



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

HENRIQUE LOUZAN MACHADO
LEONARDO JADYR SILVA RODRIGUES ALVES

**PERFIL LIPIDÔMICO COMO MARCADOR DE RISCO DE PLACA CORONARIANA
EM PACIENTES ASSINTOMÁTICOS DE RISCO INTERMEDIÁRIO PARA EVENTOS
CARDIOVASCULARES**

BRASÍLIA

2019



HENRIQUE LOUZAN MACHADO
LEONARDO JADYR SILVA RODRIGUES ALVES

**PERFIL LIPIDÔMICO COMO MARCADOR DE RISCO DE PLACA CORONARIANA
EM PACIENTES ASSINTOMÁTICOS DE RISCO INTERMEDIÁRIO PARA EVENTOS
CARDIOVASCULARES**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e
Pesquisa.

Orientação: Profa. Dra. Aline Maria Araújo Martins

BRASÍLIA

2019

PERFIL LIPIDÔMICO COMO MARCADOR DE RISCO DE PLACA CORONARIANA EM PACIENTES ASSINTOMÁTICOS DE RISCO INTERMEDIÁRIO PARA EVENTOS CARDIOVASCULARES

Leonardo Jadyr Silva Rodrigues Alves – UniCEUB, PIBIC-CNPq, aluno bolsista
leonardo.jadyr@sempreceub.com

Henrique Louzan Machado – UniCEUB, PIBIC-CNPq, aluno voluntário
henriquelouzan@sempreceub.com

Aline Maria Araújo Martins – UniCEUB, professor orientador
alinemartins@ceub.edu.br

Mariana Barbosa Ubaldo Paiva – UnB, colaboradora

Mickaella Michelson Martins – UnB, colaboradora

Diego Viana Paiva – UnB, colaborador

Raphaela Menezes de Oliveira – UnB, colaboradora

Helmhton José Brito de Souza – UniCEUB, colaborador

Guilherme Urpia Montes – ICDF, colaborador

Fernando Antibas Atik – ICDF, colaborador

Fábio Neves dos Santos – UniCAMP, colaborador

Marcos Nogueira Eberlin – UniCAMP, colaborador

RESUMO

A despeito dos avanços na prevenção, no diagnóstico e no tratamento da doença cardiovascular (DCV) nos dias atuais, a DCV permanece como uma grande causa de morbimortalidade em todo o mundo. A prevenção primária tem contribuído de forma substancial para a redução nas taxas de mortalidade por doença arterial coronariana; no entanto, ainda existem desafios a serem vencidos. A prospecção de marcadores lipidômicos pode ser utilizada como técnica complementar para a reestratificação de risco cardiovascular em pacientes assintomáticos de risco intermediário de Framingham, cujo manejo clínico adequado é incerto. Neste trabalho, inicialmente submetemos os pacientes à Ecocardiografia transtorácica (Eco-TT) e à Cintilografia Miocárdica (CM), àqueles pacientes com Fração de ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE) preservada e com a CM negativa foram incluídos no projeto. Em seguida, nós comparamos o perfil global de lipídeos entre pacientes com placas coronarianas na angiotomografia (Angio-TC) e sem placa aterosclerótica, classificando-os pelo Escore de Leaman Adaptado (CT-LeSc), utilizando-o como possível discriminante para reestratificação de risco cardiovascular. Pacientes Framingham intermediário com

angiogramia de artérias coronárias foram separados em 3 grupos: ausência de placas (CTRL), placa calcificada (CCP) e placa não calcificada (NCP), com aplicação posterior do CT-LeSc. Este escore caracteriza de forma objetiva a placa em tercís, T1 (CT-LeSc: 0,3 – 3,7), T2 (CT-LeSc: 3,8 – 8,2) e T3 (CT-LeSc: 8,3 – 24,1), com base na localização, grau de estenose e composição da placa aterosclerótica. O N total de pacientes igual a 27, dividido nos 4 grupos (CTRL: 7; T1: 9; T2: 6; T3: 5). Cada grupo teve sua lipidômica analisada por espectrometria de massa tipo MALDI-MS com análise estatística não paramétrica feita pelo software MetaboAnalyst, com análises de PLS-IP (Partial Least Squares Important Features), que leva em conta os perfis diferenciais, e SPLS (Sparse Partial Least Squares), que evidencia melhor a diferença entre de biomarcadores. A lipidômica foi comparada com o escore de cálcio, espessura médio-intimal das carótidas, proteína C reativa US e história familiar de doença aterosclerótica. A análise de SPLS da lipidômica dos grupos NCP, CCP e CTRL mostrou grupos bem estratificados, validando a CT-LeSc e seus tercís, como uma ferramenta de avaliação das placas e seu risco cardiovascular. Através do PLS, foram encontrados lipídios de alta intensidade em T2 e T3 e baixa intensidade em T1 e CTRL, demonstrando um possível marcador de mau prognóstico para eventos cardiovasculares. A técnica de espectrometria de massas mostrou-se aplicável no contexto clínico da Aterosclerose, sendo que sua correlação com o CT-LeSc agregou mais acurácia na discriminação dos fenótipos estudados.

Palavras-Chave: Lipidômica. Escore de Leaman Adaptado. Escore de Framingham. Aterosclerose. Eventos Cardiovasculares

1. INTRODUÇÃO

A despeito dos avanços na prevenção, no diagnóstico e no tratamento da doença cardiovascular (DCV) nos dias atuais, a DCV permanece como uma grande causa de morbimortalidade em todo o mundo [1-6]. A prevenção primária tem contribuído de forma substancial para a redução nas taxas de mortalidade por doença arterial coronariana; no entanto, ainda existem desafios a serem vencidos [7]. Os eventos coronarianos são em sua maioria decorrentes da trombose aguda após a erosão de uma placa instável levando ao infarto agudo do miocárdico, que pode ser a primeira manifestação da doença [1,3,8,9].

Pesquisas recentes sugerem que rupturas de placa geram diversos trombos que ocasionam morte súbita, indicando que a trombose não oclusiva pode preceder o evento fatal com maior frequência do que observado anteriormente [10], e que, na verdade, a maioria das oclusões das artérias coronárias ocorre em vasos com estenose previamente identificada com menos de 50% nos angiogramas realizados nos meses ou anos anteriores. Este achado fortalece o conceito de que infarto não transmural ocorre como resultado de oclusão trombótica súbita no sítio de rotura de placas ateroscleróticas previamente não obstrutivas, porém ricas em lipídios [6,11,12,13].

