

Flávio Roberto Cavalleiro de Macêdo Ribeiro

**Alterações qualitativas da lipoproteína de alta densidade (HDL) em
pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP)**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Kalil Filho

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ribeiro, Flávio Roberto Cavalleiro de Macêdo
Alterações qualitativas da lipoproteína de alta
densidade (HDL) em pacientes com doença arterial
obstrutiva periférica (DAOP) / Flávio Roberto
Cavalleiro de Macêdo Ribeiro. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientador: Roberto Kalil Filho.

Descritores: 1.Doença arterial periférica 2.HDL-
colesterol 3.Nanopartículas 4.Transferência de
lípidos 5.Metabolismo dos lipídeos 6.Colesterol

USP/FM/DBD-363/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

À minha mãe, Amélia Denise Cavalleiro de Macêdo Ribeiro (*in memoriam*), que continua sendo minha maior força e inspiração na vida, pelo exemplo que sempre conduziu a medicina.

À meu pai Fernando Ribeiro

À minha esposa e companheira Carolina Ribeiro e ao meu filho Mateus Ribeiro

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Titular Roberto Kalil Filho, ilustre Médico e notável exemplo de dedicação acadêmica e profissional, pela disponibilidade em orientar-me, pela confiança e orientação prestada e pelo suporte para a realização desta Tese.

Ao meu co-orientador, Professosr Titular Raul Cavalcante Maranhão, pelas várias oportunidades e apoio na minha formação científica com seu exemplo profissional, com seus ensinamentos, pela seriedade com que conduz sua atividade científica, pela maravilhosa amizade e por todos esses anos de convívio.

À minha esposa Carolina Heitmann Mares Azevedo, pelo apoio incondicional no desenvolvimento desta Tese e pela companhia em todas as fases desse trabalho. Minha eterna gratidão.

Aos amigos do laboratório de Metabolismo de Lípidos, em especial as amigas Thauany Tavoni, Alekssandra Morikawa, Fátima Freitas e Débora Deus meus eternos agradecimentos pela amizade e pelo apoio constante.

À minha sogra Elza Azevedo, pela atenção e carinho prestados ao meu filho nos meus momentos de ausência durante a elaboração desta Tese.

Aos meus amigos Elma Azevedo (cunhada) e Breno Valentim, que mesmo distantes, sempre me deram força, conhecimento e inspiração para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os amigos e colegas que de uma forma direta ou indireta, contribuíram, ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, em especial aos Drs. Glaucio Melo e Maciel Reis, pela força e ajuda na seleção dos pacientes.

À toda equipe do Laboratório de Metabolismo e Lípidos do InCor-HC-FMUSP.

Enfim, com respeito e admiração, meu agradecimento a todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo, em particular pelo sacrifício pessoal.

Minha profunda Gratidão

Epígrafe

“ É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias mesmo expondo-se a derrotas, que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta, que não conhecem vitórias, nem derrotas”

Rui Barbosa

Normatização Adotada

Esta pesquisa está de acordo com as seguintes normas, em vigor, no momento desta apresentação.

Referencias: adaptado de *International Committes of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3ªed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2012.

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

Sumário

Lista de abreviaturas**Lista de figuras****Lista de tabelas****Resumo****Abstract**

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia.....	2
1.2	Quadro clínico da DAOP.....	4
1.3	Classificação da DAOP.....	5
1.4	Fatores de risco da DAOP.....	7
1.5	Diagnóstico da DAOP.....	11
1.6	Tratamento da DAOP.....	15
1.7	DAOP e lípides.....	17
1.8	HDL.....	19
1.9	HDL e aterogênese.....	21
1.10	Transferência de lípides para HDL.....	24
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS.....	30
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	32
4.1	Crítérios de inclusão.....	34
4.2	Crítérios de exclusão.....	35
4.3	Materiais.....	35
4.4	Métodos.....	36
4.4.1	Determinações bioquímicas séricas.....	36
4.4.2	Preparo da nanoemulsão lipídica artificial.....	37
4.4.3	Ensaio de transferência de lípides para HDL.....	38
4.4.4	Determinação da concentração da CETP e LCAT.....	38

4.4.5	Análise estatística.....	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	Características físicas e clínicas dos participantes.....	41
5.2	Determinações bioquímicas.....	43
5.3	Transferência de lipídes para HDL.....	45
5.4	Correlações bivariadas e análise de regreção linear múltipla ..	46
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO.....	60
8	REFERÊNCIAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	“ATP-binding cassette transporter A1”
ACAT	Acetil Coenzima A: Colesterol Acil Transferase
Apo	Apolipoproteína
ASD	Arteriografia por subtração digital
AVC	Acidente vascular cerebral
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
DAC	Doença arterial coronariana
DAOP	Doença arterial obstrutiva periférica
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes mellitus
HbA_{1c}	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Isquemia crítica dos membros
ITB	Índice tornozelo-braquial
IHB	Índice hálux-braquial
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LCAT	Lecitina colesterol acil transferase
LDE	Emulsão rica em colesterol
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LE	Lipase endotelial

LH	Lipase hepática
LLP	Lipase lipoprotéica
NO	Óxido nítrico
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípídeo
PON1	Paraoxonase
SR-B1	Receptor <i>scavenger</i> classe B tipo I
TRC	Transporte reverso de colesterol
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características físicas e clínicas dos participantes.....	42
Tabela 2	Concentrações plasmáticas de lipídios, glicose, LCAT e CETP dos grupos estudados.....	44
Tabela 3	Taxa de transferência de colesterol livre, colesterol esterificado, triglicérides e fosfolípides da nanoemulsão lipídica artificial para HDL nos grupos estudados.....	46
Tabela 4	Correlações entre as transferências lipídicas para HDL, concentrações séricas de CETP, LCAT e lipídios.....	48
Tabela 5	Análise de regressão linear múltipla entre transferências lipídicas para HDL, concentrações séricas de CETP e presença de DM	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação da composição da lipoproteína de alta densidade (HDL). *FL*, fosfolipídes; *apo*, apolipoproteína; *CL*, colesterol livre; *CE*, colesterol esterificado; *TG*, triglicérides..... 20
- Figura 2** Metabolismo da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) *HDL* lipoproteína de alta densidade; *LH* lipase hepática; *LCAT* lecitina colesterol aciltransferase; *CETP* proteína de transferência de colesterol esterificado; *CE* colesterol esterificado; *TG* triglicérides..... 21

Resumo

Ribeiro FRCM. *Alterações qualitativas da lipoproteína de alta densidade (HDL) em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (DAOP)* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: A doença arterial obstrutiva periférica (DAOP), cuja prevalência no Brasil é de 10,5%, é a manifestação clínica da aterosclerose associada com maior risco de doença arterial coronariana (DAC) e cerebral. HDL-C diminuído é proeminente na DAOP, e o aumento de LDL-C e triglicérides é menos frequente. Nesse contexto, examinar aspectos funcionais da HDL, que tem ação protetora contra a aterosclerose, e as causas de diminuição da HDL na DAOP são muito importantes para a prevenção e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para a doença. **Objetivo:** Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi examinar os aspectos funcionais da HDL, que tem ação protetora contra a aterosclerose, e as causas da diminuição da HDL na DAOP, que são muito importantes para a prevenção e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para a doença. **Métodos:** Os participantes do estudo foram selecionados no ambulatório de cirurgia vascular da Fundação Hospital de Clínicas Gaspar Vianna (FHCGV), Belém-Pa. Foram selecionados pacientes com DAOP (n = 38, 69 ± 10 anos, 24 homens) e voluntários sem DAOP (n = 20, 68 ± 7 anos, 11 homens). Os pacientes com a doença foram divididos em diabéticos (n = 19, 69 ± 9 anos, 13 homens) e não diabéticos (n = 19, 68 ± 11 anos, 11 homens). Transferências de lípidos para HDL foram quantificadas por ensaio *in vitro* usando uma nanoemulsão marcada radioativamente como doadora de lípidos. Os demais ensaios, como a concentração da proteína de transferência de éster de colesterol e lecitina colesterol aciltransferase foram determinadas por métodos enzimáticos comerciais. **Resultados:** Como esperado, os pacientes com a DAOP e diabetes associada apresentaram glicemia mais alta. Ambos os grupos doentes apresentaram níveis séricos de HDL-C mais baixos que os controles, mas o HDL-C e níveis de apo A-I foram menores ainda no grupo que tinha diabetes associada. Com relação às taxas de transferência das quatro formas de lípidos da nanoemulsão doadora para a fração HDL, a transferência de todos os lípidos foi menor nos doentes do que nos controles (p <0,001), mas quando havia a presença do diabetes foi ainda menor (p <0,05). **Conclusões:** Os resultados confirmam que a HDL mais baixa é o principal fator de risco de DAOP, entre as alterações das lipoproteínas plasmáticas, enquanto o LDL-C e triglicérides não apareceram como marcadores de doença, diferentemente do que acontece na DAC. A presença do diabetes na DAOP foi um fator determinante para a menor transferência de lípidos encontrada nesses pacientes, assim como a menor concentração de CETP, proteína que facilita a transferência. A menor transferência de colesterol tanto o livre quanto o esterificado, sugere que a função da HDL na esterificação do colesterol possa estar diminuída na DAOP pelo menor aporte do substrato, apesar da enzima que catalisa a esterificação, a LCAT, estar em níveis normais. Os resultados sugerem que a participação de distúrbios metabólicos envolvendo a HDL pode ser fundamental no desenvolvimento da DAOP, especialmente em pacientes diabéticos.

Descritores: Doença arterial periférica; HDL-colesterol; Nanopartículas; Transferência de lípidos; Metabolismo dos lipídeos; Colesterol.

