Os exames laboratoriais foram realizados em jejum de 12 horas, seguindo técnicas padronizadas pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial – SBPC/ML.

A ultrassonografia das carótidas foi realizada com as pacientes em decúbito dorsal, cabeça rotacionada

para o lado contralateral em 45° da linha média e mínimo suporte abaixo do pescoço. As artérias direita e esquerda foram avaliadas utilizando aparelho de ultrassom bidimensional de alta resolução (*Vivid 3, GE*), conectado com transdutor linear de 7,5MHz, seguindo protocolo previamente validado⁸.

Inicialmente, varreduras longitudinais e transversais das carótidas direita e esquerda foram adquiridas partindo-se de sua origem, passando pelo bulbo, bifurcação, até os ramos. Imagens longitudinais foram obtidas no centímetro distal de segmento da Artéria Carótida Comum Direita (ACCD), região pré-bulbar, com foco na parede afastada do transdutor, para pesquisa de placa de ateroma e aferição da medida da espessura mediointimal carotídea, definida como a

Como padrão de referência, as medidas semiautomáticas foram realizadas por *software* reconhecedor de bordas (*Vivid 3 Pro IMT software analyzer*). Nesse método, a medida é iniciada com um clique do mouse no lúmen do vaso, no limite do lado esquerdo do segmento arterial de interesse e delimitado pelo segundo clique no limite à direita, com aproximadamente um centímetro entre eles. A detecção das interfaces lúmen-íntima e média-adventícia dentro do segmento arterial delimitado é feita automaticamente com base na imagem, intensidade e informação de gradiente. São, em média, 100 amostras aferidas, dependendo dos parâmetros de aquisição de imagem, como frequência e profundidade. Foram adquiridas as medidas

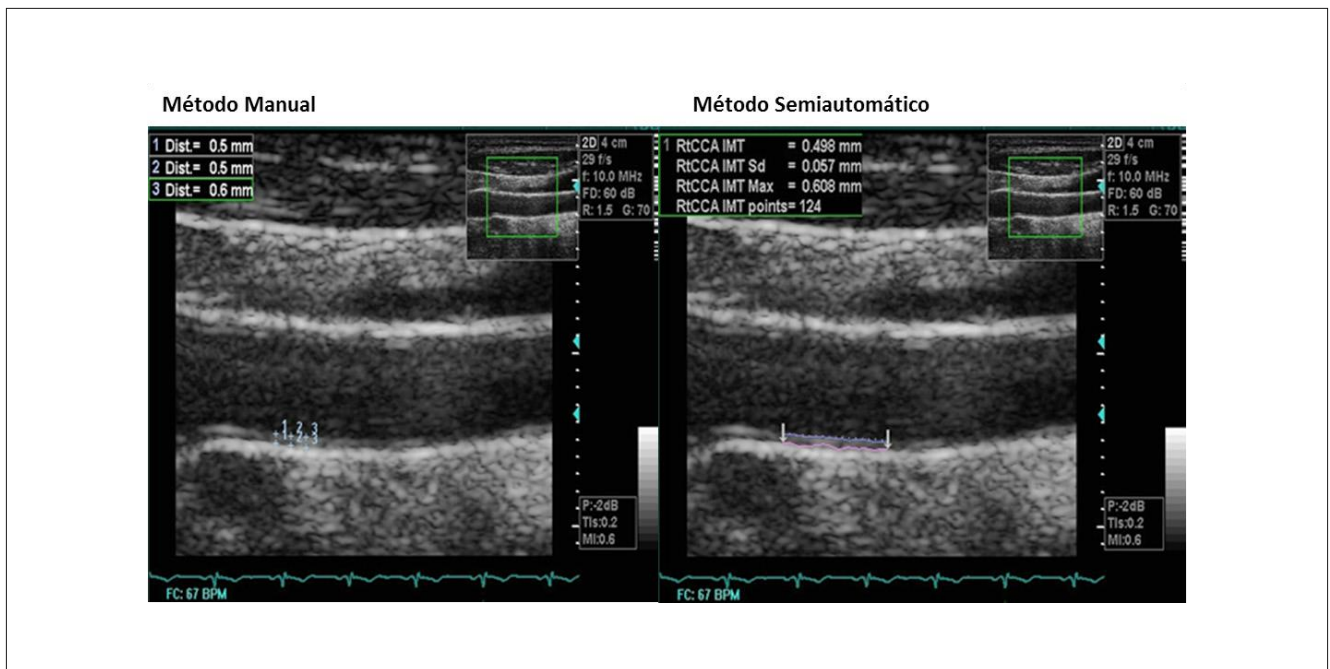


Figura 1

distância entre as interfaces lúmen-íntima e íntima-adventícia. O quadro da imagem era selecionado em diástole, no pico da onda R do eletrocardiograma. As medidas de EMIC foram realizadas pelos métodos manual e semiautomático (Figura 1).

A análise manual da EMIC foi feita através de três medidas ponto a ponto. O primeiro ponto era posicionado na borda superior da linha divisória entre o lúmen e a camada íntima e o segundo ponto na borda superior da linha divisória entre a camada média e adventícia, determinados manualmente pelo examinador, com aproximadamente um milímetro entre as medidas. A EMIC manual (EMICmanual) foi definida como a média dessas três medidas.

semiautomáticas máxima (EMICsamax) e média (EMICsam) da espessura mediointimal, sendo a EMICsamax a medida utilizada para análise neste trabalho. A elevada precisão se deve à utilização automática de parâmetros como intensidade dos ecos e intensidade de gradiente, em repetidas medidas, com acompanhamento da linearidade dos contornos luminis, sendo esse considerado o método padrão de referência da ultrassonografia para a medida da EMIC, com significativa menor variabilidade⁹.

As imagens coletadas e armazenadas digitalmente pelo mesmo examinador foram analisadas *off-line*, de forma cega para as informações clínicas dos pacientes, após concluídas todas as coletas. Um segundo examinador independente também realizou as

mesmas medidas, previamente gravadas. Tais aferições possibilitaram a análise dos dados.

Análise dos dados

A avaliação do método manual foi realizada tomando-se a medida máxima do método semiautomático como referência. A associação linear entre os métodos manual e semiautomático foi testada utilizando-se a correlação de Pearson. Após essa primeira análise, a acurácia do manual foi avaliada pelo grau de concordância com método semiautomático em relação à medida numérica da EMIC, bem como as variabilidades inter e intraobservador nos dois modelos, foram testadas aplicando-se o método de Bland e Altman¹⁰, em que é representada graficamente a associação entre a diferença das duas medidas (eixo y) e a média delas duas (eixo x). A média das diferenças é calculada após retirar os sinais negativos e os limites de concordância no nível 95%, considerando-se 1,96 desvios-padrão da diferença.

Além disso, para a obtenção da concordância dos métodos na aferição categórica da aterosclerose subclínica, utilizou-se o teste de Kappa. Tomamos como ponto de corte o percentil 75 da distribuição da espessura mediointimal carotídea na população estudada pelo *Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC study)*, na qual, para a faixa etária e gênero, corresponde a 0,65 mm de EMIC. Considera-se que a partir desse percentil esteja presente algum grau de aterosclerose subclínica, com aumento do risco cardiovascular^{4,11,12}. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$, e a análise estatística dos dados foi realizada com o *software Statistical Package for Social Sciences, versão 17.0 para Windows (SPSS inc, Chicago, II)*.

Resultados

Características da amostra

Foram estudadas 59 mulheres adultas jovens ($42 \pm 9,6$ anos), com IMC de $35 \pm 6,4$ Kg/m², todas com cintura abdominal aumentada (108 ± 12 cm), em geral com níveis pressóricos normais ($134 \pm 18,2 \times 84 \pm 12$ mmHg), glicemia média de 107 ± 64 mg/dL, sendo a média do perfil lipídico discretamente elevada em relação ao ideal (LDL-colesterol $136 \pm 30,1$ mg/dL). O marcador inflamatório PCR de alta sensibilidade demonstrou valor de mediana elevado ($3,56$ mg/L, variando de

$0,65$ a 10 mg/L), compatível com componente inflamatório presente. Foram registrados na população estudada 3% de tabagismo, 9% de diabetes melito tipo II e 46% de hipertensão arterial sistêmica (Tabela 1).