Nem todos os eventos coronarianos ocorrem em indivíduos com múltiplos fatores de risco tradicionais. Em alguns indivíduos, as anormalidades ligadas ao processo inflamatório, à hemostasia e/ou à trombose isoladamente parecem desempenhar papéis decisivos [6,14]. De fato, à ocasião do primeiro infarto, mais de 75% dos pacientes não estavam sob medidas preventivas baseadas em escores de probabilidade de eventos cardiovasculares tradicionais [1,3]. Portanto, a capacidade de identificar, dentre os indivíduos assintomáticos, o subgrupo que apresenta maior risco de desenvolver eventos cardiovasculares como infarto e morte no futuro representa uma etapa fundamental em qualquer estratégia voltada para a diminuição das taxas de eventos cardiovasculares [7,15].

Dentre os vários escores utilizados para identificar os indivíduos assintomáticos portadores de aterosclerose subclínica e prever seu risco de eventos cardiovasculares, o mais reconhecido e utilizado é o Escore de Framingham (EF) [16]. Ele estima a

probabilidade de ocorrer infarto do miocárdio ou morte por doença coronária no período de 10 anos em indivíduos sem diagnóstico prévio de aterosclerose clínica, a partir das seguintes variáveis: sexo, idade, tabagismo, colesterol total, HDL colesterol e pressão arterial sistólica.

Indivíduos classificados como baixo risco pelo EF tem 10%, ou menos, de chance de desenvolver DCV em 10 anos; os de risco intermediário tem de 10 a 20% de chance de desenvolver DCV em 10 anos e os de alto risco mais de 20% de chance de desenvolver DCV em 10 anos. Cerca de 40% da população adulta dos Estados Unidos está estratificada no “risco intermediário” para doença arterial coronariana (DAC) [6]. Embora os lipídios sanguíneos sejam um importante fator de risco para a aterosclerose, metade de todos os infartos do miocárdio ocorre em indivíduos sem hiperlipidemia manifesta [17] e, mesmo se sabendo que as equações de predição de risco, como a de Framingham, melhoram a detecção do risco de eventos cardiovasculares, cerca de 20% de todos os eventos ocorrem na ausência de qualquer um dos fatores de risco clássicos maiores [6].

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Dentre os vários escores utilizados para identificar os indivíduos assintomáticos portadores de aterosclerose subclínica e predizer seu risco de eventos cardiovasculares, o mais reconhecido e utilizado é o Escore de Framingham (EF) [16].

De fato, o EF identifica adequadamente indivíduos de alto e baixo riscos, tendo, em contrapartida, acurácia limitada na predição de eventos clínicos em pacientes classificados como risco intermediário, sendo, portanto, os pacientes deste último grupo os mais beneficiados com o rastreamento adicional [6,18].

Por estas razões, particularmente para grupo de risco intermediário, caracteristicamente um grupo vasto e heterogêneo, há a necessidade considerável de melhorar a detecção do risco de eventos cardiovasculares, com o desenvolvimento de muitas pesquisas concentradas na identificação e na avaliação de novos fatores de risco ateroscleróticos. Desta forma, as diretrizes vigentes sugerem a utilização de fatores de risco agravantes (marcadores de doença subclínica), a saber: (1) escore de cálcio coronário (EC); (2) espessura médio-intimal da artéria carótida (EMI); (3) índice tornozelo braquial (ITB); (4) Proteína C Reativa ultrasensível (PCRus) e (5) história familiar para doença arterial coronariana precoce. Esta estratificação visa

reclassificar os pacientes como de alto risco e propor estratégias preventivas mais agressivas para eventos cardiovasculares [18-20]. Estudos mais recentes sugerem que, dentre os mencionados, o EC seja preditor de eventos cardiovasculares superior a outras ferramentas de estratificação de risco [19,20].

Sabe-se que os lipídios desempenham papel fundamental na formação e consequente ruptura de uma placa coronariana instável e que a medida bioquímica do perfil lipídico atualmente preconizada, não espelha a real complexidade das alterações do metabolismo lipídico [21]. A angiotomografia das artérias coronárias é um método não invasivo que permite identificar as características da placa que aumentam o risco de ocorrência de síndrome coronariana aguda (infarto ou angina instável) [22-25]. Ainda que instáveis, estas placas geralmente não causam obstrução significativa, não sendo detectadas em exames sob estresse físico ou farmacológico (ex.: teste ergométrico, cintilografia de perfusão miocárdica ou ecocardiograma transtorácico sob estresse), abordagem mais comumente usada na avaliação de risco cardiovascular em pacientes assintomáticos [2,3].

O escore de Leaman adaptado (CT-LeSc) utiliza imagens angiotomográficas para caracterizar a placa coronariana quanto à sua calcificação (placa calcificada/mista ou não-calcificada) e localização. De acordo com essas informações, calcula-se o valor multiplicando o peso da artéria, pela severidade da estenose e tipo de composição, conforme os valores explicitados na *Tabela 1*. Ao final, soma-se os valores de todas as placas para obter o escore resultante. Feito o somatório total, classifica-se os pacientes em T1 (CT-LeSc < 3,7), T2 (3,7 < CT-LeSc < 8,3) e T3 (CT-LeSc > 8,3). [34]

Segment	Right dominance	Left dominance	Balanced
Coronary segments			
RCA proximal	1	0	0.5
RCA mid	1	0	0.5
RCA distal	1	0	0.5
PDA	1	na	0.5
Left main	5	6	5.5
LAD proximal	3.5	3.5	3.5
LAD mid	2.5	2.5	2.5
LAD distal	1	1	1
1st diagonal	1	1	1
2nd diagonal	0.5	0.5	0.5
LCx proximal	1.5	2.5	2.0
1st obtuse marginal	1	1	1
LCx distal	0.5	1.5	1
2nd obtuse marginal	1	1	1
PDA from LCA	na	1	na
PL branch from LCA	na	0.5	0.5
PL branch from RCA	0.5	na	na
Intermediate branch	1	1	1
Stenosis severity			
Obstructive CAD	1		
Nonobstructive CAD	0.615		
Plaque composition			
Non-calcified or mixed	1.5		
Calcified	1		

RCA right coronary artery, *PDA* posterior descending artery, *LAD* left anterior descending, *LCx* left circumflex, *PL* postero-lateral, *CAD* coronary artery disease

Tabela 1. Valores ponderais das placas ateromatosas de acordo com sua localização, composição e severidade da estenose. [34]

A busca por evidência desta vulnerabilidade da placa pode mudar o manejo destes pacientes e melhorar desfechos clínicos [8,9]. A descoberta de marcadores moleculares em pacientes com placas não calcificadas, instáveis, mostra-se como relevante ferramenta para melhor compreensão da doença e desenvolvimento de métodos diagnósticos e terapêuticos mais eficazes.