Abstract

Ribeiro FRCM. *Qualitative changes of high density lipoprotein (HDL) in patients with peripheral obstructive arterial disease (PAD)* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Introduction: Peripheral arterial disease (PAD), whose prevalence in Brazil is 10.5%, is the clinical manifestation of atherosclerosis associated with increased risk of coronary artery disease (CAD) and cerebral disease. Decreased HDL-C is prominent in PAD, and increased LDL-C and triglycerides are less frequent. In this context, examining functional aspects of HDL, which has a protective action against atherosclerosis, and the causes of decreased HDL in PAD are very important for the prevention and development of new therapeutic targets for the disease. **Objective:** In this context, the aim of this study was to examine the functional aspects of HDL, which has a protective action against atherosclerosis, and the causes of decreased HDL in PAD, which are very important for the prevention and development of new therapeutic targets for disease. **Methods:** The study participants were selected at the vascular surgery outpatient clinic of the Gaspar Vianna Clinical Hospital Foundation (FHCGV), Belém-Pa. Patients with PAD ($n = 38$, 69 ± 10 years, 24 men) and volunteers without PAD ($n = 20$, 68 ± 7 years, 11 men) were selected. Patients with the disease were divided into diabetic ($n = 19$, 69 ± 9 years, 13 men) and non-diabetic ($n = 19$, 68 ± 11 years, 11 men). Lipid transfers to HDL were quantified by in vitro assay using a radiolabelled nanoemulsion as a lipid donor. Other assays, such as the concentration of cholesterol ester transfer protein and lecithin cholesterol acyltransferase were determined by commercial enzymatic methods. **Results:** As expected, patients with peripheral obstructive disease and associated diabetes had higher glycemic levels. Both patient groups had lower serum HDL-C levels than controls, but HDL-C was lower in the group with associated diabetes, as well as apo A-I concentration. Regarding the transfer rates of the four forms of donor nanoemulsion lipids to the HDL fraction, the transfer of all lipids was lower in patients than in controls ($p < 0.001$), but when diabetes was present it was even lower ($p < 0.05$). **Conclusions:** The results confirm that lower HDL is the main risk factor for PAD among plasma lipoprotein alterations, while LDL-C and triglycerides did not appear as disease markers, unlike in CAD. The presence of diabetes in PAD was a determining factor for the lower lipid transfer found in these patients, as well as the lower concentration of CETP, a protein that facilitates the transfer. The lower transfer of both free and esterified cholesterol indicates that HDL's role in cholesterol esterification is decreased in PAD, although the esterifying catalytic enzyme, LCAT, is at normal levels. Results point out to a chief role of HDL metabolic disturbances in the appearance of PAD, specially in diabetes, wherein, incidentally, the disease has a more aggressive pattern.

Descriptors: Peripheral arterial Disease; Cholesterol, HDL; Nanoparticles; Lipid transfers; Lipid metabolism; Cholesterol.

1 Introdução

1.1 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde classifica as doenças cardiovasculares (DCV) em 69 grupos, incluindo a cardiopatia isquêmica, a isquemia cerebral, a doença arterial obstrutiva periférica (DAOP), o infarto agudo do miocárdio (IAM), o acidente vascular cerebral (AVC) e várias outras relacionadas. Atualmente, a aterosclerose é apontada como mecanismo comum para o desenvolvimento de todos esses distúrbios anteriormente citados (Faludi, 2017; Who,2017)

As DCV continuam sendo a maior causa de mortalidade em todo mundo. Cerca de 17,7 milhões de pessoas morreram por DCV em 2015, representando 31% de todas as mortes globais. Destas mortes, cerca de 7,4 milhões foram devidos a DAC e 6,7 milhões foram decorrentes de AVC (Who, 2017). Dados do Ministério da Saúde mostraram que as DCV são a principal causa de morte no Brasil, tendo sido responsáveis, em 2006, por 29,4% dos óbitos no país, enquanto as neoplasias foram 15,1% (Makdisse *et al.*, 2008).

Estima-se que a DAOP acomete mais de 200 milhões de pessoas no mundo (Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes *et al.*, 2017). Os dados da literatura podem estar subestimados, já que a maioria dos pacientes é assintomática ou não apresenta o sintoma clássico da doença, a claudicação intermitente (Makdisse *et al.*, 2008). Oito a dez milhões de americanos sofrem de DAOP com uma prevalência global de 12% na população adulta (Dua; Lee, 2016). No

Brasil, os dados relacionados à prevalência de DAOP são escassos e restritos a populações específicas, praticamente todos realizados na região sudeste do País. A prevalência de DAOP no Brasil é 10,5% (Makdisse *et al.* , 2008).

Na sociedade moderna, em parte ao aumento da expectativa de vida, a DAOP está cada vez mais prevalente. Nos países de baixa e média renda *per capita*, sua prevalência vem gradativamente aumentando, sendo que entre os anos de 2000 e 2010 foi registrado um aumento de 28,7%. Este aumento foi menor nos países de alta renda: 13,1% (Fowkes *et al.*, 2017). O crescente interesse no diagnóstico precoce da DAOP vem ocorrendo pela associação à doença aterosclerótica obstrutiva em outros leitos arteriais, como coronariano, cerebral e carotídeo. A história natural do DAOP caracteriza-se pelo aumento do risco de DAC e eventos cerebrovasculares. Os pacientes com DAOP têm uma incidência de DAC de 30-50% e uma taxa de estenose carotídea 15-25%. A taxa anual de eventos cardiovasculares principais, incluindo infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral ou morte, é de aproximadamente 5% a 7% nos pacientes com DAOP. Apenas 20-30% dos pacientes com DAOP morrem de problemas não cardiovasculares. (Dua; Lee, 2016; Garofolo, L.; Ferreira,SRG.; Miranda Junior, F., 2014; Makdisse *et al.*, 2008).

1.2 Quadro clínico da DAOP

A DAOP representa uma manifestação local de uma doença sistêmica letal, a aterosclerose. O acometimento aterosclerótico das artérias periféricas

provoca estreitamento ou obstrução dos vasos, prejudicando o fluxo normal que conduzem o sangue para os membros. A deficiência na circulação sanguínea arterial leva à isquemia dos tecidos, podendo ocasionar dor, úlceras, necrose e até amputações, dependendo do grau de obstrução arterial e do desenvolvimento de circulação colateral (Dua; Lee, 2016; Baptista- Silva, 2003).

Clinicamente, os portadores da DAOP podem ser assintomáticos ou sintomáticos. Os pacientes assintomáticos são a maioria, sendo a proporção para DAOP sintomática de 3:1 a 4:1 (Collins *et al.*, 2006) e sua prevalência entre 3-10% da população. Em pacientes com mais de 70 anos a prevalência aumenta para 15-20% (Dua; Lee, 2016).

A maioria dos pacientes com DAOP tem desempenho limitado no exercício e na capacidade de caminhar. Como consequência, a DAOP está associada a uma menor atividade física e qualidade de vida. Em pacientes com DAOP, o sintoma clássico é a claudicação intermitente. Tipicamente, o paciente descreve dor no membro inferior relacionada ao exercício e com alívio durante o repouso. O desconforto se diferencia de processos osteomusculares por não ser afetado pela posição do corpo, mas pela sua reprodução sempre diante do mesmo grau de atividade física. Entretanto, mais de 50% dos pacientes com DAOP não têm sintomas de claudicação intermitente. Em muitos pacientes outras comorbidades impedem uma atividade física que identifique este sintoma. Portanto, os pacientes suspeitos de apresentarem DAOP devem ser questionados sobre as limitações que eles possuem durante o exercício dos membros inferiores que limitam sua habilidade para caminhar (Dua; Lee, 2016; Norgren; Hiatt; Dormandy, 2007).

A isquemia crítica dos membros (IC) é uma manifestação da DAOP caracterizada por dor isquêmica em repouso, lesões de pele isquêmicas, úlceras ou gangrena. O termo IC só deve ser utilizado naqueles pacientes com doença isquêmica crônica, definida como a presença de sintomas por mais de 2 semanas, devendo ser distinguido da isquemia aguda dos membros. Os pacientes com IC possuem taxas elevadas de mortalidade e eventos cardiovasculares: 20-25% morrem dentro de 1 ano da apresentação do quadro clínico e 40-50% dentro de 5 anos (Fowkes *et al.*, 2017; Norgren; Hiatt; Dormandy,2007)

1.3 Classificação da DAOP

Os esquemas de classificação mais amplamente utilizados para qualificar o nível de DAOP são o de Fontaine (Fontaine; Kim; Kieny, 1954) e Rutherford-Becker (Rutherford *et al.*,1997), sendo este último o mais comum (Dua; Lee, 2016) (Quadro 1). Os pacientes assintomáticos estão incluídos na classificação de Fontaine estágio I. O estágio II de Fontaine é dividido em estágios IIa e IIb. No estágio IIa a claudicação intermitente é limitante e, no estágio IIb, esta mesma claudicação, evolui para incapacitante. Quando há dor isquêmica no membro, mesmo em repouso, os pacientes estão classificados no estágio III. O estágio IV inclui aqueles pacientes com isquemia do membro tão avançada que o tecido perde o seu trofismo. A necrose é a regra.

Rutherford Grau I inclui os pacientes assintomáticos ou aqueles que apresentam sintomas durante altos níveis de atividade física. Os pacientes de Rutherford Grau II desenvolvem sintomas em níveis moderados de atividade física. Na classificação Rutherford Grau III, os pacientes desenvolvem sintomas em baixo nível de atividade física e são limitados em seu estilo de vida, caracterizando uma claudicação incapacitante. Os sintomas clínicos da IC iniciam com a "dor de repouso" definida como dor intratável no pé e no tornozelo, em repouso, que ocorreu por mais de 2 semanas e é classificada no Grau IV de Rutherford. Os pacientes com Rutherford Grau V apresentam isquemia com uma perda menor de tecido. Geralmente formam-se ulcerações no pé. No Grau VI de Rutherford observa-se maior necrose tecidual e gangrena. É importante notar que a IC nem sempre progride através dos vários estágios desses sistemas de classificação e que alguns pacientes podem nem ter sintomas de DAOP antes do início da isquemia crítica (SBACV, 2015; Norgren; Hiatt; Dormandy, 2007; Dua; Lee, 2016)

Quadro 1: Classificação da DAOP

FONTAINE	RUTHERFORD
Estágio I : Assintomático	Categoria 0: Assintomático
Estágio II:	Categoria 1: Claudicação leve
a) Claudicação intermitente limitante	Categoria 2: Claudicação moderada
Estágio II:	Categoria 3: Claudicação severa
b) Claudicação intermitente incapacitante	
Estágio III: Dor isquêmica em repouso	Categoria 4: Dor em repouso
Estágio IV: Lesões tróficas	Categoria 5: Lesão trófica pequena
	Categoria 6: Necrose extensa

FONTE: SBACV, 2015

1.4 Fatores de risco da DAOP

Idade e Sexo

A idade é um fator de risco independente para o desenvolvimento da DAOP. Há uma relação proporcional entre a idade e o desenvolvimento da doença, sendo o maior risco observado na faixa etária acima de 70 anos (Dua; Lee, 2016). Em países de alta renda, a prevalência de DAOP parece ser semelhante em homens e mulheres e aumenta consistentemente com a idade, aproximadamente 5% entre 45-49 anos e 18% aos 85-89 anos. Nos países de

baixa e média renda, as taxas de prevalência também aumentam consistentemente com a idade, porém a prevalência de DAOP parece ser maior nas mulheres do que nos homens, com diferenças relativas mais marcantes em idades mais jovens, ou seja 6,3% das mulheres contra 2,9% dos homens aos 45-49 anos, em comparação com 12,3% versus 10,1% aos 75-79 anos (Fowkes *et al.*, 2017).