Os valores de EMIC apresentaram-se dentro da faixa média de normalidade, como demonstrado através dos métodos manual ($0,67 \pm 0,11$ mm) e máximo semiautomático ($0,70 \pm 0,12$ mm). Não foram registradas placas ateromatosas nos segmentos avaliados.

Acurácia do método manual

A medida de EMIC aferida pelo método manual apresentou forte correlação com a medida semiautomática ($r = 0,84$, $p < 0,0001$) (Gráfico 1). A média das diferenças entre as medidas manuais e semiautomáticas foi de $0,06 \pm 0,04$ mm, sendo

Tabela 1 - Características da amostra

Variável (N = 59)	Valor
Idade (anos)	$42 \pm 9,6$
Índice de massa corporal (kg/m ²)	$35 \pm 6,4$
Pressão arterial sistólica (mmHg)	$134 \pm 18,2$
Pressão arterial diastólica (mmHg)	84 ± 12
Cintura (cm)	108 ± 12
Cintura/Quadril	$0,90 \pm 0,06$
Colesterol total (mg/dL)	$213 \pm 38,2$
HDL-colesterol(mg/dL)	$50 \pm 10,4$
LDL-colesterol (mg/dL)	$136 \pm 30,1$
Triglicérides (mg/dL)	136 ± 68
Glicemia (mg/dL)	107 ± 64
PCRas (mg/L)	$3,56$ (5,03) *

PCRas - proteína C reativa de alta sensibilidade;

(*) mediana e intervalo interquartil.

os limites de concordância, no nível 95%, entre $-0,09$ a $0,14$ mm, conforme demonstração gráfica pela análise de Bland e Altman (Gráfico 2).

Na análise percentual de ocorrência de medidas, pelos métodos manual e semiautomático, com

diferenças absolutas entre elas inferiores a 0,1 mm, detectaram-se 52 das 59 medidas, ou seja, 88%.

A comparação dos dois métodos na definição dicotômica de aterosclerose subclínica (ponto de corte no percentil 75 de EMIC da população, de 0,65 mm)¹¹ mostrou concordância de 53%, ou seja, moderada (Kappa de 52%; $p < 0,0001$).

Reprodutibilidade dos métodos manual e semiautomático

As correlações entre as medidas intra e interobservador, com ambos os métodos, foram, pelo menos, de grau moderado, e a maioria apresentou forte correlação (Tabela 2).

As medidas manuais da EMIC apresentaram boa reprodutibilidade intraobservador. A diferença média foi de $0,04 \pm 0,03$ mm, entre duas medidas realizadas pelo mesmo observador, sendo os limites de concordância no nível 95% entre -0,02 a 0,1 mm, enquanto as medidas máximas semiautomáticas mostraram ter média de diferença de $0,04 \pm 0,04$ mm, com limites de concordância entre -0,04 a 0,12 mm. Portanto, foram semelhantes as reprodutibilidades intraobservador para os métodos manual e semiautomático.

A comparação das medidas manuais por dois observadores independentes (interobservador) diferença média de $0,05 \pm 0,05$ mm, sendo os limites de concordância no nível 95% entre -0,04 a 0,15 mm. Já as medidas semiautomáticas máximas diferiram na média de $0,05 \pm 0,05$ mm, estando entre -0,05 a 0,14 mm os limites de concordância. Logo, foram semelhantes as reprodutibilidades interobservadores para os métodos manual e semiautomático (Tabela 3).

Discussão

Foi demonstrado que a medida de EMIC aferida pelo método manual apresenta muito boa correlação com a medida semiautomática máxima ($r = 0,84$). Os dados também sugerem que o método manual apresenta concordância moderada com o semiautomático máximo, sendo documentada uma pequena diferença média entre os métodos. Além disso, os limites de concordância são considerados aceitáveis para a prática clínica e, em 88% das medidas, as diferenças absolutas entre o manual e semiautomático foi menor que 0,1 mm. Entretanto, o limite de concordância superior indica a possibilidade de, em alguns pacientes, ocorrerem diferenças relevantes entre os

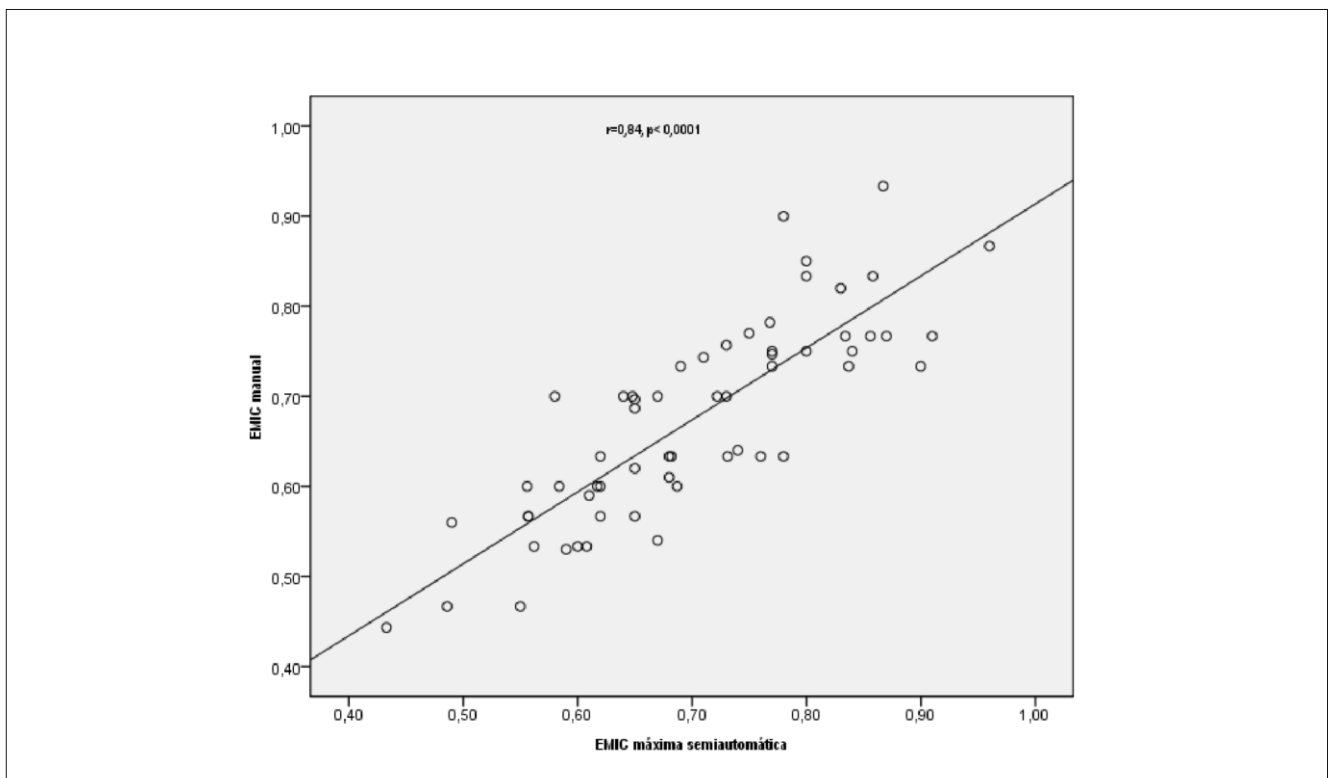


Gráfico 1 - Correlação entre EMIC manual com EMIC máxima semiautomática.