3. METODOLOGIA

a. Descrição dos estudos clínicos

Participaram da pesquisa pacientes assintomáticos que preencheram critérios clínicos de risco intermediário do escore de Framingham pelos seus médicos assistentes em atendimento cardiológico realizados na cidade de Brasília (DF), Brasil. Estes pacientes foram convidados a realizar os seguintes exames cardiológicos: (1) ecocardiograma transtorácico com Doppler

colorido para análise estrutural cardíaca, com avaliação, dentre várias medidas, do tamanho das câmaras cardíacas, das funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, da contratilidade segmentar e da presença de hipertrofia ventricular, realizados na clínica cardiológica Cardioclínica, ambos situados em Brasília (DF), Brasil; (2) cintilografia miocárdica com cortes tomográficos no repouso e no estresse sincronizado com o eletrocardiograma (gated SPECT) para avaliação de perfusão miocárdica (detecção de isquemia), realizado no Instituto de Cardiologia do Distrito Federal (ICDF).

Os pacientes que apresentaram função ventricular esquerda normal e cintilografia negativa para isquemia realizaram angiotomografia de artérias coronárias com 64 canais no Instituto de Cardiologia do Distrito Federal (ICDF) e foram separados em três grupos de acordo com o resultado tomográfico baseado no grau de estenose e composição da placa, a saber: (1) coronárias normais (grupo controle); (2) coronárias com placas calcificadas (estáveis); (3) coronárias com placas não calcificadas (instáveis). A calcificação é definida como uma lesão hiperatenuante com intensidade de sinal acima de 130 unidades Hounsfield (HU) e área > 3 pixels adjacentes (pelo menos 1 mm²), calculada a partir da soma ponderada das densidades acima de 130 HU (escore de Agatston).

Os pacientes com placas instáveis detectadas na angiotomografia foram submetidos à análise de outros marcadores de risco para DAC além do escore de Framingham para serem comparados com o perfil molecular quanto à predição da presença de placa não calcificada, assim descritos: (1) Escore de cálcio coronário (EC); (2) Espessura médio-intimal da artéria carótida (EMI); (3) Índice tornozelo braquial (ITB); (4) Proteína C Reativa ultrasensível (PCRus) e (5) História familiar para DAC precoce.

Afim de melhor estratificar os pacientes quanto às características de suas placas e portanto caracterizar melhor os fenótipos para posterior caracterização molecular, calculou-se o CT-LeSc, classificando os pacientes em T1 (CT-LeSc < 3,7), T2 (3,7 < CT-LeSc < 8,3) e T3 (CT-LeSc > 8,3). Afim de otimizar o cálculo dos grupos T, foi desenvolvida pela equipe, uma calculadora de CT-LeSc (Apêndice 1).

A classificação dos pacientes quanto a estes marcadores de doença aterosclerótica subclínica seguiram as recomendações consolidadas na literatura. Desta maneira, os seguintes valores reclassificaram o paciente de risco intermediário para alto risco. (1) EC: acima de 100 ou do percentil 75 para a idade ou sexo; (2) EMI: acima de 1,0 mm; (3) ITB: menor do que 0,9 e (4)

PCRus > 2 mg/l e (5) História familiar de DAC precoce: parentes de primeiro grau homens < 55 anos e mulheres < 65 anos.

Método esquematizado

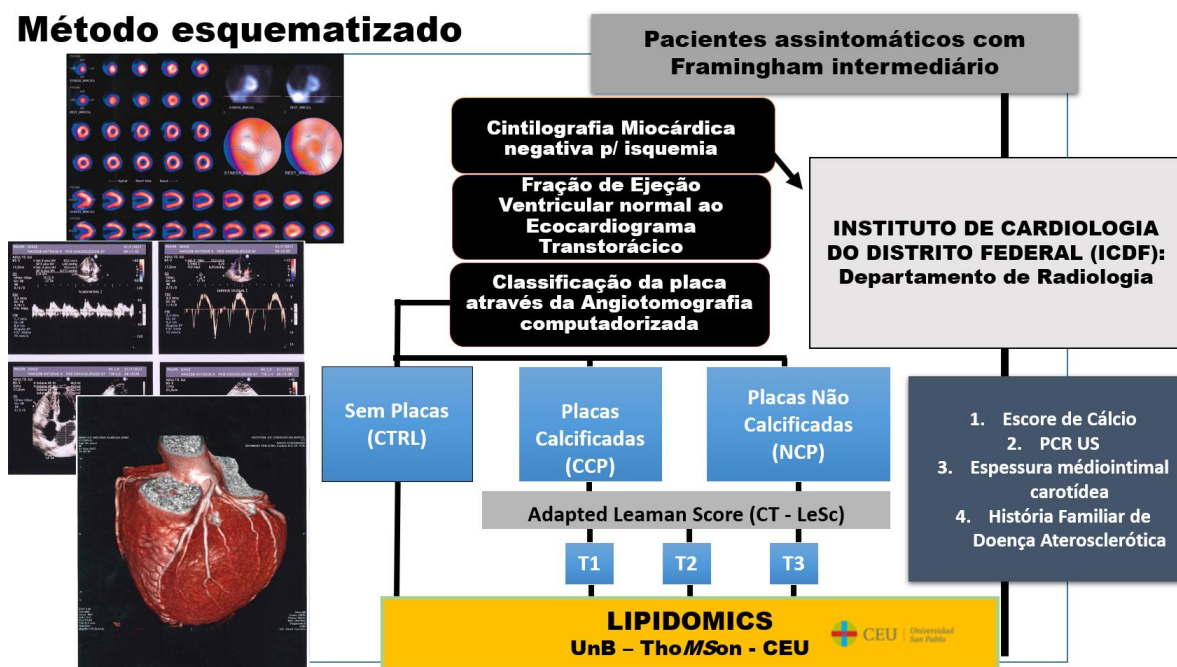


Figura 1. Metodologia esquematizada

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), podendo, a qualquer momento, se desvincular do projeto se assim o desejarem, sem qualquer ônus, com garantia de sigilo das informações e privacidade do sujeito. Todos receberam esclarecimentos quanto aos objetivos e riscos do estudo, cientes da inexistência de custos financeiros adicionais referentes aos procedimentos para os participantes (CAAE: 86928217.6.00005558).