Etnia

A etnicidade tem um papel importante no desenvolvimento do DAOP (Dua; Lee, 2016). Estudos comparativos demonstraram prevalência significativamente maior da DAOP em negros e significativamente menor entre os asiáticos, quando comparados à etnia branca como referência. Há necessidade de pesquisas adicionais para identificar os fatores que geram essas diferenças (Vitalis *et al.*, 2017).

Tabagismo

Fumar é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da DAOP e parece aumentar o risco mais do que na doença coronária (Fowkes *et al.*, 2017). Há uma associação significativa e independente entre o hábito de fumar e a doença. O fumante possui um risco 4 vezes maior de desenvolver DAOP sintomática que o não fumante, sendo a severidade da doença proporcional ao número de cigarros fumados. A cessação do hábito de fumar melhora os parâmetros funcionais e fisiológicos da DAOP, mas é provável que seja necessário mais de 20 anos para igualar o nível de risco com os

indivíduos que nunca fumaram. Existem dados limitados na literatura que demonstram a associação do fumante passivo, o não-fumante que convive com fumantes em ambientes fechados, com a DAOP. Alguns estudos referem a existência de uma correlação positiva entre a exposição passiva ao fumo e a doença, com relação dose-resposta significativa, tanto para quantidade quanto para a duração da exposição (Dua; Lee, 2016; Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes *et al.*, 2017). É improvável que o efeito global do tabagismo diminua substancialmente. As projeções recentes indicam que o número de fumantes aumentará de 794 milhões em 2010 para 872 milhões em 2030, embora a prevalência *per capita* da população caia ligeiramente, principalmente em países ricos (Fowkes *et al.*, 2017).

Diabetes Mellitus

Existe uma forte associação do diabetes mellitus (DM) com DAOP sintomática e assintomática, sendo 2 vezes mais provável o desenvolvimento da doença sintomática em pessoas com DM em comparação com os não-diabéticos (Fowkes *et al.*, 2017). Os riscos da DAOP aumentam com a gravidade da DM. Para cada aumento na porcentagem de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) existe um risco de aumento correspondente de 26% para DAOP. Os diabéticos, devido ao processo de resistência à insulina, tendem a ter formas mais agressivas de DAOP que resultam na necessidade de amputação dos membros 5-10 vezes mais do que os não-diabéticos. A hipertensão em conjunto com DM aumenta o risco de DAOP, mas não é tão potente como fator de risco quando comparado com DM ou tabagismo (Dua; Lee, 2016; Criqui;

Aboyans, 2015). A epidemia mundial de DM associada a níveis crescentes de obesidade, provavelmente levará a uma maior proporção de casos de DAOP relacionados ao DM, pelo menos nos países ocidentais. Estima-se que de 2013 a 2035 o número de pacientes com DM aumentará universalmente de 382 milhões para 592 milhões (Fowkes *et al.*, 2017).

Dislipidemia

O colesterol total (CT) é fortemente relacionado ao desenvolvimento da DAOP, entretanto, a relação CT/HDL-C (colesterol da lipoproteína de alta densidade) foi considerada um marcador preciso de risco para DAOP. Níveis elevados de HDL-C são considerados ateroprotetores para a doença (Natarajan *et al.*, 2003; Ridker; Stampfer; Rifai, 2001; Criqui, *et al.*, 2005; Criqui; Aboyans, 2015; Zhang, *et al.*, 2016; Fowkes, *et al.*, 2017).

Os níveis séricos de triglicérides não foram significativamente associado à DAOP após o ajuste para outras medidas lipídicas, bem como, o nível de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) parece estar menos associada com a doença (Van Den Berg *et al.*, 2016; Stoekenbroek *et al.*, 2016; Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes, *et al.*, 2017). A dislipidemia em pacientes com DAOP será abordada com mais detalhes abaixo.

Hipertensão

A maioria dos estudos epidemiológicos associa a hipertensão com maior risco de desenvolver DAOP. Esta relação não tem sido tão forte quanto a

do tabagismo ou DM. Níveis elevados da pressão arterial sistólica foram invariavelmente associados ao risco de DAOP, entretanto, a elevação da pressão arterial diastólica, muitas vezes não obteve uma associação significativa. Embora os riscos relativos associados à hipertensão arterial sejam modestos em alguns estudos, sua alta prevalência, particularmente entre pacientes idosos, contribui significativamente para sobrecarregar, juntamente com os outros fatores de risco, o desenvolvimento da DAOP na população (Meijer, *et al.*, 2000; Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes *et al.*, 2017).

Outros fatores de risco

Além dos fatores de risco tradicionais citados acima, a doença renal crônica, proteína C reativa sérica e fibrinogênio sérico, mostraram associação com a DAOP em muitos estudos. A hiper-homocisteinemia, obesidade, consumo de bebidas alcoólicas, fatores genéticos e infecções são referidos como possíveis fatores associados com a DAOP, porém, não há evidência clínica que suporte uma associação positiva, consistente e independente destes fatores com a doença aterosclerótica obstrutiva periférica (Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes *et al.*, 2017).

1.5 Diagnóstico da DAOP

A estratégia diagnóstica da DAOP deve incluir história clínica e exame físico minucioso, com investigação de sinais clínicos sugestivos, tais como,

presença de claudicação intermitente, ausência de pulsos periféricos, frêmitos arteriais e alterações de pele no membro afetado, bem como a confirmação da gravidade da obstrução vascular (SBACV, 2015).

Índice tornozelo-braquial e índice hálux-braquial

O índice tornozelo-braquial (ITB) é a razão entre a pressão arterial sistólica no tornozelo com pressão sistólica na artéria braquial, aferida com o indivíduo em decúbito dorsal, com uso de esfigmomanômetro e um aparelho portátil de ultrassom de ondas contínuas (SBACV, 2015; Fowkes *et al.*, 2017). Quando a DAOP é suficientemente grave para alterar o fluxo arterial no membro inferior em repouso, a pressão arterial no tornozelo decresce. A distinção de uma diminuição da pressão arterial devido à DAOP da hipotensão, geralmente relacionada a outras condições, é realizada aferindo a pressão arterial sistólica no tornozelo e comparada com a do braço, calculando a proporção. O membro superior é menos acometido pela aterosclerose que o membro inferior, mas, para evitar o viés devido à estenose da artéria subclávia, a pressão mais alta dos dois braços é preferida ao calcular o ITB. Fisiologicamente, o valor do ITB é próximo de 1 devido ao fenômeno de amplificação do pulso. Valores do ITB de 0,91 -1,40 são considerados normais e, $\leq 0,90$, como anormais. Indivíduos com vasos muito rígidos possuem um índice $>1,4$ indicativo de incompressibilidade arterial devido à provável calcificação (Norgren; Hiatt; Dormandy, 2007). Em geral, o ITB oferece boa sensibilidade (80%) e excelente especificidade (95%) para identificar a DAOP

(Aboyans *et al.*,2012). Dada a facilidade de medição e seus altos índices de sensibilidade e especificidade, o ITB é considerado o teste de triagem de primeira linha para definir tanto DAOP sintomática como assintomática, objetivamente em estudos epidemiológicos, bem como no cenário clínico (SBACV, 2015; Fowkes *et al.*, 2017).

Aferições falsamente elevadas das pressões sistólicas, durante a execução do ITB, podem ocorrer em pacientes diabéticos e com doença renal crônica avançada. Nesta situação, devido o menor acometimento aterosclerótico nas artérias dos artelhos, a mensuração da pressão do hálux fornece valores mais acurados das pressões sistólicas distais (Aboyans *et al.*, 2012). Diferente do ITB, o índice hálux-braquial (IHB) permanece com seus critérios diagnósticos mal definidos. Recomenda-se um índice IHB <0,70 como ponto de corte, porém esta informação não é estritamente baseada em evidências (SBACV,2015).

Teste da esteira

Testes de exercícios em esteira podem ser usados para estabelecer o diagnóstico da DAOP. Os pacientes com claudicação que apresentam estenose ilíaca isolada podem não ter diminuição da pressão em repouso e, portanto, um ITB normal em repouso. No entanto, com o exercício, o aumento da velocidade do fluxo sanguíneo tornará tais lesões hemodinamicamente significativas. Nessas condições, o exercício induzirá uma diminuição no ITB que pode ser detectada logo após o exercício e, assim, estabelecer o diagnóstico da DAOP.

Uma diminuição no ITB de 15% a 20% confirma o diagnóstico de DAOP. Se uma esteira não estiver disponível, o exercício de caminhada pode ser realizado escalando escadas ou em um corredor (Norgren; Hiatt; Dormandy, 2007; SBACV, 2015).

Ecocolor Doppler

O ecocolor Doppler vascular (EV) é um exame não-invasivo e eficaz em discriminar com precisão vasos obstruídos, estenóticos e normais. É útil para diagnosticar a localização anatômica e o grau de estenose arterial, mas não apresenta informação morfológica exata em relação à extensão e natureza das lesões. Na presença de lesões calcificadas e em pacientes obesos mórbidos, o ecocolor Doppler vascular é limitado. Este exame é recomendado como avaliação pré-operatória e de acompanhamento pós-operatório para cirurgia de revascularização na DAOP (Sultan; Tawfick; Hynes, 2013; Rooke et al., 2011).