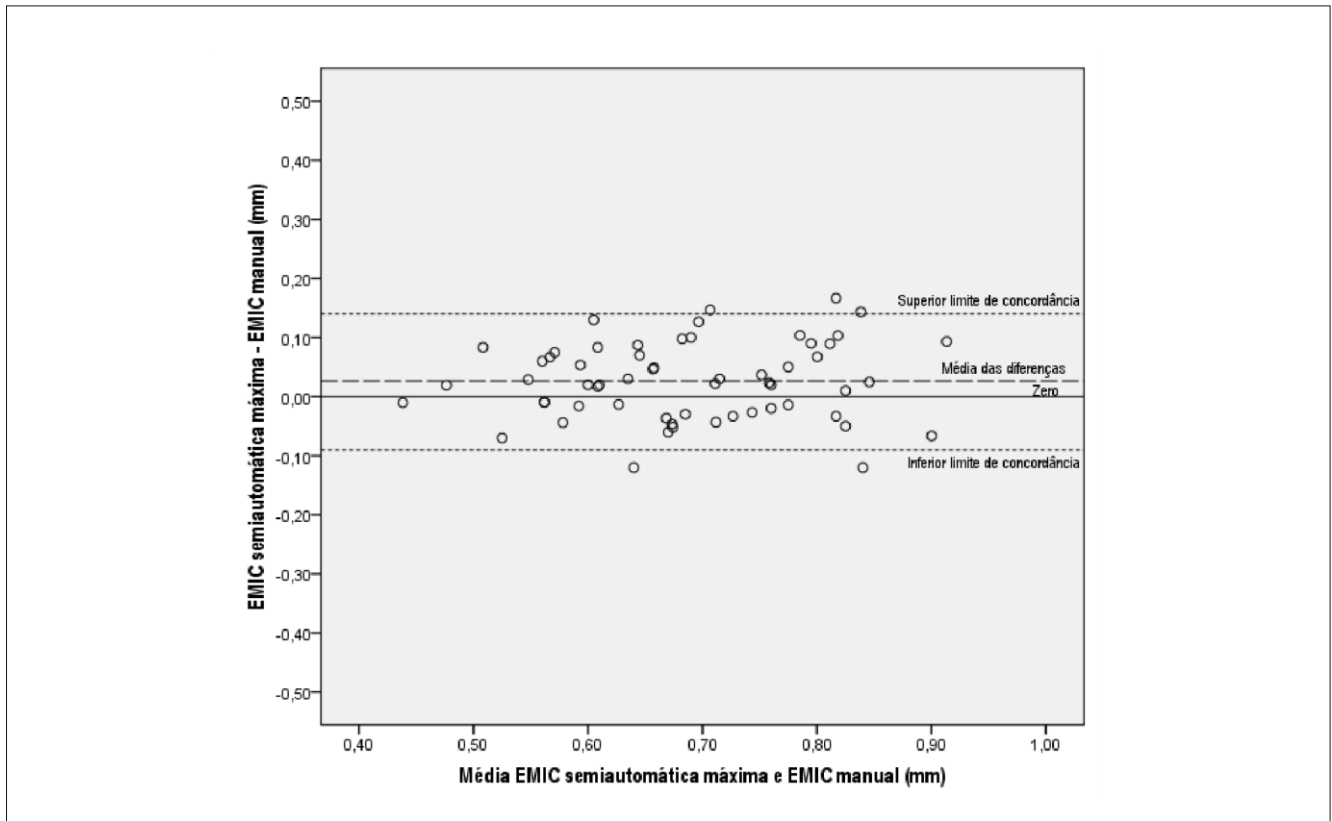


Gráfico 2 – Gráfico de Bland-Altman comparando os valores da espessura mediointimal carotídea pelos métodos manual e semiautomático;

Linha cheia: zero; linha tracejada: média das diferenças de 0,026 mm; linhas pontilhadas: limites de concordância superior (0,14 mm) e inferior (-0,09mm).

Tabela 2 – Correlação das medidas de EMIC intra e interobservador

Medida	Correlação	P
<i>Intraobservador</i>		
EMICmanual	0,89	<0,0001
EMICSAmax	0,89	<0,0001
<i>Interobservador</i>		
EMICmanual	0,79	<0,0001
EMICSAmax	0,86	<0,0001

EMICmanual = espessura mediointimal carotídea pelo método manual; EMICSAmax = espessura mediointimal carotídea máxima pelo método semiautomático.

Tabela 3 – Reprodutibilidade intra e interobservador das medidas manuais e semiautomáticas

Medida	Média das diferenças*	Desvio-padrão	Limites de concordância (95%)
<i>Intraobservador</i>			
EMICmanual (mm)	0,040	0,030	-0,020 - 0,100

EMICSAmax (mm)	0,039	0,041	-0,041 - 0,121
Interobservador			
EMICmanual (mm)	0,053	0,048	-0,045 - 0,149
EMICSAmax (mm)	0,039	0,041	-0,043 - 0,121

(*) média calculada após a retirada dos sinais negativos; EMICmanual = espessura mediointimal carotídea pelo método manual; EMICSAmax = espessura mediointimal

carotídea máxima pelo método semiautomático

dois métodos, ainda mais considerando-se a faixa normal de valores das espessuras da população estudada.

A análise de Bland e Altman mostra resultado favorável à validação do método manual, tendo a EMIC máxima semiautomática como referência, principalmente levando-se em conta a reprodutibilidade do método semiautomático, ou seja, levando-se em conta a interação entre acurácia e reprodutibilidade.

Os resultados do teste de Kappa corroboram os achados descritos de média das diferenças, havendo grau moderado de concordância das medidas do método manual com as medidas máximas do método semiautomático, para o ponto de corte de 0,65 mm¹². Tais níveis de concordâncias podem ser justificados quando se trabalha com valores predominantemente baixos e normais, como as medidas aqui registradas¹³.

Foram detectadas significativas correlações entre as medidas na análise intra e interobservador, que variaram de 0,79 a 0,89; contudo, o coeficiente de correlação avalia apenas a relação de replicação das medidas de forma linear e não a concordância entre elas, não sendo um bom indicador de reprodutibilidade¹⁰.

A reprodutibilidade das medidas por ambos os métodos pôde ser confirmada pelas pequenas médias das diferenças entre elas, tanto em análise intra como interobservador, semelhante aos resultados publicados em importante trabalho de revisão de 23 artigos¹⁴ e como recomendado pelo Consensus da Sociedade Americana de Ecocardiografia em 2008, que preconiza inferior a 0,11 mm.⁸ Também os limites de concordância registrados foram valores dentro da faixa de mínima variabilidade e concordantes com dados do *Tromso Study*, onde os autores documentaram que em pacientes sem placas ateroscleróticas tal limite é até 0,2 mm¹³.

Novas técnicas ultrassonográficas evoluíram desde as primeiras aplicações do método na pesquisa da aterosclerose, como mais alta resolução de imagem e também mais nova tecnologia para aferição da EMIC, visando, principalmente, conferir menor variabilidade das medidas, como é o caso da técnica semiautomática¹⁵. É importante registrar que a Força Tarefa da Sociedade Americana de Ecocardiografia de 2008 (*Consensus Statement for the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force*) considera ser o método semiautomático o mais recomendável e mais acurado, além de otimizar o tempo de realização do exame⁸.

O método semiautomático, entretanto, demanda um custo financeiro relacionado ao *software* utilizado para analisar as imagens, e por ser mais recente, ainda não é disponível em muitos centros diagnósticos de imagem. Além desse fator, na prática, nem sempre é possível a obtenção de um segmento arterial com imagem suficientemente satisfatória para a obtenção das medidas semiautomáticas, sendo esse um fator limitante, mesmo em mãos de observadores experientes¹⁶. Da seleção inicial de 60 pacientes para esse trabalho, inclusive, uma foi excluída, justamente por essa razão.