Critérios de inclusão

Para inclusão neste estudo, os pacientes preencheram os seguintes critérios: ausência de sintomas de insuficiência coronariana, com risco intermediário para eventos cardiovasculares pelo critério de Framingham, sem isquemia miocárdica à cintilografia com função ventricular normal. Sendo divididos em 4 grupos com base no Leaman Score: o primeiro grupo composto por pacientes sem placas nas artérias coronárias (grupo controle, n = 7), o segundo grupo classificado no tercil T1 (n = 9), o terceiro grupo classificado no tercil T2 (n = 6) e o quarto grupo classificado no tercil T3 (n = 5).

Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: doença arterial coronariana já documentada; sintomas sugestivos de doença coronariana; ritmo de fibrilação atrial ou contraindicação à angiotomografia, incluindo antecedente de reação alérgica ao contraste, insuficiência renal significativa (taxa de filtração glomerular $< 30 \text{ ml/min/1.73m}^2$) e contraindicação ao uso de medicamentos betabloqueadores e adenosina (portadores de asma e bloqueio atrioventriculares de segundo ou terceiro grau).

Riscos

Os exames de imagens cardíacas (cintilografia miocárdica e angiotomografia de artérias coronárias) que foram realizados neste projeto são exames não invasivos seguros, com taxa de complicações muito baixas. Como há a necessidade de infusão de contraste endovenoso na angiotomografia, existe a chance de reações alérgicas. Reações adversas graves ao contraste iodado são raras [26-28]. No entanto, esta possibilidade foi reduzida ao se utilizar contraste iodado não iônico (o mais recomendado) e ao se realizar uma criteriosa triagem para identificar aquelas pessoas com antecedentes de reação alérgica prévia. O uso do contraste iodado não iônico com baixa osmolalidade está associado a uma menor incidência de reações, sendo estimada em torno de 0,2 a 0,6% na população [29-31].

Com relação à amostra de plasma para análise do perfil global dos lipídeos não se agregaram riscos adicionais aos pacientes, uma vez que já se submeteriam à coleta de sangue de rotina solicitados pelos seus médicos assistentes.

Benefícios

No contexto de uma doença tão grave e prevalente como é a doença aterosclerótica coronariana (maior índice de óbito mundial e, não diferente, também no Distrito Federal), este projeto revelou possíveis marcadores lipídicos que pudessem proporcionar informações diagnósticas e prognósticas aditivas aos fatores de risco tradicionais, com o intuito de servir como ferramenta complementar na estratificação do risco de eventos cardiovasculares,

possibilitando um tratamento mais personalizado, não invasivo e eficaz para atingir a meta terapêutica e reduzir desfechos clínicos adversos (isquemia miocárdica, infarto agudo do miocárdico, internação ou morte por doença cardiovascular).

a. Descrição da preparação de amostras e análise de metabólitos

Preparo de amostras e extração

O preparo de amostra foi a extração modificada de Bligh-Dyer (1959). O método de extração Bligh-Dyer modificado, emprega a mistura clorofórmio/metanol (2:1). A fase inferior foi coletada, diluída e analisada por MALDI/MSMS.

Análise por MALDI-TOF e bioinformática

Em um microtubo, 200ul do plasma foi ressuspensa em aproximadamente 150uL de água MilliQ. A esta suspensão foi adicionada 190uL de clorofórmio (grau HPLC) e 375uL de metanol (grau HPLC). Após 2 minutos no vórtex foram adicionados 187,5uL de clorofórmio (grau HPLC) e 150uL de água MilliQ. A mistura bifásica foi coletada separadamente. A fase inferior apolar contendo lipídios em solução de clorofórmio foi transferida para outro microtubo e concentrada para eliminar o solvente (procedimento adaptado de Bligh & Dyer, 1959). A fração rica em metabólitos polares foi coletada e armazenada. Ambos os extratos foram armazenados a -20°C. O extrato apolar foi ressuspensa em metanol/clorofórmio 2:1 no momento da análise. Para o preparo das placas de MALDI, 1- 2µL da solução do extrato foi depositado em cada poço da placa de MALDI, seguida de secagem em temperatura ambiente. O sobrenadante seco foi recoberto com 1-2uL de solução de matriz, composta de ácido 2,5-diidroxi-benzóico (DHB) diluído em acetonitrila 50% e de ácido trifluoroacético 2,5%.

Análise de lipídeos por MALDI/MSMS

A análise por MALDI-MS foi realizada em espectrômetro de massas Bruker Autoflex III MALDI-TOF/TOF equipado com um *laser* de feixe inteligente de 334nm. Os perfis globais lipidômicos foram adquiridos no modo linear TOF e no modo de íons positivos com uma extração retardada de 260ns a 20kV de tensão de aceleração. Cada espectro foi recolhido manualmente como uma média de 5000 disparos a laser (1000 disparos a laser em 5 posições diferentes). A energia do *laser* foi ajustada imediatamente acima do limiar para a produção

de íons. Foram gerados espectros em faixas de m/z 600-1200 para as impressões digitais dos lipídeos. Os espectros foram adquiridos em triplicata e a ferramenta AutoExecute do *software* de aquisição Flexcontrol foi utilizada (versão 2.4, Bruker-Daltonik GmbH) para processamento. Apenas picos de íons com uma relação S/N maior que 3 foram considerados.

Processamento dos dados: análise estatística multivariada e identificação de metabólitos

Foram utilizados o teste do qui-quadrado, teste de Fischer e teste t Student para comparações, quando apropriado. Para determinar fatores prognósticos independentes foram utilizados o teste de regressão de Spearman ou de Pearson na análise multivariada/pareada, não paramétrica. A análise estatística não paramétrica utilizou o *software* MetaboAnalyst [32]. A identificação dos metabólitos que foram levados para fragmentação o em MSMS foi realizada após as análises quimiométricas utilizando o VIPSCORE mais alto (2-6) de características importantes das concentrações relativas de cada metabólito referência, após estatística por PLS-DA (PLS-DA imp, $p < 0,05$). Estes íons então foram identificados pelos *software* CEU Mass Mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pacientes classificados como de risco intermediário para doença arterial coronariana pelo escore de Framingham, assintomáticos, com cintilografia de perfusão miocárdica negativa para isquemia e fração ventricular esquerda normal, foram recrutados em três grupos conforme resultado da angiotomografia de artérias coronárias: (1) sem placas (CTRL); (2) placas calcificadas (CCP); (3) placas não calcificadas (NCP), conforme a Figura 2. Em seguida, estes pacientes foram reclassificados com base no Lemman Score Adaptado, sendo divididos em: grupo composto por pacientes sem placas nas artérias coronárias (grupo controle, $n = 7$), o grupo classificado no tercil T1 ($n = 9$), o terceiro grupo classificado no tercil T2 ($n = 6$) e o quarto grupo classificado no tercil T3 ($n = 5$), formando um n total de 27 pacientes. Estes pacientes tiveram seus parâmetros clínico-laboratoriais avaliados, conforme Figura 3.