Arteriografia por subtração digital

A arteriografia por subtração digital (ASD) é considerada o padrão de referência para avaliação da estenose ou oclusão arterial em pacientes com DAOP. Atualmente, no entanto, a ASD não é usada como ferramenta de diagnóstico, devido ao caráter invasivo e ao risco de complicações. Alguns estudos comparativos mostraram que a angiotomografia e angiorressonância magnética com contraste são técnicas de imagem não-invasivas altamente precisas (Jens *et al.*, 2013). Certos estudos sugerem que a angiorressonância

é superior a ASD na visualização das artérias da perna e do pé (Leiner *et al.*, 2004; Dorweiler *et al.*, 2002).

Angiotomografia e angiorressonância

A angiotomografia e a angiorressonância são técnicas precisas para avaliar a gravidade das lesões arteriais em pacientes com DAOP sintomática. Não há diferenças significativas no desempenho diagnóstico das duas técnicas e seguramente podem distinguir entre estenoses e oclusões de alto grau nos pacientes acometidos pela DAOP. Ambas as técnicas possuem boa acurácia no diagnóstico da DAOP, com valores de sensibilidade e especificidade superiores a 90%, quando comparados com a ASD como padrão-ouro. Nos indivíduos diabéticos com DAOP que acomete as artérias abaixo do joelho, a angiorressonância não deve ser considerada como exame de primeira linha (Jens, *et al.*, 2013; Healy *et al.*, 2013).

1.6 Tratamento da DAOP

O tratamento clínico, a cirurgia aberta e a cirurgia endovascular fazem parte das principais opções terapêuticas da DAOP.

De maneira geral, o tratamento clínico consiste nas modificações dos fatores de risco, exercícios supervisionados de caminhada e terapia medicamentosa. O controle da glicemia, pressão arterial sistêmica e dos níveis

sanguíneos elevados de colesterol, bem como o combate ao tabagismo, sedentarismo e obesidade, ajudam a prevenir os eventos cardiovasculares e a progressão da DAOP. Exercícios de caminhada supervisionados são prescritos para auxiliar no aumento da distância percorrida sem dor e na qualidade de vida física, em pacientes sintomáticos com claudicação intermitente. No tratamento da DAOP sintomática, as drogas hemorreológicas são utilizadas extensamente, dentre elas destacam-se o cilostazol, medicamento com função antiagregante plaquetária e vasodilatadora. A antiagregação plaquetária tem uma importante e bem estabelecida função de reduzir os eventos cardiovasculares e melhorar os índices de perviedade das revascularizações. Geralmente utiliza-se o ácido acetil-salicílico e/ou clopidogrel, entre outros medicamentos (Norgren; Hiatt; Dormandy, 2007; SBACV, 2015).

A cirurgia aberta e o tratamento endovascular tem por objetivo restaurar o fluxo sanguíneo para o segmento isquêmico. Provavelmente, ambos tem uma eficácia geral semelhante, embora os estudos com evidência clínica comparando os dois sejam fracos e a probabilidade de sucesso clínico durável diferente. A cirurgia aberta, mais invasiva, restaura o fluxo sanguíneo local ultrapassando as lesões ateroscleróticas obstrutivas através de pontes, utilizando a veia safena ou prótese vascular sintética. Recentemente, o tratamento endovascular vêm se destacando devido possuir uma abordagem menos invasiva. A determinação do melhor método de revascularização para o tratamento da DAOP sintomática, baseia-se no equilíbrio entre o risco de uma intervenção específica e a durabilidade da revascularização. A localização e a morfologia da doença devem ser caracterizadas antes da realização de qualquer revascularização para determinar a intervenção mais apropriada. O

esquema de classificação TASC II (Norgren; Hiatt; Dormandy, 2007) é o mais utilizado para a estratificação das lesões ateroscleróticas. Assim, as lesões tipo "A" representam aquelas que produzem excelentes resultados e devem ser tratados por meios endovasculares. As lesões tipo "B" oferecem resultados suficientemente bons com os métodos endovasculares e esta abordagem ainda é preferida primeiro, a menos que seja necessária uma revascularização aberta para outras lesões associadas na mesma área anatômica. As lesões tipo "C" produzem resultados de longo prazo suficientemente elevados com revascularização aberta, devendo os métodos endovasculares serem usados apenas em pacientes com alto risco de reparo aberto. As lesões tipo "D" não produzem bons resultados com métodos endovasculares para justificá-los como tratamento primário (SBACV, 2015; Jaff, et al., 2015).

1.7 DAOP e lípidos

A prevalência da dislipidemia em indivíduos com DAOP sintomática varia de 85%-95% (Gardner, *et al.*, 2013), porém, a associação entre dislipidemia e a doença não está totalmente esclarecida. Em virtude das várias frações lipídicas estarem altamente interligadas, a identificação do(s) fator(es) mais importante(s) ainda é difícil (Fowkes *et al.*, 2017).

O colesterol total (CT) tem sido a medida lipídica mais amplamente estudada como um fator de risco potencial para DAOP. Embora a maioria dos estudos também tenha demonstrado que o colesterol total é um poderoso fator de risco independente para DAOP, outros não conseguiram confirmar essa

associação (Norgren;Hiatt;Dormandy,2007;Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes *et al.*, 2017).

Em muitos estudos clínicos pilotos, os níveis séricos de triglicérides foram fortemente relacionados ao desenvolvimento da DAOP, entretanto, na maioria dos grandes estudos epidemiológicos, triglicérides não foram significativamente associado à doença após o ajuste para outras medidas lipídicas (Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes *et al.*,2017).

Atualmente, os níveis elevados da HDL-C e apolipoproteína (Apo) A-I permanecem sendo os principais fatores ateroprotetores para o desenvolvimento da DAOP (Criqui, *et al.* ., 2005; Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes, *et al.*, 2017; Ness; Aronow; Ahn, 2000). Entretanto, a relação CT/HDL-C foi considerada um marcador preciso e a melhor medida lipídica de risco para DAOP (Ridker; Stampfer; Rifai, 2001; Natarajan *et al.*, 2003;Criqui;Aboyans,2015;Fowkes *et al.*,2017;Zhang, *et al.*,2016).

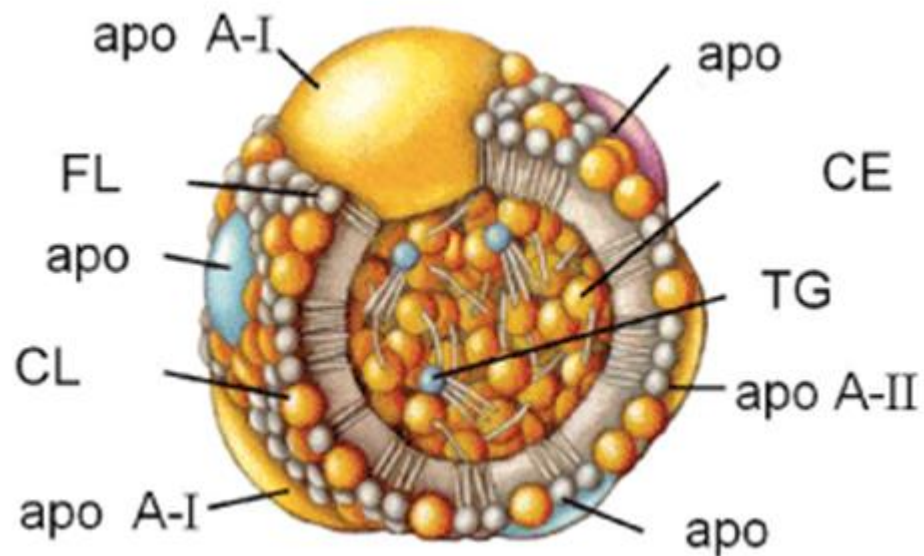
Estudos também mostraram que os níveis de lipoproteína plasmática (a) e apo B foram independentemente relacionados ao risco de desenvolver DAOP (Price *et al.*, 2001; Gardner, *et al.*, 2013; Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes *et al.*,2017)

A LDL-C é um fator de risco particularmente forte para DAC, mas parece estar menos fortemente associada com AVC, aneurisma de aorta abdominal e DAOP (Van Den Berg *et al.*, 2016; Stoekenbroek *et al.*,2016)

1.8 HDL

Como já está bem estabelecido na literatura, o HDL-C correlaciona-se inversamente com a incidência de DCV (Gordon et al, 1977; Gordon et al, 1989; Maranhão; Freitas, 2014). Portanto, a HDL têm uma função anti-aterogênica fundamental e, ao lado da terapêutica de redução do LDL-C, o aumento da HDL-C tornou-se também um importante alvo terapêutico para a prevenção primária e secundária dos eventos cardiovasculares.

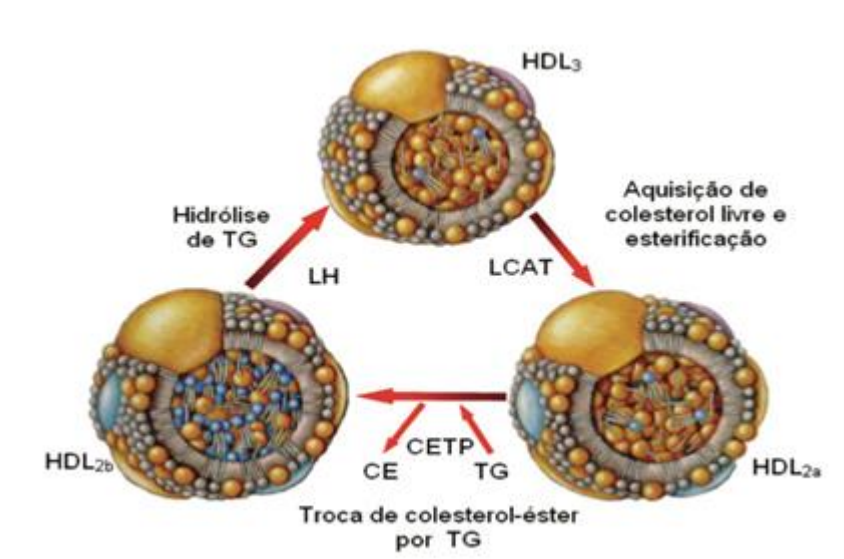
A HDL nascente é produzida no fígado e intestino como partículas discóides compostas de fosfolípidos e colesterol livre, além da apo A-I (Figura 1). Essas partículas captam o excesso de colesterol livre das células dos tecidos periféricos e da superfície das lipoproteínas ricas em triglicérides, sendo convertidas a partículas menores, as HDL₃. Essas partículas são progressivamente transformadas em forma esférica, as HDL₂, pela aquisição de lípidos e esterificação do colesterol pela ação da lecitina-colesterol acil transferase (LCAT) e do seu co-fator, Apo A-I. Como a maior parte da Apo A-I presente no plasma está na fração HDL e a LCAT também é associada à HDL, a esterificação do colesterol ocorre principalmente nessas lipoproteínas (Lehninger & Nelson, 2002; Wang et al., 2004; Maranhão; Freitas, 2014).