A amostra constituída exclusivamente de mulheres jovens e com obesidade foi uma das limitações do estudo, e estudo mais amplo do ponto de vista populacional dará maior poder de validação. Deve-se reconhecer também que as análises comparativas entre os métodos foram feitas baseadas em imagens previamente adquiridas e armazenadas digitalmente, não sendo possível avaliar a variação relacionada ao procedimento de aquisição pelo examinador. Contudo, a intenção primordial do atual trabalho foi de análise da reprodutibilidade da medida da espessura em si, não da sua aquisição.

A orientação fornecida pelo mais recente Consenso⁸ foi de incluir, como parte da medida da EMIC semiautomática, placa de ateroma identificada no segmento a ser medido. Nessa condição, estimam-se mudanças dos valores médios e máximos da espessura mediointimal semiautomática, o que inviabiliza a comparação com a medida manual simplificada. Contudo, na amostra estudada não foram registradas placas nos segmentos examinados, portanto

Referências

1. Yamagishi T, Kato M, Koiwa Y, Hasegawa H, Kanai H. Impact of lifestyle-related diseases on carotid arterial wall elasticity as evaluated by an ultrasonic phased-tracking method in Japanese subjects. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(6):782-91.
2. Yamagishi T, Kato M, Koiwa Y, Omata K, Hasegawa H, Kanai H. Evaluation of plaque stabilization by fluvastatin with carotid intima- medial elasticity measured by a transcutaneous ultrasonicbased tissue characterization system. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(5):662-73.
3. Salonen R, Tervahauta M, Salonen JT, Pekkanen J, Nissinen A, Karvonen MJ. Ultrasonographic manifestations of common carotid atherosclerosis in elderly eastern Finnish men. Prevalence and

qualquer inferência sobre concordância das medidas para cenário de maior carga aterosclerótica não deve ser feita.

É estabelecido que as duas medidas de EMIC, média e máxima, fornecidas pela técnica semiautomática, associam-se com fatores de riscos cardiovasculares^{17,18}. Além disso, numa análise *post hoc*, com os 984 indivíduos do estudo METEOR, observou-se alta reprodutibilidade em ambos os métodos, manual e semiautomático, com similares graus de relação com fatores de risco. Adicionalmente, registrou-se com as duas modalidades efeito semelhante da terapêutica com estatina na medida da EMIC¹⁸. Considerando que a medida máxima deve refletir o grau mais avançado da carga aterosclerótica e que tem sido usada em importantes trabalhos geradores de distribuição populacional de valores da espessura mediointimal carotídea¹⁹⁻²¹, justifica-se aqui o uso dessa como a medida de referência para comparação.

Os dados deste estudo encorajam o uso da medida semiautomática, padronizada nos grandes ensaios clínicos e dos quais foram extraídas as tabelas de distribuição de normalidade de EMIC nas diversas populações. Contudo, o estudo reconhece o método manual como uma ferramenta alternativa para a aferição da EMIC, em razão da muito boa correlação entre ambos, com reprodutibilidades semelhantes e adequadas, bem como concordância satisfatória considerando a pequena média das diferenças entre as medidas e o índice de Kappa.

Conclusão

O método manual de aferição da espessura mediointimal carotídea pôde ser validado como método alternativo ao semiautomático para a amostra estudada. A realização de estudo mais abrangente é recomendável.

- associations with cardiovascular diseases and risk factors. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(10):1631-40.
4. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Saklo M, Sharret AR, et al. Incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. 1987-1993. *Am J Epidemiol*. 1997;146(6):484-94.
5. Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies of atherosclerotic progression. *Circulation*. 1993;8(3 Suppl)7:II56-II65.
6. Freitas D, Alves A, Pereira A, Pereira T. Increased intima-media thickness is independently associated with ischemic stroke. *Arq Bras Cardiol*. 2012;98(6):497-504.

7. Stein JH, Korcarz CE, Mays ME, Douglas PS, Palta M, Zhang H, et al. A semiautomated ultrasound border detection program that facilitates clinical measurement of ultrasound carotid intima-media thickness. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18(3):244-51.
8. Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, et al. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008;21(2):93-111.
9. Ludwig M, von Petzinger-Kruthoff A, von Buquoy M, Stumpe KO. [Intima media thickness of the carotid arteries: early pointer to arteriosclerosis and therapeutic endpoint]. *Ultraschall Med.* 2003;24(3):162-74.
10. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1(8476):307-10.
11. Howard G, Sharrett AR, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA, et al. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. ARIC Investigators. *Stroke.* 1993;24(9):1297-304.
12. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74.
13. Stensland-Bugge E, Bonna KH, Joakimsen O. Reproducibility of ultrasonographically determined intima-media thickness is dependent on arterial wall thickness. The Tromso Study. *Stroke.* 1997;28(10):1972-80.
14. Kanters SD, Algra A, van Leeuwen MS, Banga JD. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements: a review. *Stroke.* 1997;28(3):665-71.
15. Faita F, Gemignani V, Bianchini E, Giannarelli C, Ghiadoni L, Demi M. Real-time measurement system for evaluation of the carotid intima-media thickness with a robust edge operator. *J Ultrasound Med.* 2008;27(9):1353-61.
16. Simon A, Garipey J, Chironi G, Megnien JL, Levenson J. Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk. *J Hypertens.* 2002;20(2):159-69.
17. Baldassarre D, Amato M, Bondioli A, Sirtori CR, Tremoli E. Carotid artery intima-media thickness measured by ultrasonography in normal clinical practice correlates well with atherosclerosis risk factors. *Stroke.* 2000;31(10):2426-30.
18. Peters SA, den Ruijter HM, Palmer MK, Grobbee DE, Crouse JR 3rd, O'Leary DH, et al. Manual or semi-automated edge detection of the maximal far wall common carotid intima-media thickness: a direct comparison. *J Intern Med.* 2012;271(3):247-56.
19. Tzou WS, Douglas PS, Srinivasan SR, Bond MG, Tang R, Li S, et al. Distribution and predictors of carotid intima-media thickness in young adults. *Prev Cardiol.* 2007;10(4):181-9.
20. Fowkes FG, Housley E, Cawood EH, Macintyre CC, Ruckley CV, Prescott RJ. Edinburgh Artery Study: prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol.* 1991;20(2):384-92.
21. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK, Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1999;340(1):14-22.

ARTIGO 3**ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO**

Título: “Influence of High-dose Statin Therapy *versus* Low-dose Statin Therapy

Combined with Ezetimibe on Endothelial Function: A Randomized Clinical Trial”

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA:

Lipids

Anexo 1. Normas de publicação

Anexo 2. Carta ao editor

Anexo 3. Artigo pronto submetido



Influence of High-dose Statin Therapy versus Low-dose Statin Therapy Combined with Ezetimibe on Endothelial Function: A Randomized Clinical Trial

Journal:	<i>Lipids</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Garcia, Maristela; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine Varela, Carolina; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine Silva, Patricia; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine Lima, Paulo; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine Góes, Paulo; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine Rodrigues, Marilia; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine Lima, Maria; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine Ladeia, Ana Marice; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine Guimaraes, Armenio; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine Correia, Luis; Bahian School of Medicine and Public Health, Pos-Graduate Salvador , Bahia, Brazil, Medicine
Keywords:	Antioxidants < Oxidized Lipids, HMG-CoA reductase < Specific Lipids, Hydrogenation < Specific Lipids, Atherosclerosis < Physiology, Cholesterol < Specific Lipids, LDL < Lipoproteins

INTRODUCTION

The cardiovascular benefits of cholesterol-lowering therapy with statins have been shown in the primary¹ and secondary² prevention scenarios. Improvement in endothelial function is one of the mechanisms involved and is considered to be a consequence of the lipid-lowering effect of statins. Conversely, some authors suggest that the improvement in endothelial function is also mediated by pleiotropic action,^{3,4} that is independent of cholesterol, such as anti-inflammatory, antioxidant and antithrombotic actions.⁵⁻⁷

Clinical confirmation has been limited by the difficulty in isolating the theoretical pleiotropism from the lipid-lowering effect of statins. The advent of ezetimibe as a drug for treating hypercholesterolemia enabled a scientific model that is appropriate for testing the pleiotropic hypothesis by allowing the same degree of LDL-cholesterol reduction to be obtained with a lower dose of statins.⁸ This model is based on the fact that ezetimibe does not interfere with the mevalonate pathway, and its effect is only mediated by intestinal cholesterol absorption.⁹ For the same cholesterol reduction, if higher doses of statin promoted a greater benefit than lower doses of statin, then this finding would represent clinical evidence favoring the pleiotropic action.