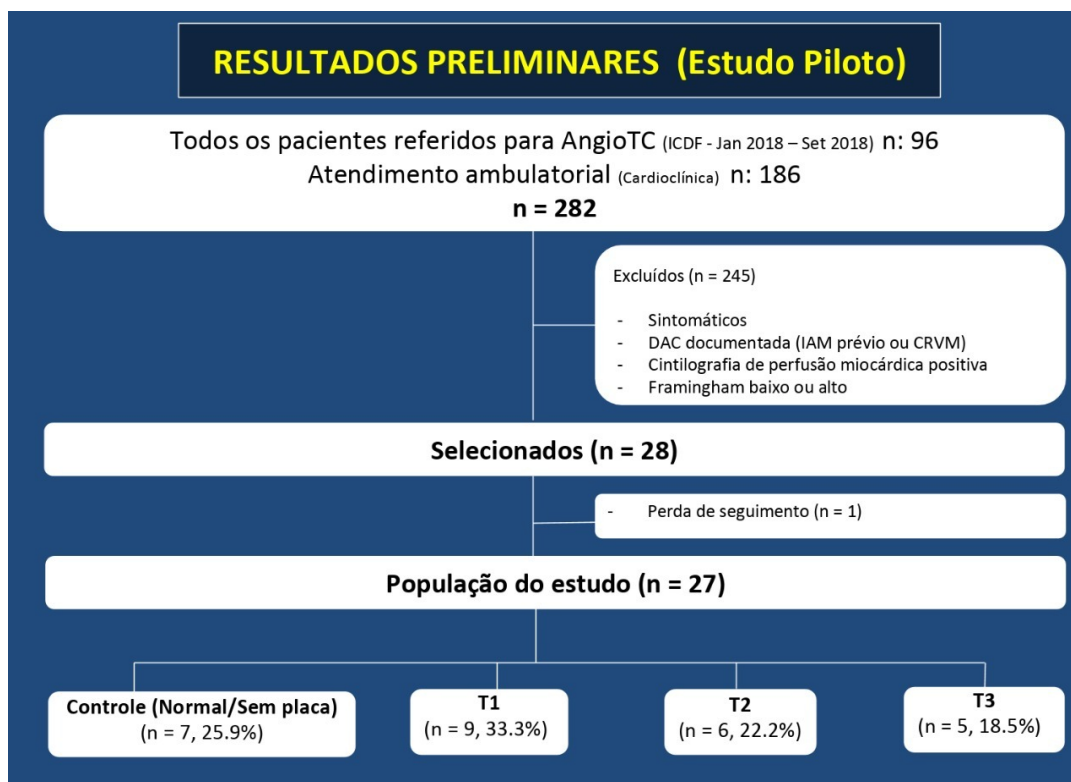


Figura 2 – População do estudo.

	Características de Base			
	T1	T2	T3	CONTROLE
Idade (anos)	60 ± 10	64 ± 15	64 ± 6	52 ± 6
Sexo (homens)	52.4%	52.2%	52.9%	50%
IMC	24,04 ± 1,8	29,4 ± 2	25,2 ± 2,9	30,2 ± 5,1
HF+DAC	47.4%	42.9%	56.3%	25%
Tabagismo (+)	33.3%	25%	0%	33.3%
Medicamentos				
IECA / BRA	40,0%	60,0%	16,6%	66,6%
Betabloqueador	40,0%	40,0%	16,6%	16,6%
Estatina	60,0%	60,0%	66,6%	50,0%
Antiplaquetário	20,0%	60,0%	50,0%	16,6%
FC de Repouso	66	71	63	72
FEVE	65 ± 1,8%	70,5 ± 6,6%	64,5 ± 4%	69 ± 3,7%
PAS (mmHg)	138 ± 15	134 ± 9	125 ± 6	143 ± 14
PAD (mmHg)	88 ± 11	90 ± 7	86 ± 3	97 ± 5
CT	231 ± 55	242 ± 42	195 ± 67	235 ± 75
LDL	138 ± 43	169 ± 47	115 ± 50	134 ± 50
HDL	40 ± 7	48 ± 9	47,5 ± 7	39 ± 9
TRIGL	274 ± 88	120 ± 41	169 ± 62	206 ± 67
Framingham	13 ± 0,01	12 ± 0,02	10 ± 0,03	10 ± 0,02

Figura 3 – Dados Clínicos-laboratoriais dos pacientes

O perfil lipidômico dos pacientes de cada grupo foi analisado por MALDI-MS. A análise estatística não paramétrica foi utilizada para revelar os perfis lipidômicos discriminantes por meio do *software* MetaboAnalyst, sendo realizadas análises de PCA (*Principal Components Analysis*) e PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*).

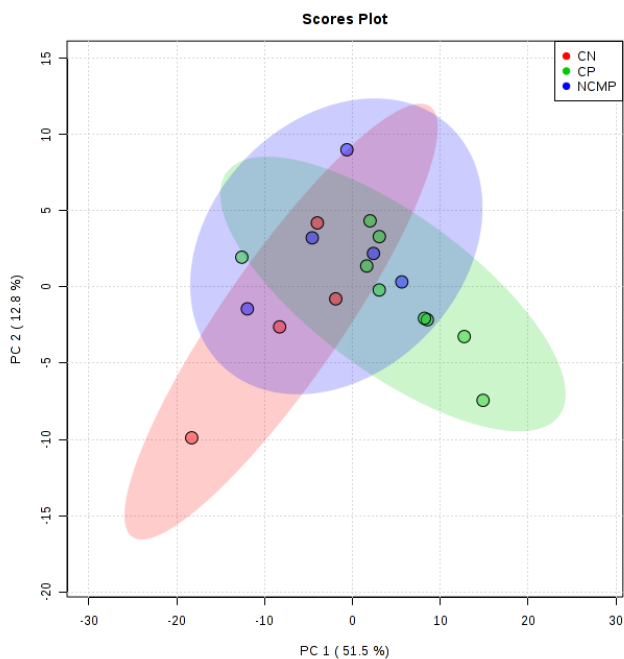


Figura 4: Análise PCA utilizando como discriminantes a classificação atual: placas calcificadas (CP) e não calcificadas / mistas (NCMP). O gráfico demonstra que não há clara diferença entre o perfil lipidômico destes grupos, o que evidencia uma possível dissociação clínico-laboratorial, onde a classificação não demonstra o real perfil de aterosclerose subclínica do paciente.