FONTE: *Arq Bras Cardiol* 2006; 87 : 672-679

Figura 1 - Representação da composição da lipoproteína de alta densidade (HDL). *FL*, fosfolípides; *apo*, apolipoproteína; *CL*, colesterol livre; *CE*, colesterol esterificado; *TG*, triglicérides.

O colesterol esterificado pode ser transferido, através da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), das HDL₂ para as lipoproteínas ricas em triglicérides e para as LDL (Glomset, 1970). As lipoproteínas ricas em triglicérides por sua vez transferem triglicérides para as HDL₂ (Figura 2). A interação da HDL₃ com as células da parede arterial nesse processo de retirada do colesterol livre é mediada por um receptor específico, de superfície celular, com especificidade para a Apo A-I. A HDL rica em colesterol esterificado é captada pelo fígado através de receptores celulares scavengers, tais como receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI).



FONTE: *Arq Bras Cardiol* 2006; 87: 672-679

Figura 2 - Metabolismo da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL)
HDL lipoproteína de alta densidade; *LH* lipase hepática; *LCAT* lecitina colesterol aciltransferase; *CETP* proteína de transferência de colesterol esterificado; *CE* colesterol esterificado; *TG* triglicérides.

Além do seu papel na esterificação e no transporte reverso do colesterol, a HDL também tem atividade antioxidante, devido à associação de paraoxonase 1 (PON1), e atividades anti-inflamatória, antitrombótica e vasodilatadora, que contribuem para a ação antiaterogênica da lipoproteína (Meyers *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Maranhão; Freitas, 2014).

1.9 HDL e aterogênese

A doença aterosclerótica é um problema de crescente prevalência, principalmente nos grandes centros e nas populações de faixa etária mais elevada, ocorrendo aumento de mortalidade em função da mesma. A doença

aterosclerótica é considerada multifatorial e sua prevenção passa pela identificação do conjunto de fatores de risco. Estes fatores incluem a idade, o sexo, diabetes, hipertensão arterial, tabagismo e sedentarismo. A percepção entre relação de riscos à saúde e estresse também tem sido relatada (Heslop *et al.*, 2002; Maranhão; Freitas, 2014)

Além desses fatores, a dislipidemia é outro fator de risco para doença aterosclerótica, em que sua extensão é diretamente proporcional aos níveis séricos de colesterol (Steinberg; Witztum , 1990). Dentre as anormalidades lipídicas clássicas, os níveis elevados de LDL-C, bem como os níveis reduzidos de HDL-C estão relacionados com importante aumento da incidência de doença aterosclerótica.

Desse modo, há um grande interesse em identificar terapias capazes de reduzir ainda mais o risco de eventos ateroscleróticos. Um alvo terapêutico que tem despertado muito interesse é o aumento nos níveis de HDL-C, já que os níveis reduzidos desse colesterol constituem a anormalidade lipídica mais freqüentemente encontrada em pacientes com doença aterosclerótica estabelecida. A HDL é a lipoproteína de maior importância na prevenção da aterosclerose. Além de ser a lipoproteína responsável pelo transporte de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, a HDL tem outras funções ateroprotetoras não relacionadas ao transporte de lípidos. Essa lipoproteína, além de modular a função endotelial, desempenha atividades antioxidantes, antiinflamatórias e antitrombóticas (Kwiterovich Jr, 2000; Sviridov; Nestel, 2002; Rader, 2002; Bater *et al.*, 2003; Meyers; Kashyap, 2004; Maranhão; Freitas, 2014).

A subpopulação de HDL menos densa e mais rica em colesterol esterificado (HDL₂) parece ser mais protetora que a subpopulação menor e mais densa (HDL₃). Isso se deve, provavelmente, ao fato de a subpopulação de HDL₂ ser composta principalmente por HDLs que contém somente Apo A-I, que são mais eficientes em receber colesterol de tecidos periféricos, via ABCA1, e também são melhores doadores hepáticos de colesterol esterificado, via SR-B1, quando comparadas as HDLs que contém Apo A-I e A-II (SVIRIDOV; Nestel, 2002; Rader, 2002; Meyers; Kashyap, 2004; Maranhão; Freitas, 2014).

Além de retirar o excesso de colesterol celular, a HDL também atua no processo anterior a esse, inibindo que modificações oxidativas ocorram na LDL e, conseqüentemente, inibindo a captação da LDL pelos macrófagos. Ao prevenir a oxidação da LDL, a HDL também previne o endotélio dos efeitos citotóxicos da LDL-oxidada e da migração e adesão de monócitos, ambos induzidos pela LDL oxidada (BARTER *et al.*, 2003). Vários componentes da HDL contribuem para o efeito antioxidante, incluindo sua Apo AI e algumas enzimas sendo a mais importante, a PON1. A PON1 é sintetizada primeiramente no fígado e uma porção é secretada no plasma onde é associada com a HDL. Ela é a responsável pela metabolização dos lípidos oxidados de ambas LDL e HDL. Mackness e colaboradores foram os primeiros a demonstrar que a PON1 humana poderia inibir a oxidação da LDL *in vitro* (Mackness; Durrington, 2001). Para exercer seu efeito antioxidante, é necessário que haja interação entre a PON1 e os lípidos oxidados, o que pode ocorrer de duas formas: uma das possibilidades é que a atividade antioxidante da PON1 seja mediada por difusão durante a interação entre LDL e HDL, a outra e mais provável consiste na transferência dos lípidos oxidados da LDL

para a HDL e posterior ação da PON1 (James; Deakin, 2004). Importante destacar que vários fatores estão envolvidos na modulação e nos níveis dessa enzima, como fatores ambientais, fármacos, fumo, álcool e dieta (Costa et al., 2005) e, em virtude disso, numa dada população a atividade da PON1 pode variar em até 40 vezes (Brophy et al., 2001). Outra função da HDL envolvida no processo aterosclerótico é sua capacidade de reduzir a expressão das moléculas de adesão, induzidas pelas citocinas nos processos inflamatórios. A HDL modifica a célula de alguma maneira que as tornam resistentes em expressar essas moléculas induzidas por citocinas (Cockerill GW *et al.*, 1994; Calabresi L *et al.*, 1997; Park SH *et al.*, 2003; Maranhão; Freitas, 2014). Importante destacar que essa inibição não é afetada pela variação no tamanho da HDL ou pela composição das apolipoproteínas, colesterol esterificado e triglicérides.

1.10 Transferência de lípidos para HDL

Os resultados dos estudos onde se investigou a relação entre proteínas de transferência e a incidência de DCV são contraditórios. Não está claro se a presença de DCV está acompanhada de alterações da ação da CETP ou PLTP (proteína de transferência de fosfolípidos). Há nova abordagem terapêutica em que os níveis HDL são aumentados através do bloqueio da CETP, visando a estabilização ou regressão da aterosclerose pela ação da HDL no transporte reverso. No entanto, o primeiro fármaco desta linha de inibidores de CETP, o Torcetrapib, não se mostrou benéfico na prevenção da DCV e até aumentou a

frequência de eventos, o que levou à suspensão dos ensaios clínicos (Barter *et al.*, 2007; Nicholls *et al.*, 2008). No entanto, novos bloqueadores de CETP, tais como dalcetrapib, anacetrapib e evacetrapib, ainda estão sendo desenvolvidos e avaliados, na tentativa de se evitar os efeitos colaterais do Torcetrapib (Barter *et al.*, 2007). A escolha da HDL como alvo terapêutico mostra a importância da função antiaterogênica desta lipoproteína.

A HDL é, portanto constantemente remodelada e a transferência de lípidos é essencial para o papel dessa lipoproteína na esterificação do colesterol e no transporte reverso. Ambos os processos são interligados e são a chave para a homeostase do colesterol no organismo. A esterificação estabiliza o “pool” plasmático do colesterol, enquanto o transporte reverso permite o transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado e sua eliminação pela bile (Lehninger & Nelson, 2002; Maranhão; Freitas, 2014).

A transferência de lípidos entre classe de lipoproteínas é bidirecional e depende da estrutura da lipoproteína doadora e receptora, assim como doação das proteínas de transferências, a CETP e a PLTP. A concentração da lipoproteína doadora e receptora provavelmente também influencia nesse processo (Ferretti, 2006; Norata, 2006; Lamarche, 1999; Rashid, 2003; Maranhão; Freitas, 2014).

Como o processo de transferência de lípidos é determinante para a composição e metabolismo da HDL, também é possível que além da função da HDL no transporte reverso do colesterol e esterificação, as outras funções antiateroscleróticas da lipoproteína sejam também afetadas nesse processo. Um exemplo clássico da influência deste processo é o “efeito gangorra” que

acontece nas hipertriglicidemias, que determinam a diminuição do HDL-colesterol: quando aumenta a concentração das VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa), ricas em triglicérides, aumenta a transferência de colesterol da HDL para a VLDL e a transferência de triglicérides da VLDL para a HDL. A HDL fica então enriquecida em triglicérides e, sob ação da lipase hepática, sofre um processo de lipólise que desestabiliza a o desestabiliza a partícula da HDL levando à diminuição das HDL no plasma (Lehninger & Nelson, 2002). Consequentemente, a função das diversas proteínas associadas às partículas de HDL fica diminuída em decorrência da diminuição da fração HDL.

A relação entre transferência de lípidos e a aterosclerose é complexa e ainda largamente desconhecida. A transferência de lípidos tem um papel crítico na formação e no metabolismo da HDL no plasma, remodelando continuamente esta classe de lipoproteínas, podendo, desta forma, interferir nos seus vários aspectos funcionais. (Maranhão; Freitas,2014).