To test the hypothesis that the statin dose influences the endothelial function, regardless of the LDL-cholesterol reduction, we conducted a randomized clinical trial. In the present study, endothelial function was assessed by brachial arterial flow-mediated vasodilation (FMD).

METHODS

Study Design

This randomized, double-blinded and placebo-controlled clinical trial was registered under identifier NCT01241097 on *Clinical Trials.gov* and conducted at the Obesity Outpatient Clinic of the Medical School of Bahia, Brazil. The study was approved by the Ethics Committee of the Institution, under protocol number 157/2009, and all participants signed an informed consent form.

Sample Selection

Women who were registered in the clinic were consecutively selected according to the following inclusion criteria: over 18 years of age, a body mass index (BMI) > 25 kg/m²

and LDL cholesterol > 100 mg/dL. The following characteristics were exclusion criteria: the use of statin, ezetimibe, fibrate or hormone replacement therapy in the previous three months; triglycerides > 400 mg/dL; serum creatinine > 2.0 mg/dL; liver enzymes at least 1.5 times above the normal reference limit; serum creatine kinase (CK) more than three times the normal limit; pregnancy or lactation; and the presence of heart failure, collagen diseases, acute inflammatory processes or psychiatric diseases. Individuals who started using beta-blockers, converting-enzyme inhibitors or calcium channel blockers in the previous four weeks were also excluded from the study.

Study Protocol

After selection, the women were randomized in blocks of three participants, for the following treatment modalities: 1) simvastatin 80 mg, 2) simvastatin 10 mg and ezetimibe 10 mg and 3) placebo. The following criteria for early discontinuation of the therapy were used: intolerance to medication use; liver enzymes increased more than three times the upper limit of normality or a single CK measure exceeded 10 times the upper limit of normality.

Three sequential assessments were performed to evaluate endothelial function and collect laboratory data: the first assessment was performed before treatment began; the second occurred after four weeks of treatment; and the third and final evaluation occurred after eight weeks. These assessments also recorded the following potential adverse events: major (rhabdomyolysis, liver failure, kidney failure, pancreatitis, obstructive jaundice, death), intermediate (myalgia, diarrhea and vomiting, etc.) and minor (constipation, nausea and flatulence, etc.).

Biochemical Analysis

Blood samples were collected after 12 hours of fasting, following the techniques and standardized methods. C-reactive protein levels were measured by commercially available high-sensitivity nephelometric method¹⁰ (Dade Behring Inc., Newark, DE, USA). Total plasma cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides were measured using the enzymatic biochemical method (Dade Behring Inc., Newark, DE, USA).

Flow-mediated Vasodilation of the Brachial Artery

A high-resolution GE model Vivid 3 color Doppler ultrasound device was used. The exam was performed according to previously published guidelines,¹¹ and the volunteers were studied after fasting for four hours and resting for 10 minutes in the supine position at a controlled temperature (22°C - 24°C). All images were recorded and analysed by the same observer, blinded to treatment allocation. The brachial artery was identified in the longitudinal axis, three centimeters above the antecubital fossa. A longitudinal image with six to eight inches of the artery was obtained and considered as basal image. Then, the sphygmomanometer was positioned on the forearm and inflated to at least 50 mmHg above the baseline systolic blood pressure for five minutes to occlude the artery. Subsequently, the sphygmomanometer was deflated, inducing a brief high-flow state or reactive hyperemia, and the image of the FMD was obtained after one minute. This image represented the endothelium-dependent vasodilation, due to the effect of nitric oxide that was produced in response to shear stress. The moving image was scanned beginning 30 seconds before the deflation and up to two minutes after deflation.

Data Analysis

The sample size was estimated *a priori*, aiming to promote a statistical power of 90% ($\alpha = 5\%$) to detect a 20% absolute difference between the groups (simvastatin and simvastatin / ezetimibe) in the variation of FMD obtained with the treatment (intergroup comparison). We used the pessimistic assumption that the standard deviation of the delta in each group would be approximately 15%, which would require 13 patients in each group.

FMD was calculated as the percentage variation in the artery diameter after hyperemia. The effect of the treatment on endothelial function was measured primarily by the percentage variation of FMD between baseline and after eight weeks of treatment. This variable was compared between the two treatment groups using the Mann-Whitney test. In the intragroup analysis, the FMD measurement before and after treatment was separately compared in each group using the Wilcoxon signed-rank test. The ANOVA for repeated measures was used for pairwise comparison of the FMD between the three assessments (baseline, four weeks and eight weeks). This analysis was also used to compare the effects of the treatment when considering the three assessments through the interaction between group and assessment. Possible

confounding variables resulting from clinical differences between the groups were adjusted in this analysis.

In addition, the percentage variation of FMD in the treatment groups between baseline and the eighth week were compared with the placebo group by the MannWhitney test. In this case, we chose not to use the simultaneous comparison of the three groups (ANOVA) because it was a complementary analysis that did not concern the main hypothesis of the study. The comparison between groups considering the intermediate analysis (fourth week) was treated similarly because it was also a complementary analysis.

The linear association between changes in LDL cholesterol and FMD was tested by the Spearman correlation coefficient. Analysis of covariance was used to adjust the effect of the treatments for age. Two-tailed probability levels < 0.05 were considered significant. The results are presented as the mean \pm standard deviation for continuous variables and percentages for categorical variables. Variables that were not within the normal distribution are expressed as medians and interquartile ranges. The program Statistical Package for Social Sciences, version 20 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL), was used for the statistical analysis.

RESULTS

Sample Characteristics

The sample consisted of young adult women (43 ± 10 years) with obesity, as evidenced by a mean BMI of 35 ± 5.8 kg/m². Mean plasma LDL-cholesterol levels were slightly increased (137 ± 31 mg/dL), whereas the median C-reactive protein level of 3.6 mg/L (interquartile range (IQR) = 1.7 mg/L - 6.7 mg/L) suggested an exacerbated inflammatory status. Regarding endothelial function, mean FMD were in normal range ($8.5\% \pm 4.3\%$). Among all subjects, 8.7% were diagnosed with diabetes and 41% had high blood pressure. No participant had hepatic or renal impairment.

By randomization, 16 women were allocated to the simvastatin group, 16 to the simvastatin / ezetimibe group and 14 to the placebo group (Figure 1). There were no significant differences between treatment groups regarding clinical and laboratory characteristics and classes of antihypertensive drugs (Table 1), except for age, which was higher in the simvastatin / ezetimibe group (48 ± 8.1 years), followed by simvastatin group (41 ± 8.6 years) and the placebo group (40 ± 12 years) ($P = 0.05$).

Flow-mediated vasodilation was similar between the simvastatin ($8.4\% \pm 4.3\%$), simvastatin / ezetimibe ($7.6\% \pm 3.9\%$) and placebo ($9.8\% \pm 4.5\%$) groups ($P = 0.31$).

During the eight weeks of study, there were no treatment interruptions, and all three groups presented full and identical adherence. No side effects that required treatment discontinuation were registered. Minor symptoms were reported, of which the most frequent was headache (one case in the simvastatin group, one case in the simvastatin / ezetimibe group and three cases in the placebo group), followed by pain in the legs (one case in the simvastatin group and one case in the simvastatin / ezetimibe group) and vomiting (one case in the simvastatin / ezetimibe group).