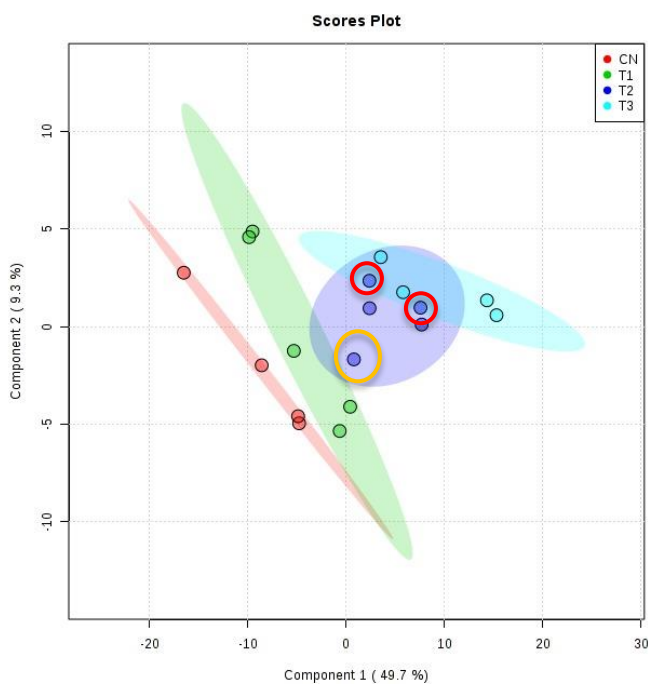


Figura 5: Análise PLS-DA demonstrando estratificação dos grupos CN, T1, T2 e T3. A distância entre o grupo CN e T3 – extremos opostos – demonstra a grande diferença do perfil lipidômico entre ambos. O gráfico também demonstra maior proximidade entre grupos clinicamente próximos: CN/T1 e T2/T3. **Círculos vermelhos:** pacientes T2 com perfil próximo ao grupo T3, como diferença dos demais indivíduos de T2, estes pacientes possuíam placas ateroscleróticas carotídeas – sugerindo a importância desta condição como um fator de risco cardiovascular. **Círculo laranja:** paciente T2 com perfil similar ao grupo T1, como diferença dos demais, tal indivíduo possui menores níveis de proteína C reativa, o que pode explicar essa proximidade.

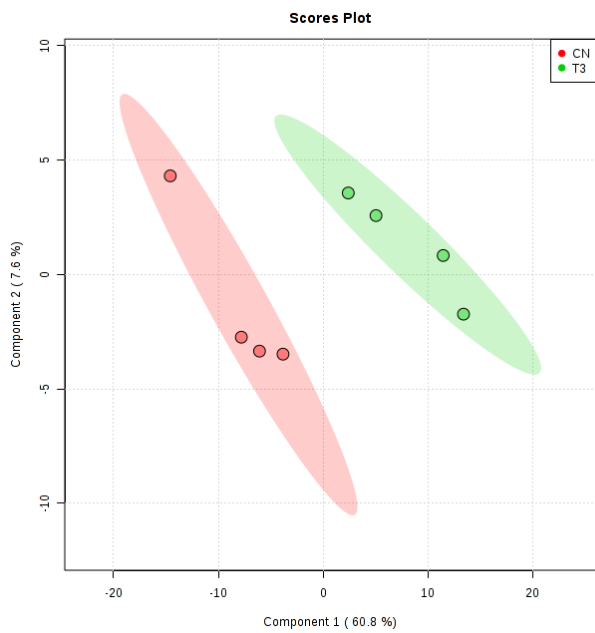


Figura 6: Análise PLS-DA demonstrando estratificação dos grupos CN e T3, demonstrando a diferença entre o perfil lipídômico entre os dois grupos analisados.

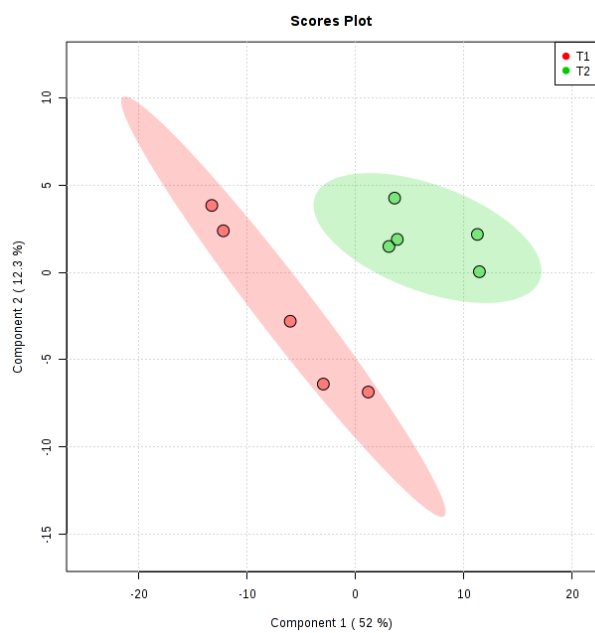


Figura 7: Análise PLS-DA demonstrando estratificação dos grupos T1 e T2, demonstrando a diferença entre o perfil lipídômico dos dois grupos, quando analisados separadamente.

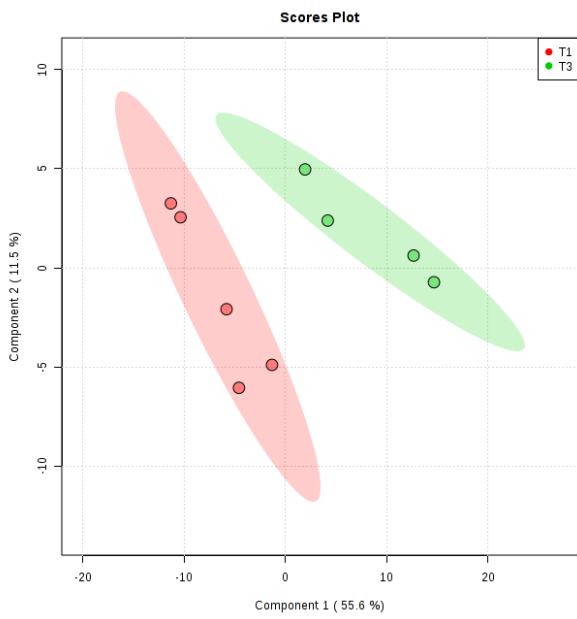


Figura 8: Análise PLS-DA demonstrando estratificação dos grupos T1 e T3, demonstrando a diferença entre o perfil lipidômico dos dois grupos, quando analisados separadamente.