Como ocorrem perturbações marcantes do status da HDL nas DCV, incluindo a DAOP, como a queda na sua concentração, é fundamental o entendimento das alterações do metabolismo da HDL nesta doença, assim como, alterações na transferência de lípidos, um terreno muito complexo e ainda bastante inexplorado. Duas questões nos chamam a atenção: desenvolvemos uma nova metodologia para avaliar simultaneamente as transferências para a HDL dos quatro principais lípidos da circulação, colesterol esterificado, fosfolípidos, triglicérides e o colesterol livre (Lo Prete *et al.*, 2009). Neste ensaio *in vitro*, uma nanoemulsão artificial padrão é usada como doadora de lípidos para a HDL. Após incubação da nanoemulsão contendo os quatro lípidos marcados radioativamente, com o plasma, a HDL é separada no sobrenadante por precipitação química das lipoproteínas que contem Apo B e da nanoemulsão. A transferência dos quatro lípidos da nanoemulsão para a fração HDL é medida quantificando-se a radioatividade no sobrenadante após a incubação (Lo Prete *et al.*, 2009; Maranhão; Freitas, 2014;). Além da grande praticidade na realização dos testes, o método tem a vantagem de avaliar simultaneamente a transferência dos quatro principais lípidos que compõem a HDL, o que dá uma visão integrada deste processo essencial no metabolismo da lipoproteína. Esta abordagem foi utilizada para se investigar o metabolismo das HDL em diversas situações clínicas (Giribela *et al.*, 2008; Daminelli *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2009; PUK *et al.*, 2010, Feitosa-Filho *et al.*, 2009; Gagliardi *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2011; Maranhão; Freitas, 2014). Acreditamos que a determinação da transferência de lípidos em pacientes com DAOP possa proporcionar um novo “insight” no metabolismo da HDL nesta doença e nos

mecanismos que deflagram o processo de aterogênese em pacientes com a doença. A avaliação de fatores paralelos a este processo, como o status da CETP, PLTP e LCAT, a concentração do colesterol livre e ácidos graxos livres no plasma, composição da HDL e suas subfrações pode completar um quadro dinâmico e integrativo para a interpretação do quadro das prováveis alterações de transferências. Os resultados, além de auxiliarem a interpretação da fisiopatologia da DAOP, poderão também dar direções para novos alvos terapêuticos.

3 Objetivos

- Investigar se as transferências de lípidos – colesterol esterificado e não- esterificado, triglicérides e fosfolípidos - para a fração total da HDL estão alteradas em pacientes com DAOP em comparação com indivíduos do grupo controle, sem a doença.
- Investigar se a presença simultânea de DM nos pacientes com DAOP é acompanhada de alterações na transferência de lípidos para a HDL.

4 Casuística e Métodos

Os participantes do estudo foram selecionados no ambulatório de Cirurgia Vascular da Fundação Hospital de Clínicas Gaspar Vianna (FHCGV), Belém- PA. No total, 58 participantes foram avaliados quanto às características clínicas e laboratoriais, orientados detalhadamente sobre os objetivos do estudo, assim como todos os riscos, benefícios e procedimentos envolvidos no protocolo de pesquisa. Quando em conformidade com os esclarecimentos prestados, os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido passando a fazer parte do estudo, cuja pesquisa foi analisada e aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisas do FHCGV, com número de parecer 1.098.259 e CAAE 30818614.0.0000.0016, e pela Comissão de Ética em Pesquisas do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-FMUSP) sob número de parecer 796-019 e CAAE 30818614.0.3001.0068.

Os participantes foram alocados em diferentes grupos e subgrupos:

- Grupo controle: 20 indivíduos adultos, com média de idade de 68 ± 8 anos, sendo nove do sexo feminino e onze do sexo masculino, não portadores de DAOP, não diabéticos, não hipertensos, sedentários, não tabagistas e que não faziam uso freqüente de bebida alcoólica.
- Grupo de portadores da DAOP (DAOP): 38 indivíduos adultos, com média de idade 69 ± 10 anos, sendo quatorze do sexo feminino e vinte e quatro do sexo masculino, portadores de DAOP. Uma significativa parcela dos pacientes fazia uso regular de estatina. Nesses casos, a amostra de sangue foi coletada pelo menos 45 dias após a suspensão do medicamento. A estatina foi reintroduzida logo após a coleta.

Os pacientes com DAOP foram subdivididos em dois grupos: (i) portadores da DAOP sem diabetes (DAOP/SD): 19 indivíduos adultos, com média de idade 68 ± 11 anos, sendo oito do sexo feminino e onze do sexo masculino; (ii) portadores da DAOP com diabetes melitus tipo 2 (DAOP/DM): 19 indivíduos adultos, com média de idade 69 ± 09 anos, sendo seis do sexo feminino e treze do sexo masculino.

Os participantes foram pareados por sexo, idade, índice de massa corpórea (IMC) e o tempo dos sintomas relacionados à DAOP.

4.1 Critérios de inclusão

Para grupo DAOP, os pacientes selecionados para estudo apresentavam DAOP sintomática (claudicação limitante ou dor isquêmica de repouso) diagnosticada por meio de anamnese, exame físico e índice tornozelo-braquial (ou artelho-braquial, caso necessário) dentro dos critérios da Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vasculare e do *TransAtlantic Intersociety Consensus* (SBACV, 2015). Ausência de DAOP foi definida como níveis de ITB de 0,91 a 1,40, na ausência de revascularização arterial de membros inferiores. (Norgren; Hiatt; Dormandy, 2007; SBACV, 2015).

Para o grupo Controle, o mesmo foi pareado com idade e IMC não fumantes, sem doenças crônicas.

4.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram: presença de doenças crônico-degenerativas, neoplasias malignas ou benignas, alcoolismo crônico, insuficiência renal (concentrações plasmáticas de creatinina, acima dos valores de referência), diabetes mellitus tipo I; insuficiência hepática (bilirrubina total e frações, atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina amino transferase (ALT), gama glutamil transferase (γ GT) e fosfatase alcalina acima dos valores de referência), hipotireoidismo ou hipertireoidismo, história prévia de acidente vascular cerebral hemorrágico (AVCH), hemorragias recentes, trombocitopenia, punção espinal recente, cirurgia recente, úlcera gástrica.

4.3 Materiais

Os isótopos radioativos [$1\text{-}^{14}\text{C}$] oleato de colesterol, [$7(n)\text{-}^3\text{H}$] colesterol, [$^{14}\text{C}\text{-FL}$] ^{14}C -fosfatidilcolina e [$^3\text{H}\text{-TG}$] ^3H -triglicérides foram obtidos da Amersham International (Little Chalfont, Inglaterra). Os lípides trioleína, oleato de colesterol, colesterol e fosfatidilcolina, utilizados para a o preparo da emulsão foram adquiridos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA). Os kits para determinação enzimática de triglicérides, colesterol total e de HDL-C foram obtidos da Labtest Diagnostica S. A. (Minas Gerais, Brasil), e para colesterol livre, foi usado kit da Wako, Richmond, VA, EUA

4.4 Métodos

4.4.1 Determinações bioquímicas séricas

Os participantes foram convocados para a coleta de sangue, após 12h de jejum. A determinação dos níveis plasmáticos de triglicérides foi realizada através de método enzimático (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil). O colesterol total foi determinado por método colorimétrico enzimático (Chod-Pap, Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil). O HDL-C foi determinado pelo mesmo método utilizado para o colesterol total, após precipitação química das lipoproteínas que contêm apolipoproteína B, utilizando-se reagente precipitante constituído por cloreto de magnésio e ácido fosfotungstíco. Os valores de LDL-C foram determinados pela fórmula de Friedewald *et al.* (1972) e os valores de não-HDL-C foram obtidos pela diferença entre o colesterol total e o HDL-C. Desta forma, temos:

$$\text{LDL-C} = \text{CT} - [\text{HDL-C} + (\text{TG} \div 5)]$$

$$\text{não HDL-C} = \text{CT} - \text{HDL-C}$$

As determinações plasmáticas das apolipoproteínas A-I e B foram realizadas por método turbidimétrico por meio de kit disponível comercialmente (Roche Diagnostics, Suíça).

4.4.2 Preparo da nanoemulsão lipídica artificial

A nanoemulsão lipídica artificial foi preparada segundo a técnica descrita por GINSBURG et al. (1982) modificada por MARANHÃO et al. (1993). Em um frasco foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio: metanol (2:1). Posteriormente, foram adicionados à mistura de lípidos os isótopos ^3H - éster de colesterol e ^{14}C -fosfatidilcolina ou ^3H -triglicérides e ^{14}C -colesterol livre. Os solventes residuais foram então evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecação a vácuo, por 16h, a 4°C . Após a adição de 10 mL de tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8, a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultrassônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil) potência 125 watts, durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55°C . Para obtenção da nanoemulsão lipídica artificial na faixa de diâmetro e tamanho desejados, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (ultracentrífuga, rotor Beckman SW -41). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a $200.000 \times g$ por 30 minutos, a 4°C , foi removido por aspiração (1 mL) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para $1,21\text{g/mL}$. Após a segunda centrifugação ($200.000 \times g$ por 2 horas a 4°C), a nanoemulsão lipídica artificial foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão Tri-HCl 0,01 M, pH 8. Finalmente, a emulsão foi esterilizada por filtração em membrana Milipore

de 0,22 μ m de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até 15 dias.

4.4.3 Ensaio de transferência de lípidos para HDL

Uma alíquota de 200 μ L de plasma dos participantes foi incubada com 50 μ L da nanoemulsão lipídica artificial marcada com os lípidos radioativos (³H- colesterol esterificado, ¹⁴C- fosfolípidos, ³H- triglicérides, ¹⁴C-colesterol não esterificado), a 37°C, sob agitação, durante 1 hora. Após esse procedimento, foram adicionados 250 μ L de reagente precipitante (0,2% Dextran/0,3 mol/L MgCl₂) seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos a 3000 rpm. O infranadante, contendo a nanoemulsão e as lipoproteínas plasmáticas que contém Apo B, é desprezado. O sobrenadante, contendo a HDL, foi submetido à contagem da radioatividade presente, que corresponde à transferência dos lípidos radioativos da nanoemulsão para a HDL. Foi calculada a percentagem de transferência de cada um dos lípidos, considerando como 100% a radioatividade total utilizada na incubação.