Anti-lipemic Effect of the Treatments

A significant reduction in LDL cholesterol was similarly observed after the eight weeks of active treatment in the simvastatin ($-27\% \pm 31\%$) and simvastatin / ezetimibe groups ($-30\% \pm 29\%$) ($P = 0.75$). The absolute reduction was 36 ± 45 mg/dL in the simvastatin group and 45 ± 36 mg/dL in the simvastatin / ezetimibe group ($P = 0.57$). The placebo group showed no LDL-cholesterol reduction (Table 2 and Figure 2).

The reduction in the LDL-cholesterol levels was present after four weeks of treatment and did not differ from the eighth week in the simvastatin group ($P = 0.15$) or the simvastatin / ezetimibe group ($P = 0.90$).

There were no significant variations in the HDL cholesterol or plasma triglyceride in any of the treatment groups, except for a reduction in the triglycerides in the simvastatin group. Similarly, glucose and C-reactive protein levels remained constant. The liver enzymes and creatine kinase had no significant changes throughout the treatments.

Effect of the Treatments on the Arterial Flow-mediated Vasodilation

The simvastatin group showed an increase in FMD, from $8.4\% \pm 4.3\%$ to $11\% \pm 4.2\%$ after eight weeks of treatment ($P = 0.02$). Similarly, the simvastatin / ezetimibe group improved vasodilatation from $7.3\% \pm 3.9\%$ to $12\% \pm 4.4\%$ ($P = 0.001$). In relative terms, the variation in arterial vasodilation had a median value of $+39\%$ (IQR = $2.2\% - 105\%$) in the simvastatin group, which was similar to the $+41\%$ (IQR = $13\% - 227\%$) in the simvastatin / ezetimibe group ($P = 0.36$). This comparison remained non-significant

after adjusting for the age difference between these two groups (ANCOVA, $P = 0.30$). The placebo group showed a minimal change in arterial vasodilation, with a median of +6.2% (IQR = -6.6% - 56%), with no significance when comparing the baseline and the eighth week measurements ($P = 0.28$) (Table 3 and Figure 3).

When performing pairwise comparisons of the three assessments (baseline, four weeks and eight weeks) by repeated measures ANOVA, the simvastatin ($P = 0.045$) and the simvastatin / ezetimibe groups ($P = 0.001$) showed significant variation, which was different from the placebo group ($P = 0.25$). In this analysis, there was no interaction between group and time point assessment when only the active treatments were considered ($P = 0.30$), suggesting that these two groups showed similar variation.

Unlike the effect on LDL-cholesterol, the four weeks of treatment were not sufficient to affect the arterial FMD, although a trend of improved vasodilation was already observed at this intermediate assessment. This improvement was represented by a median of +27% (IQR = -13% - 63%, $P = 0.09$) in the simvastatin group and +25% (IQR = -4% - 92%, $P = 0.03$) in the simvastatin / ezetimibe group.

There was a negative correlation ($r = -0.33$, $P = 0.03$) between the variations in LDL cholesterol and FMD when the three groups were analyzed together (Figure 4).

DISCUSSION

The present study suggests that the improvement in endothelial function promoted by statin therapy depends primarily on the lipid-lowering effect, with no evidence of pleiotropic action. The pleiotropic hypothesis was tested using different doses of simvastatin (80 mg *versus* 10 mg), under the assumption that a dose-response gradient would be apparent if such a mechanism were present. To prevent the degree of LDLcholesterol reduction from being a confounding factor, ezetimibe was administered to the group with the lower dose of simvastatin, which provided the same lipid-lowering effect of the high-dose group. Thus, when observing that both therapies showed the same benefit to endothelial function, we conclude for the absence of a dose-response gradient.

In addition to this result, some secondary findings deserve attention. First, the presence of a placebo group that did not show any changes in the endothelial function assures us that the improvement observed in the two active treatment groups was not due to the regression toward the mean phenomenon. Second, the negative correlation

between the magnitude of LDL-cholesterol reduction and the improvement of endothelial function presents further evidence in favor of the anti-lipemic mechanism. Finally, regarding the anti-inflammatory mechanism, the treatment did not reduce the C-reactive protein level in any of the groups, making it unlikely that preventing inflammation was an additional mechanism to improve endothelial function.

A recent study by Westerink J *et al.*¹² corroborates our results. This study demonstrated the same endothelial effect of high-dose simvastatin *versus* low-dose simvastatin combined with ezetimibe in patients with metabolic syndrome. Similar findings were also reported by Settergren M *et al.*¹³ in patients with diabetes or coronary artery disease. In contrast, Liu *et al.*¹⁴ only obtained improved FMD with higher doses of simvastatin and suggested pleiotropic benefits, resulting from the use of statins, based on the four weeks results. This choice for short-term follow-up may have precluded the observation of the effects that depend on a longer treatment time. Furthermore, in this study, the variation of FMD was not the primary objective.

Some limitations of the present study should be recognized. First, the sample studied only included overweight women. Because it was a small study, we chose to include a homogeneous sample homogenization, exclusively with females. The selection of overweight women aimed to include a group that is predisposed to changes in endothelial function,¹⁵ increasing the possibility of observing the corrective effect of the therapy. Although this restricted sample population can be justified, we must recognize that it reduces the scope of the study to the general population. Second, the degree of dyslipidemia in our sample was small, which may have underestimated the benefits of the lipid-lowering therapy. Finally, we must remember that the study tested a surrogate outcome (purely mechanistic purpose) and cannot be interpreted as evidence that the clinical effects of the two therapies are similar.

In conclusion, this randomized clinical trial demonstrates that cholesterol reduction is the fundamental mechanism underlying the endothelial function improvement that is obtained with statins, making it unlikely that pleiotropic mechanisms exert a relevant influence.

Reference List

- (1) Fonseca FA, Izar MC. Primary prevention of vascular events in patients with high levels of C-reactive protein: the JUPITER study. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2009 September;7(9):1041-56.
- (2) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994 November 19;344(8934):1383-9.
- (3) Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 1996 October 19;348(9034):1079-82.
- (4) Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995 February 23;332(8):481-7.
- (5) Guo H, Shi Y, Liu L, Sun A, Xu F, Chi J. Rosuvastatin inhibits MMP-2 expression and limits the progression of atherosclerosis in LDLR-deficient mice. *Arch Med Res* 2009 July;40(5):345-51.
- (6) Obi C, Wysokinski W, Karnicki K, Owen WG, McBane RD. Inhibition of platelet-rich arterial thrombus in vivo: acute antithrombotic effect of intravenous HMGCoA reductase therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 September;29(9):1271-6.
- (7) Ridker PM, Cannon CP, Morrow D et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005 January 6;352(1):20-8.
- (8) Davidson MH, McGarry T, Bettis R et al. Ezetimibe coadministered with simvastatin in patients with primary hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2002 December 18;40(12):2125-34.
- (9) Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. *Circulation* 2002 October 8;106(15):1943-8.
- (10) Rifai N, Tracy RP, Ridker PM. Clinical efficacy of an automated high-sensitivity C-reactive protein assay. *Clin Chem* 1999 December;45(12):2136-41.
- (11) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the I. *J Am Coll Cardiol* 2002 January 16;39(2):257-65.
- (12) Westerink J, Deanfield JE, Imholz BP et al. High-dose statin monotherapy versus low-dose statin/ezetimibe combination on fasting and postprandial lipids and endothelial function in obese patients with the metabolic syndrome: The PANACEA study. *Atherosclerosis* 2013 March;227(1):118-24.
- (13) Settergren M, Bohm F, Ryden L, Pernow J. Cholesterol lowering is more important than pleiotropic effects of statins for endothelial function in patients with dysglycaemia and coronary artery disease. *Eur Heart J* 2008 July;29(14):1753-60.