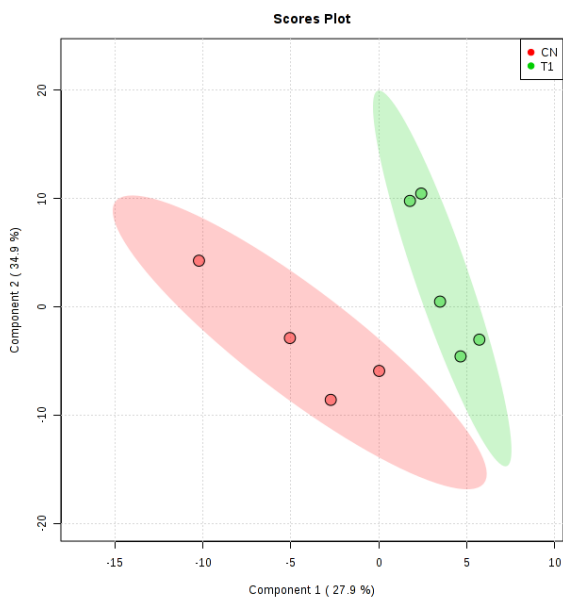


Figura 9: Análise PLS-DA demonstrando estratificação dos grupos CN e T3, demonstrando a diferença entre o perfil lipidômico dos dois grupos, quando analisados separadamente.

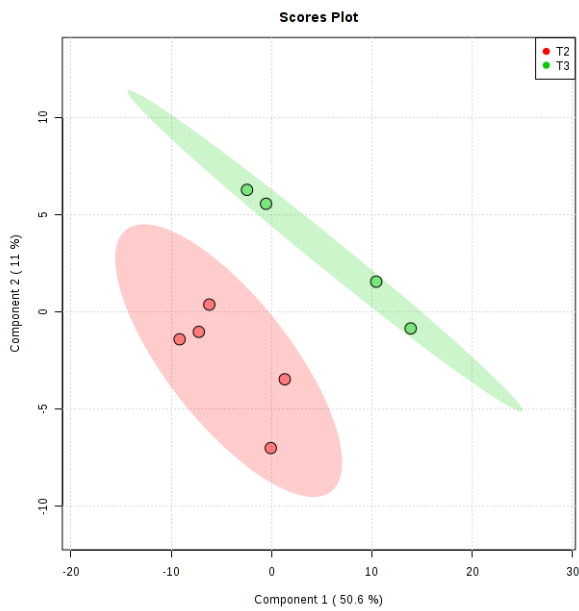


Figura 10: Análise PLS-DA demonstrando estratificação dos grupos T2 e T3, demonstrando a diferença entre o perfil lipídômico dos dois grupos, quando analisados separadamente.

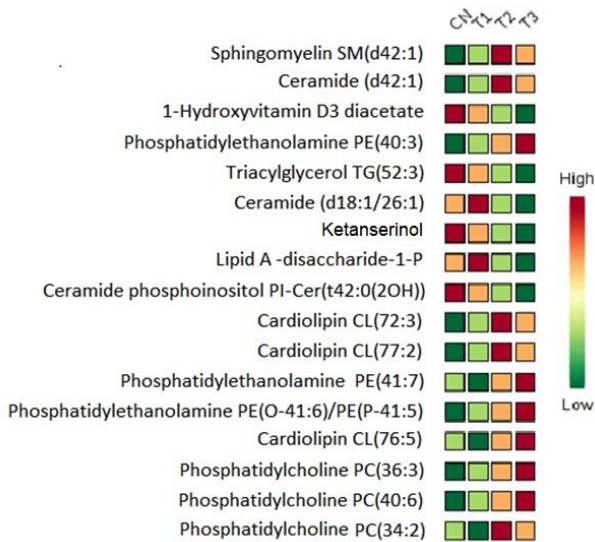


Figura 11: Análise PLS Important Features do perfil lipídico dos grupos CN, T1, T2 e T3. Demonstrou-se que a fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e cardiolipinas foram mais abundantes em indivíduos nos grupos mais altos do Escore de Leaman (T2/T3), sendo, possivelmente, marcadores de mau prognóstico quanto ao fenótipo da aterosclerose. De forma contrária, os metabólitos ketanserinol, 1-hidroxivitamina D3 (metabólito vitamina D3) e triacilglicerol foram encontrados com mais abundantes em indivíduos do grupo controle/T1, demonstrando tangíveis marcadores de bom prognóstico.

5. CONCLUSÕES

A técnica de espectrometria de massas mostrou-se aplicável no contexto clínico da aterosclerose, visto os achados de determinados lipídeos específicos para pacientes com o mesmo perfil de risco. O perfil lipídico global de indivíduos assintomáticos no risco intermediário de Framingham de doença arterial coronariana pode ser útil como um marcador molecular complementar apresentando valioso poder discriminatório entre os diferentes fenótipos tomográficos de Leaman. Diferentemente da classificação baseada apenas na presença de calcificação da placa, o perfil lipídômico foi relevantemente discriminatório dentro da pontuação de Leaman, dando ao modelo aqui apresentado maior acurácia e precisão.

Tendo como base as Figuras 4 e 5, evidencia-se a presença de metabólitos que se expressam em intensidades diferentes nos grupos estudados. A fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e cardiolipinas foram mais abundantes em indivíduos nos grupos mais altos do Escore de Leaman (T2/T3), sendo, possivelmente, marcadores de mau prognóstico quanto ao fenótipo da aterosclerose. Do outro lado, os metabólitos ketanserinol, 1-hidroxivitamina D3 (metabólito vitamina D3) e triacilglicerol foram demonstrados como possíveis marcadores de bom prognóstico.

A implementação desta análise de alto desempenho pela espectrometria de massas possibilita um importante impacto futuro na previsão de eventos clínicos com foco em pacientes cujos marcadores de risco tradicionais não conseguem estratificar corretamente os pacientes. A aplicação de novos biomarcadores com capacidade clínica pode transformar os cuidados cardiovasculares, melhorando a nova abordagem diagnóstica para a aterosclerose subclínica e permitindo uma medicina mais personalizada.

6. REFERÊNCIAS

- [1] ESC Guidelines on the management of stable coronary artery disease. *European Heart Journal* (2013) 34, 2949–3003.
- [2] Sandeep Krishnan, et al. Molecular Imaging of Vulnerable Coronary Plaque: A Pathophysiologic Perspective. *The J Nucl Med*. 2017;58:359-364.
- [3] Andris H. Ellims, et al. Plasma lipidomic analysis predicts non-calcified coronary artery plaque in asymptomatic patients at intermediate risk of coronary artery disease. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* (2014) 15 (8): 908-916.
- [4] Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-952.
- [5] Abd El-Aziz et al: Increased risk of PCAD disease in Egyptians. *Journal of Clinical Lipidology* (2014) vol 8, N 4, 381-189.
- [6] Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, 9th ed. 2012.
- [7] Ford ES, Ajani UA, Croft JB, et al: Explaining the decrease in U.S deaths from coronary disease,1980-2000. *N Engl J Med* 356:2388,2007.
- [8] Depre C, Wijns W, Robert AM, Renkin JP, Havaux X. Pathology of unstable plaque: correlation with the clinical severity of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:694–702.