4.4.4 Determinação da concentração da CETP e LCAT

A concentração da LCAT e da CETP foi determinada por meio de imunoenensaio (ALPCO Immunoassays, EUA).

4.4.5 Análise estatística

As variáveis numéricas foram avaliadas quanto a normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Foi utilizado a ANOVA ou Kruskal-Wallis, dependendo da distribuição dos dados, para avaliar as diferenças dos marcadores bioquímicos em relação aos grupos (controle, DAOPDM, DAOPSM). O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a associação dos marcadores bioquímicos em relação as variáveis de transferência, o CEPT e o LCAT. A regressão linear múltipla foi utilizada para avaliar a influência dos marcadores bioquímicos em relação a cada variável de transferência. Em todo o trabalho foi utilizado o nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no Programa Minitab 18.

5 Resultados

5.1 Características físicas e clínicas dos participantes

A Tabela 1 mostra as características físicas e clínicas dos participantes do estudo. Não houve diferença significativa entre os grupos quando comparados sexo, idade, IMC e tempo de diagnóstico da doença ($p>0,05$). Nos dois grupos de pacientes com DAOP, a incidência de hipertensão arterial sistêmica foi maior que 80%, e a de fumantes foi baixa (~10%). Ácido acetilsalicílico e cilostazol foram os medicamentos mais utilizados; losartana foi o agente anti-hipertensivo mais utilizado. No grupo DAOP/DM, a metformina foi o agente hipoglicemiante mais frequente.

Tabela 1 - Características físicas e clínicas dos participantes

Parâmetros	Controles (n=20)	DAOP/SD (n=19)	DAOP/DM (n=19)	Valor de <i>p</i>
Gênero (M/F)	11/9	11/8	13/6	NS
Idade (anos)	68±7	68±11	69±9	NS
IMC (kg/m ²)	23±4	25,70±3,9	25,90±4,50	NS
Tempo de doença (anos)	-	4±3	5±3	NS
Hipertensão arterial sistêmica (%)	-	89,47	84,21	-
Tabagistas (%)	-	10,5	10,5	-
Ex-tabagistas (%) [#]	-	68%	63%	-
Medicações em uso (%)				
AAS	-	84	68	-
Cilostazol	-	68	74	-
Losartana	-	37	26	-
Metformina	-	0	26	-

Dados expressos em mediana e desvio padrão

NS não significativo ($p>0,05$); M masculino; F feminino; IMC índice de massa corporal; DAOP/SD doença arterial obstrutiva periférica sem diabetes; DAOP/DM doença arterial obstrutiva periférica com diabetes. AAS ácido acetilsalicílico.

[#]sem uso de tabaco > 5 anos.

5.2 Determinações bioquímicas

Parâmetros bioquímicos dos três grupos são mostrados na Tabela 2. Como esperado, o grupo DAOP/DM teve níveis glicêmicos mais altos. Não houve diferença entre os valores de triglicérides, LDL e Apo B. O grupo DAOP/DM apresentou concentrações de HDL-C e Apo A-I mais baixas que os controles e que o grupo DAOP/SD ($p < 0,05$). Concentrações de CETP e de LCAT foram semelhantes nos três grupos.

Tabela 2 - Concentrações plasmáticas de lipídios, glicose, LCAT e CETP dos grupos estudados

Determinações bioquímicas	Controle (n=20)	DAOP/SD (n=19)	DAOP/DM (n=19)	Valor de p
Glicemia de jejum (mg/dL)	90±11	92±14	122±78 ^{#*}	0,0015
Colesterol (mg/dL)				
Total	189±30	184±39	181±36	NS
HDL	50±15	45±16	38±11 ^{#*}	0.016
LDL	117±33	113±32	114±28	NS
não HDL-C	119 ±34	137±32	145 ± 37	NS
Triglicérides (mg/dL)	114±40	120±33	131±44	NS
ApoA-I (g/L)	1,36±0,10	1,40±0,24	1,13±0,22 ^{#*}	0,0128
Apo B (g/L)	0,88±0,27	0,97±0,26	0,86±0,22	NS
LCAT (µg/mL)	7,13±1,29	8,50±2,00	7,20±2,70	NS
CETP (µg/mL)	1,63±0,70	1,23±0,90	1,00±0,30	NS

Dados expressos em média ± desvio padrão

NS não significativo ($p > 0,05$); DAOP/SD doença arterial obstrutiva periférica sem diabetes; DAOP/DM doença arterial obstrutiva periférica com diabetes; HDL lipoproteína de alta densidade; LDL lipoproteína de baixa densidade; Apo A-I apolipoproteína A-I; Apo B apolipoproteína B; LCAT lecitina-colesterol aciltransferase; CETP proteína de transferência de colesterol esterificado; * $p < 0,05$ versus controle; # $p < 0,05$ versus DAOP/SD.

5.3 Transferência de lipídes para HDL

A Tabela 3 mostra os valores das taxas de transferência do colesterol livre, colesterol esterificado, triglicérides e fosfolípides da nanoemulsão lipídica artificial para a HDL dos pacientes dos três grupos estudados.

Houve menor taxa de transferência do colesterol livre nos grupos DAOP/SD e DAOP/DM comparado com os grupo controle ($p < 0,001$). Quando comparamos a taxa de transferência do colesterol livre entre os subgrupos de DAOP, com ou sem diabetes, verificamos que no grupo DAOP/DM a transferência é menor ($p < 0,05$).

A taxa de transferência de colesterol esterificado foi menor no grupo DAOP/DM quando comparado ao grupo controle ($p < 0,001$). Não houve diferença estatística significativa entre subgrupos de DAOP, com e sem diabetes.

Com relação à transferência de triglicérides, os grupos DAOP/DM e DAOP/SD apresentaram menor taxa em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). Os dois grupos de pacientes com DAOP apresentaram taxa de transferência de triglicérides similares.

Quando se comparou as taxas de transferência de fosfolípides, foram encontradas uma menor transferência no grupo DAOP/DM quando comparado com os grupos DAOP/SD e controle ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Taxa de transferência de colesterol livre, colesterol esterificado, triglicérides e fosfolípides da nanoemulsão lipídica artificial para HDL nos grupos estudados

Taxa de transferência	Controle (n=20)	DAOP/SD (n=19)	DAOP/DM (n=19)	Valor de p
Colesterol livre	6,59±1,25	5,13±1,44**	4,18±1,17** #	<0,001
Colesterol esterificado	4,12±0,89	3,56±1,18	2,96±0,60**	0,005
Triglicérides	5,66±1,05	4,35±0,59**	4,08±0,50**	<0,0001
Fosfolípides	15,40±1,11	15,20±1,68	13,90±1,09* #	0,0166

Dados expressos em média ± desvio padrão.

DAOP/SD doença arterial obstrutiva periférica sem diabetes; DAOP/DM doença aterosclerótica obstrutiva periférica com diabetes. * $p<0,05$ e ** $p<0,001$ versus controle; # $p<0,05$ versus DAOP/SD.

5.4 Correlações bivariadas e análise de regressão linear múltipla

A Tabela 4 mostra os resultados do estudo de correlação realizado pela análise bivariada nos grupos estudados. As transferências dos lípides estudados, as concentrações séricas de CETP e LCAT foram correlacionadas com vários parâmetros bioquímicos e IMC.

A transferência de colesterol livre se correlacionou positivamente com as concentrações de Apo A-I ($r=0.702$, $p<0,01$) e HDL-C ($r=0.608$, $p<0,01$) enquanto que a transferência de colesterol esterificado se correlacionou

positivamente com as concentrações de Apo A-I ($r=0.308$, $p<0,01$) e CETP ($r=0.631$, $p<0,05$). Também houve correlações positivas entre transferência de triglicérides e as concentrações de Apo A-I ($r = 0.436$, $p<0,05$), CETP ($r=0.539$, $p<0,01$), colesterol total ($r=0.231$, $p<0,05$) e HDL-C ($r=0.441$, $p<0,01$) e entre as transferência de fosfolípidos e as concentrações de CETP ($r=0.287$, $p<0,05$) e HDL-C ($r=0.367$, $p<0,01$). Houve uma correlação negativa entre transferência de fosfolípidos e IMC ($r=-0.396$, $p<0,01$). Foi encontrada, também, correlação positiva entre as concentrações de LCAT e IMC ($r=0.477$, $p<0,01$) e entre as concentrações de CETP e LDL-C ($r=0.309$, $p<0,05$).

Tabela 4 - Correlações entre as transferências lipídicas para HDL, concentrações séricas de CETP, LCAT e lipídios

	CL%	CE%	TG%	FL%	LCAT	CETP
Apolipoproteína A-I (g/L)	0.702**	0.308*	0.436*	0.297	0.217	0.0
Apolipoproteína B (g/L)	-0.295	0.102	-0.044	-0.04	-0.046	0.192
LCAT (µg/mL)	0.012	0.255	-0.117	-0.251	-	0.182
CETP (µg/mL)	0.012	0.631**	0.539**	0.287*	-0.182	-
Colesterol total	0.075	0.256	0.231*	0.19	0.187	0.178
HDL-C	0.608**	0.245	0.441**	0.367**	0.07	0.07
LDL-C	-0.119	0.209	0.197	0.138	-0.004	0.309**
Triglicérides	0.032	0.006	-0.042	-0.16	0.354	-0.256
não HDL-C	-0.128	0.209	0.112	0.032	0.164	0.152
Glicose	-0.232	-0.245	-0.141	-0.335	0.217	-0.171
IMC	0.002	-0.152	-0.073	-0.396**	0.477**	-0.239

CL colesterol livre; CE colesterol esterificado; TG triglicérides; FL fosfolípides; LCAT lecitina-colesterol aciltransferase; CETP proteína de transferência de colesterol esterificado; Apo A-I apolipoproteína A-I; Apo B apolipoproteína B; HDL-C colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C colesterol da lipoproteína de baixa densidade; IMC índice de massa corpórea;

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Em relação à análise de regressão linear múltipla, a transferência de colesterol esterificado associou-se independentemente com as concentrações de CETP ($\beta = 0,99$ e $p < 0,0001$) e presença de diabetes ($\beta = -1,00$ e $p 0,007$),

mas não com a presença de DAOP ($\beta = 0,17$ e $p=0,583$). A transferência de triglicérides foi associada com as concentrações de CETP ($\beta = 0.65$ e $p 0,002$) e de HDL-C ($\beta = 0.025$ e $p 0,031$). A taxa de transferência de FL foi associada à presença da doença DAOP ($\beta = -14.78$ e $p <0,0001$). A transferência de colesterol livre independentemente associado à concentração de HDL ($\beta = 0,076$ e $p <0,0001$) e glicemia ($\beta = 0,0163$ e $p 0,037$), mas não a presença de DAOP.