(14) Liu PY, Liu YW, Lin LJ, Chen JH, Liao JK. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. *Circulation* 2009 January 6;119(1):131-8.

(15) Esposito K, Pontillo A, Di PC et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003 April 9;289(14):1799-804.

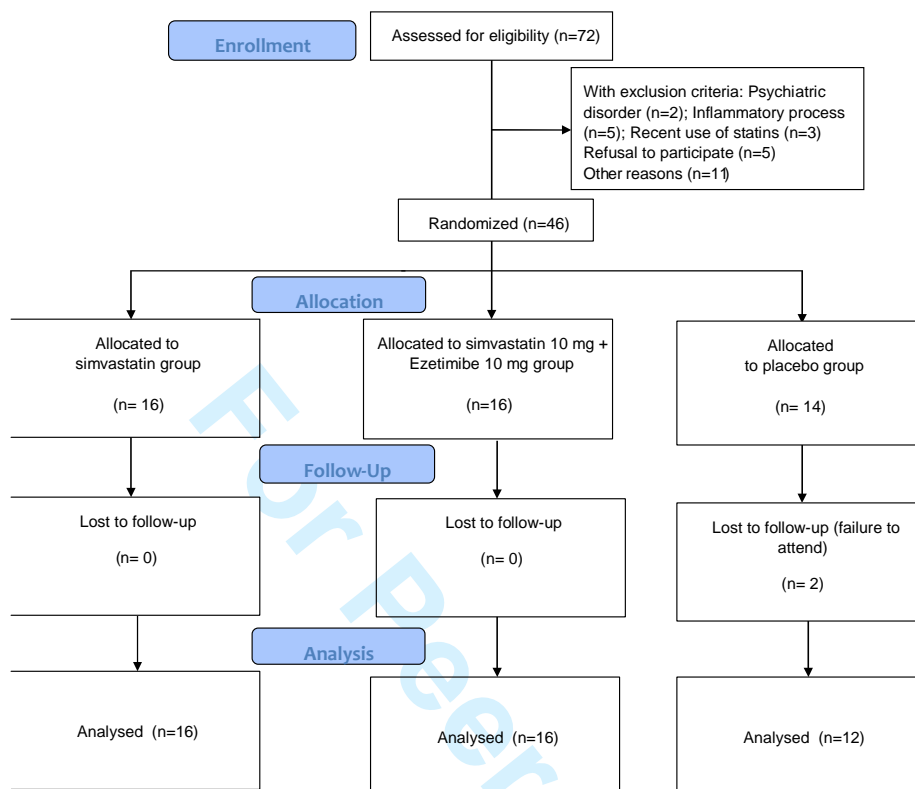


Figure 1- Diagram flow of study protocol

Table 1. Comparison of baseline clinical and laboratory characteristics between the treatment groups.

	Simvastatin	Simvastatin/Ezetimibe	Placebo	P Value
Sample Size	16	16	14	
Age (years)	41 ± 8.6	48 ± 8.1	40 ± 12	
Body mass index (kg / m ²)	25 ± 4.3	36 ± 4.4	36 ± 8.6	
Waist (cm)	107 ± 7.6	108 ± 9.9	107 ± 17	
Waist-to-hip	0.92 ± 0.071	0.92 ± 0.67	0.91 ± 0.56	
SBP (mmHg)	133 ± 15	132 ± 18	130 ± 18	
DBP (mmHg)	85 ± 9	86 ± 13	81 ± 14	
Total Cholesterol (mg / dL)	205 ± 29	225 ± 47	206 ± 33	
HDL-cholesterol (mg / dL)	49 ± 11	52 ± 12	49 ± 11	
LDL-cholesterol (mg / dL)	132 ± 25	145 ± 40	136 ± 27	
Triglycerides (mg / dL)	125 ± 51	145 ± 92	115 ± 41	
C-reactive protein (mg / dL)	3.9 (2.1 – 8.1)	3.0 (1.8 – 5.1)		
	0.83 ± 0.11	0.79 ± 0.12	0.85 ± 0.18	0.05
	18 ± 5.1	20 ± 4.6		0.90
	18 ± 5.1	20 ± 4.6		0.94
Glucose (mg / dL)	18 ± 5.1	20 ± 4.6		0.84
	32 ± 11.74	42 ± 22.99		0.86
			94 ± 19	0.52
Urea (mg / dL)				0.26
	123 ± 60	168 ± 88	109 ± 62	0.75
Creatinine (mg / dL)				0.50
	5 (31%)	6 (38%)		0.46
AST (U / L)			20 ± 11	0.70
	2 (13%)	0 (0%)		0.22
ALT (U / L)			20 ± 11	0.42
	1 (6.3%)	2 (13%)		0.55
GGT (U / L)			42 ± 23.70	0.71
Creatine kinase (mg / dL)				0.71
Hypertension				0.27
			8 (57%)	0.07
ACEI			4 (29%)	0.33
ARB			2 (14%)	0.07
Flow-mediated vasodilation				0.75
	8.4% ± 4.3%	7.6% ± 3.9%	9.8% ± 4.5%	0.31

SPB- Systolic blood pressure; DBP- diastolic blood pressure; AST- Aspartate transaminase; ALT- Alanine transaminase; GGT- Gamma glutamyl transferase; ACEI- Use of angiotensin converting enzyme inhibitors; ARB- Use of angiotensin receptor blockers

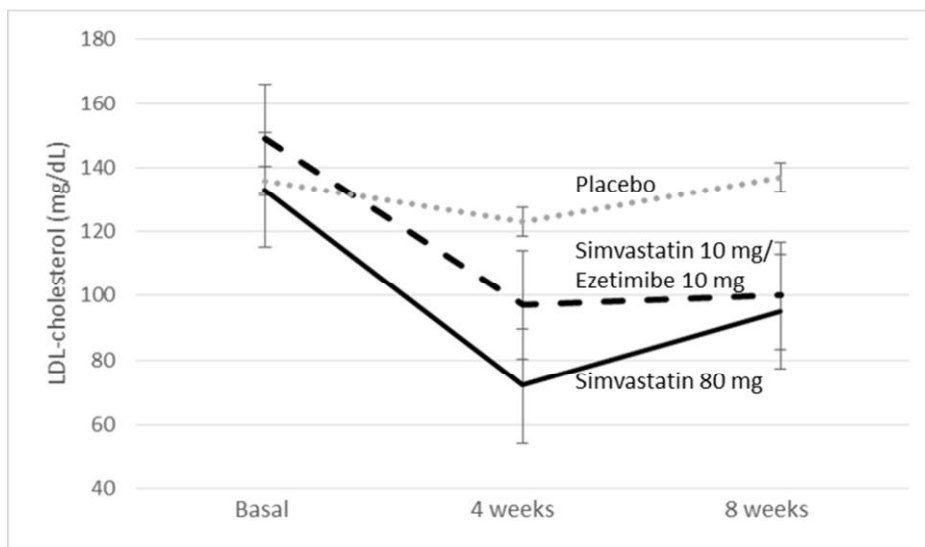


Figure Legend 2. Effect of treatments on LDL cholesterol, demonstrating significant reduction in both active treatment groups, unlike the placebo group.