- [9] Peter J. Meikle, et al. Plasma Lipidomic Analysis of Stable and Unstable Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2723-2732.
- [10] Kramer MC, Rittersma SZ, de Winter RJ, et al: Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *J Am Coll Cardiol* 55:122,2010.
- [11] Schoen FJ;The heart. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N (eds): *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*.8th ed. Philadelphia, WB Saunders, 2010, pp 529-587.
- [12] Achenbach S: Can CT detect the vulnerable coronary plaque? *Int J Cardiovasc Imaging* 24:311,2008.
- [13] Fox JJ, Strauss HW: One step closer to imaging vulnerable plaque in the coronary arteries. *J Nucl Med* 50:497,2009.
- [14] Libby P, Ridker PM, Hansson GK: Inflammation in atherosclerosis: From pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 54:2129,2009.
- [15] Cesar LA, Ferreira JF, Armaganijan D, Gowdak LH, Mansur AP, Bodanese LC, et al. Diretriz de Doença Coronária Estável. *Arq Bras Cardiol* 2014; 103(2Supl.2): 1-59.]
- [16] Dawber, TR. The Framingham study. The epidemiologic of atherosclerotic disease. Cambridge: Harvard University Press; 1980.
- [17] Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 347:1557,2002.
- [18] Xavier H. T., Izar M. C., Faria Neto J. R., Assad M. H., Rocha V. Z., Sposito A. C., Fonseca F. A., dos Santos J. E., Santos R. D., Bertolami M. C., Faludi A. A., Martinez T. L. R., Diamant J., Guimarães A., Forti N. A., Moriguchi E., Chagas A. C. P., Coelho O. R., Ramires J. A. F.; Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 2013.
- [19] Yeboah, J, McClelland RL, Polonsky TS, et al. Comparison of novel risk markers for improvement in cardiovascular risk assessment in intermediate-risk individuals. *JAMA* 2012; 308: 788-795.
- [20] Polonsky TS, McClelland RL, Jorgensen NW, et al. Coronary artery calcium score and risk classification for coronary heart disease prediction. *JAMA.* 2010; 303(16):1610-1616.
- [21] Zahir H. Alshehry, et al. Plasma Lipidomic Profiles Improve on Traditional Risk Factors for the Prediction of Cardiovascular Events in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation.* 2016;134:1637-1650.
- [22] Hausleiter J, Meyer T, Hadamitzky M, Kastrati A, Martinoff S, Schomig A. Prevalence of noncalcified coronary plaques by 64-slice computed tomography in patients with an intermediate risk for significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:312–8.

- [23] Geluk CA, Post WJ, Hillege HL, Tio RA, Tijssen JG, van Dijk RB et al. C-reactive protein and angiographic characteristics of stable and unstable coronary artery disease: data from the prospective PREVEND cohort. *Atherosclerosis* 2008;196:372-82.
- [24] Achenbach S, Raggi P. Imaging of coronary atherosclerosis by computed tomography. *Eur Heart J* 2010;31:1442 – 8.
- [25] Min JK, Shaw LJ, Devereux RB, Okin PM, Weinsaft JW, Russo DJ et al. Prognostic value of multidetector coronary computed tomographic angiography for prediction of all-cause mortality. *J Am Coll Cardiol*, 2007;50:1161–70.
- [26] Sara L, Szarf G, Tachibana A, Shiozaki AA, Villa AV, Oliveira AC et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. II Diretriz de Ressonância Magnética e Tomografia Computadorizada Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia e do Colégio Brasileiro de Radiologia. *Arq Bras Cardiol* 2014; 103(6Supl.3): 1-86.
- [27] Mark DB, Berman DS, Budoff MJ, et al. ACCF / ACR / AHA / NASCI / SAIP / SCAI / SCCT 2010 Expert Consensus Document on Coronary Computed Tomographic Angiography: A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. *J Am Coll Cardiol* 2010.
- [28] Bettmann MA, Heeren T, Greenfield A, Goudey C. Adverse events with radiographic contrast agents: results of the SCVIR Contrast Agent Registry. *Radiology*. 1997;203(3):611-20. 614.
- [29] Brockow K. Contrast media hypersensitivity--scope of the problem. *Toxicology*. 2005;209(2):189- 192.
- [30] Cochran ST, Bomyea K, Sayre JW. Trends in adverse events after IV administration of contrast media. *AJR Am J Roentgenol*. 2001;176(6):1385-8. 636.
- [31] Wang CL, Cohan RH, Ellis JH, Caoili EM, Wang G, Francis IR. Frequency, outcome, and appropriateness of treatment of nonionic iodinated contrast media reactions. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;191(2):409-15.
- [32] Xia, J. and Wishart, D.S. (2016) Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis *Current Protocols in Bioinformatics*, 55:14.10.1-14.10.91
- [33] Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, et al., HMDB 3.0 — The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013. Jan 1;41(D1):D801-7.
- [34] DE ARAÚJO GONÇALVES, P. et al. Coronary computed tomography angiography-adapted Leaman score as a tool to noninvasively quantify total coronary atherosclerotic burden. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, v. 29, n. 7, p. 1575-1584, 2013.

APÊNDICE

Apêndice A. Calculadora do Escore de Leaman Adaptado (CT-LeSc).

Calculadora CT-LeSc			
Segmento	Tipo de Lesão	Quantidade	Leaman Score
TCE	O / NCPC	0	0
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	
DA Proximal	O / NCPC	0	0
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	
DA Média	O / NCPC	0	0
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	
DA Distal	O / NCPC	0	0
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	
Dg1	O / NCPC	0	0
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	
Dg2	O / NCPC	0	0
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	
CRX Proximal	O / NCPC	0	0
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	
	O / NCPC	0	0

CRX Média / Distal	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	
MgE	O / NCPC	0	
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	0
CD Proximal	O / NCPC	0	
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	0
CD Média	O / NCPC	0	
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	0
CD Distal	O / NCPC	0	
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	0
DP (origem CD)	O / NCPC	0	
	O / C	0	
	NO / NCPC	0	
	NO / C	0	0
		Resultado:	0