Table 2. Effect on lipid, metabolic and inflammatory profiles in the three groups

	Basal	8 Weeks	P Value	4 Weeks	P Value (4 vs. 8 weeks)
Simvastatin					
LDL-cholesterol (mg/dL)	133 ± 26	95 ± 44	0.006	72 ± 23	0.15
Cholesterol total (mg/dL)	205 ± 29	166 ± 48	0.007	141 ± 26	0.12
HDL-cholesterol (mg/dL)	49 ± 11	51 ± 12	0.48	49 ± 9.8	0.97
Triglycerides (mg/dL)	125 ± 51	99 ± 39	0.01	91 ± 29	0.26
Glucose (mg/dL)	96 ± 12	95 ± 10	0.88	93 ± 11	0.28
C-reactive Protein (mg/L)	3.9 (2.1 – 8.1)		0.65	3.3 (2.1 – 6.4)	0.14
Simvastatin/Ezetimibe					
LDL-cholesterol (mg/dL)	149 ± 43		< 0.001	97 ± 49	0.90
Cholesterol total (mg/dL)	226 ± 51		< 0.001	169 ± 52	0.83
HDL-cholesterol (mg/dL)	54 ± 12		0.98	53 ± 14	0.39
Triglycerides (mg/dL)	121 ± 67		0.08	124 ± 60	0.52
Glucose (mg/dL)	129 ± 91		0.28	102 ± 22	0.65
C-reactive Protein (mg/L)	3.0 (1.8 – 5.1)		0.66	2.0 (1.7 – 4.2)	0.55
Placebo					
LDL-cholesterol (mg/dL)	136 ± 27		0.80	123 ± 30	0.21
Cholesterol total (mg/dL)	206 ± 33		0.79	52 ± 14	0.32
HDL-cholesterol (mg/dL)	49 ± 11		0.39	201 ± 35	0.50
Triglycerides (mg/dL)	115 ± 41		0.27	132 ± 38	0.48
Glucose (mg/dL)	94 ± 19		0.06	111 ± 54	0.40
C-reactive Protein (mg/L)	3.3 (1.2 – 7.2)		0.11	4.0 (2.4 – 8.2)	0.43

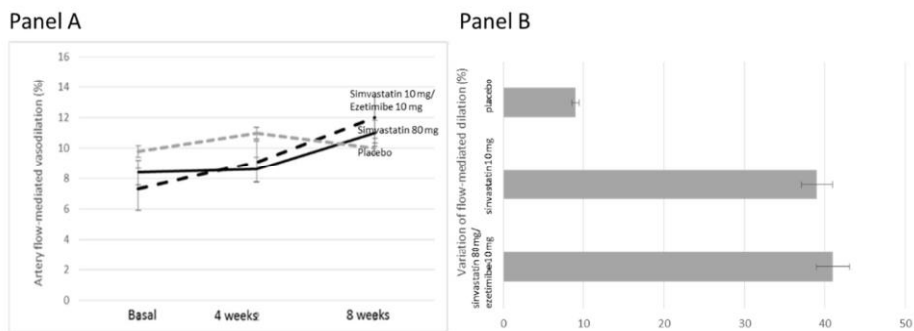


Figure legend 3. Changes of artery flow-mediated vasodilation, indicating positive variation in the two active groups and no variation in the placebo group.

Table 3. Effect on arterial vasodilation of the three treatments

	Basal	8 Weeks	P Value	4 Weeks	P Value (4 vs. 8 weeks)
Simvastatin					
Flow-mediated vasodilation (%)	8.4 ± 4.3	11 ± 4.2	0.02	8.6 ± 3.6	0.03
Changes in flow-mediated vasodilation		+ 39% (2.2% – 105%)		+ 27% (-13% – 63%)	0.09
Simvastatin/Ezetimibe					
Flow-mediated vasodilation (%)	7.3 ± 3.9	12 ± 4.4	0.001	9.1 ± 4.3	0.03
Changes in flow-mediated vasodilation		+ 41% (13% – 227%)		+ 25% (-4% – 92%)	
Placebo					
Flow-mediated vasodilation (%)	9.8 ± 4.5	10 ± 4	0.28	11 ± 2.2	0.93
Changes in flow-mediated vasodilation		+ 9% (-6.6% – 56%)		+13% (-8% – 31%)	

Parenthesis mean 95% confidence intervals.

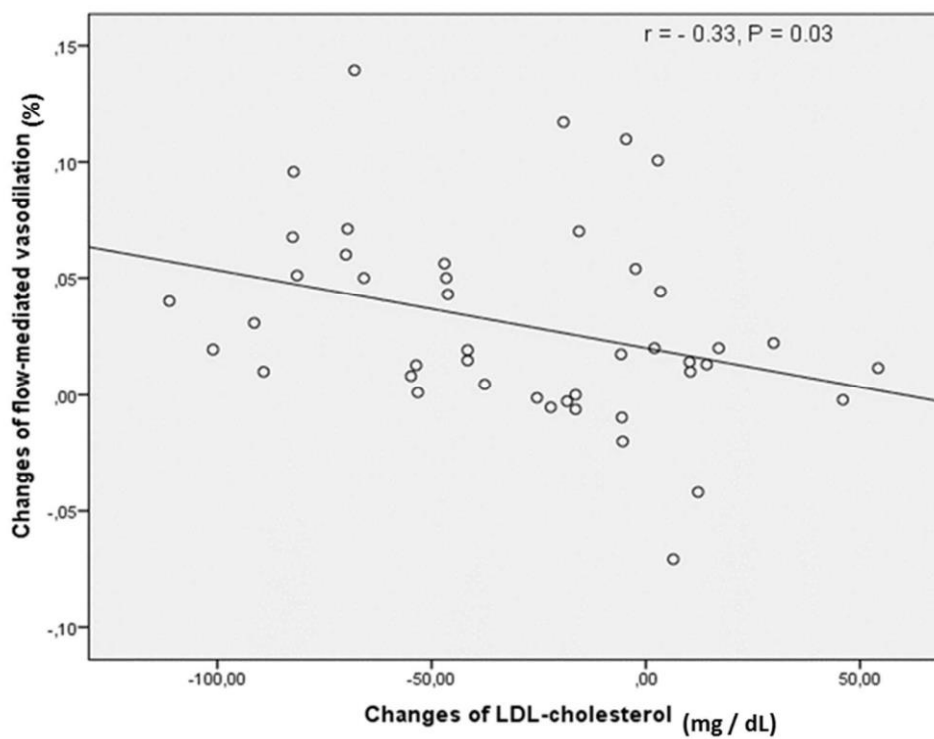


Figure legend 4. Correlations between changes in LDL-cholesterol and changes of flow-mediated vasodilation (Spearman).



October, 28, 2013

Lipids

Editor-in-Chief: Eric J. Murphy

Dear Dr. Eric Murphy

We appreciate the opportunity to submit our paper entitled “Influence of High-dose Statin Therapy versus Low-dose Statin Therapy Combined with Ezetimibe on Endothelial Function: A Randomized Clinical Trial” to *Lipids*.

The cardiovascular benefits of cholesterol-lowering therapy with statins have been shown in primary and secondary prevention scenarios. Improvement in endothelial function is one of the mechanisms involved and is considered to be a consequence of the lipid-lowering effect of statins. Conversely, some authors suggest that the improvement in endothelial function is also mediated by pleiotropic action, that is independent of cholesterol. The present study tested the pleiotropic hypothesis using different doses of simvastatin (80 mg *versus* 10 mg), under the assumption that a dose-response gradient would be apparent if such mechanism were present. To prevent the degree of LDL-cholesterol reduction from being a confounding factor, ezetimibe was administered to the group with lower dose of simvastatin, which provided same lipid-lowering effect of the high-dose group. Thus, if both therapies showed the same benefit to endothelial function, we conclude for the absence of a dose-response gradient and suggest that the improvement in endothelial function promoted by statin therapy depends primarily on the lipid-lowering effect.

The keywords chosen were endothelial function, pleiotropism, statins, ezetimibe. If possible, we would like to keep them.

We confirm that this manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by another journal.

All authors have approved the manuscript and agree with its submission to *Lipids*. The trial was not funded by medical industry and the authors do not have any conflicts of interest.

This article is part of Maristela Garcia PHD Thesis of Bahian School of Medicine and Public Health Post-Graduate Course.

Best Regards,

Maristela Garcia

Corresponding author

Luis C. L. Correia, MD, PhD

Av. Princesa Leopoldina 19/402

Salvador/BA – Brasil 40.150-080

E-mail: lccorreia@terra.com.br Telephone: 55-71-9971-1032