Tabela 5 - Análise de regressão linear múltipla entre transferências lipídicas para HDL, concentrações séricas de CETP e presença de diabetes mellitus.

CE%	beta	Valor de p	R ²
Constante	2.46	-	67.21
DAOP	0.17	0.583	
DM	-1.00	0.007	
CETP	0.99	<0.0001	
TG%	beta	Valor de p	R ²
Constante	3.108	-	51.62
DAOP	-0.59	0.036	
DM	0.04	0.917	
CETP	0.65	0.002	
HDL-C	0.025	0.031	
FL%	beta	Valor de p	R ²
Constante	15.15	-	99.2
DAOP	-14.78	<0.0001	
DM	0.07	0.808	
CL%	beta	Valor de p	R ²
Constante	1.1	-	62.12
DAOP	-0.71	0.091	
DM	-1.25	0.066	
HDL	0.076	<0.0001	
Glicose	0.0163	0.037	

Listadas apenas as variáveis que tiveram influência significativa para cada variável de transferência.

CE colesterol esterificado; *TG* triglicérides; *FL* fosfolípidos; *CL* colesterol livre; *beta* coeficiente de regressão linear; *R*² coeficiente de determinação; *DAOP* doença aterosclerótica obstrutiva periférica; *DM* diabetes mellitus; *CETP* proteína de transferência de colesterol esterificado; *HDL* lipoproteína de alta densidade

6 Discussão

A DAOP é manifestação clínica da aterosclerose associada com maior risco de DAC e cerebral. Entre os fatores de risco lipídicos, o aumento de LDL-C e triglicérides é menos frequente, mas o HDL-C diminuído é proeminente na DAOP. Nesse contexto, examinar aspectos funcionais da HDL, que tem ação protetora contra a aterosclerose, é muito importante para a prevenção e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para a doença. Neste estudo, foram avaliados os aspectos funcionais da HDL nos pacientes com DAOP e exploradas as diferenças quando DAOP está acompanhada de DM.

Em nosso trabalho, não houve diferença estatística entre os três grupos de estudo no tocante a sexo, idade e IMC. Essa uniformidade reforça o valor comparativo dos dados de metabolismo lipídico aqui descritos, ao excluir a influência importante sobre este metabolismo de eventuais diferenças de sexo, idade e IMC. De acordo com a literatura, o perfil dos portadores da DAOP é caracterizado por idade acima de 60 anos, sexo masculino e, na maioria das vezes, associado a fatores de risco, tais como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, DM e tabagismo. (Dua; Lee, 2016; Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes *et al.*, 2017). A casuística deste estudo reflete essas características.

Em nosso estudo, houve baixo percentual de pacientes tabagistas nos pacientes com DAOP. A maioria deles, no entanto, era de ex-fumantes, definido como sem uso de tabaco há mais de 5 anos. É possível, portanto, que o tabagismo passado tenha influenciado o desenvolvimento da DAOP (Dua; Lee, 2016; Fowkes *et al.*, 2017).

Segundo as diretrizes da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vasculiar (SBACV, 2015), as terapias genericamente aplicadas na redução global do risco cardiovascular, beneficiam os pacientes com DAOP. Anti-agregantes plaquetários e estatina são classes de fármacos de uso frequente nesses pacientes. Em nosso estudo, o ácido acetilsalicílico foi o anti-agregante plaquetário mais frequente. A estatina utilizada na maioria dos nossos pacientes foi suspensa pelo período prévio de 45 dias, para que não houvesse interferência nos resultados, visto que a estatina interfere fortemente no metabolismo lipídico, foco deste estudo.

O cilostazol foi, também, um dos fármacos mais utilizados nesse estudo, já que sua propriedade hemorreológica é preconizada no tratamento medicamentoso da claudicação intermitente nos pacientes com DAOP. (SBACV, 2015)

Em nosso estudo, os pacientes com DAOP que apresentaram associação com DM, a metformina foi o antidiabetogênico mais utilizado, bem como a losartana nos pacientes hipertensos.

Fowkes *et al.* referem que existe uma forte associação do DM com DAOP sintomática e assintomática, sendo duas vezes mais provável o desenvolvimento da doença sintomática em indivíduos com DM do que em não-diabéticos (Fowkes *et al.*, 2017).

Os diabéticos, devido ao processo de resistência à insulina, tendem a ter formas mais agressivas de DAOP que resultam na necessidade de amputação dos membros 5 a 10 vezes mais do que os não-diabéticos. (Dua; Lee, 2016; Criqui; Aboyans, 2015).

Níveis elevados de colesterol total permanecem fortemente associados à DAOP em análise multivariada na maioria dos estudos, porém a relação CT/HDL-C parece ser o marcador de risco para DAOP mais significativo (Fowkes *et al.*, 2017). Na comparação entre os três grupos envolvidos no estudo, as taxas de colesterol total não foram estatisticamente significativas.

Os níveis séricos de LDL-C, triglicérides e não-HDL-C não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de estudo. Os estudos de Van Den Berg *et al.*, 2016 e Stoekenbroek *et al.*, 2016, corroboram estes resultados. Naqueles estudos, os níveis séricos de triglicérides também não foram significativamente associados à DAOP após o ajuste para outras medidas lipídicas e a associação de DAOP com o LDL-C foi fraca (Van Den Berg *et al.*, 2016; Stoekenbroek *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, menores concentrações séricas de HDL-C foram encontradas nos pacientes com DAOP, com ou sem DM, em comparação com o grupo controle. As taxas de HDL-C foram ainda menores no subgrupo DAOP/DM quando comparados com o subgrupo DAOP/SD. A literatura, corrobora estes resultados. Menores níveis de HDL-C permaneceram associados à DAOP na análise multivariada na maioria dos estudos (Fowkes *et al.*, 2017). Há uma variedade de artigos com evidências clínicas e epidemiológicas que sustentam o conceito de que indivíduos com DM apresentam maior risco de desenvolver DAOP. Baixos níveis de HDL-C são frequentemente encontrados nesta população (Faludi, A.A. *et al.*, 2017).

À luz do conhecimento atual, HDL-C e ApoA-I elevados permanecem sendo os principais fatores ateroprotetores para o desenvolvimento da DAOP

(Criqui, *et al.*, 2005; Criqui; Aboyans, 2015; Fowkes *et al.*, 2017; Ness; Aronow; Ahn, 2000). DM está fortemente associado ao desenvolvimento da DAOP e os níveis de HDL-C e Apo A-I, nessa população, são geralmente baixos. (Fowkes *et al.*, 2017; Faludi, *et al.*, 2017; Patti *et al.*, 2019). Em nosso trabalho, menores concentrações séricas de ApoA-I foram encontradas nos pacientes com DAOP em comparação com o grupo controle, em conformidade com a literatura. A ApoA-I foi ainda mais baixa no subgrupo DAOP/DM quando comparados com o subgrupo DAOP/SD.

A HDL pode sofrer modificações em sua estrutura e composição, acarretando em alterações funcionais da partícula (Norata; Pirillo; Catapano, 2006). Foi descrito que alterações na composição e metabolismo da HDL resultando na instabilidade das partículas da lipoproteína, podem estar associadas a doenças (Kontush; Chapman, 2006). Essas alterações metabólicas levam a partícula de HDL a perder sua atividade biológica normal e adquirir propriedades pró-aterogênicas (Kontush; Chapman, 2006). Como consequência da instabilidade, a lipoproteína pode sofrer alteração em sua capacidade de receber os lipídeos constituintes. As concentrações das demais lipoproteínas plasmáticas e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico são provavelmente determinantes de alterações funcionais da HDL (Ferreti *et al.*, 2006; Norata; Pirillo; Catapano., 2006).

Dentre as alterações, destacamos a que está relacionada à troca de lipídeos entre lipoproteínas, importante mecanismo no transporte reverso de colesterol, e que foi avaliada no presente trabalho por meio da capacidade da

HDL em receber lípidos. Esse mecanismo foi analisado neste trabalho por meio da taxa de transferência dos lípidos constituintes da LDE para HDL.

Neste contexto, observamos que a transferência de ambas as formas de colesterol, não esterificado e esterificado, foi menor nos portadores de DAOP e DAOP/DM em comparação ao grupo controle. Similarmente à transferência de colesterol das células para o HDL que impede o acúmulo celular de colesterol, a transferência de colesterol das lipoproteínas contendo Apo B para HDL também pode ser protetora contra a aterogênese. (Maranhão; Freitas, 2014). Nesse sentido, a associação de menores taxas de transferência de colesterol não esterificado e esterificado para HDL com a presença de DAC precoce e em grupos de pacientes com diabetes tipo 2 com ou sem DAC foi previamente encontrada por Maranhão et al. e Sprandel et al. , utilizando o mesmo ensaio de transferência lipídica in vitro (Maranhão *et al.*, 2012; Sprandel *et al.*, 2015).

A diminuição da transferência de colesterol livre para a HDL pode diminuir o processo de esterificação de colesterol. Na fração HDL reside o grande sítio de esterificação no compartimento plasmático, porque nesta fração se encontra a LCAT e a Apo A-I, o co-fator desta enzima e principal apolipoproteínas da HDL. A diminuição da disponibilidade do substrato, já que transferência de colesterol livre para a HDL está diminuída, resulta na diminuição do produto, os ésteres de colesterol. Pode presumir-se que o colesterol livre que fica retido nas outras frações lipoproteica, onde a presença de LCAT e Apo A-I é reduzida, possa precipitar-se nos vasos sanguíneos e células circulantes no plasma. No caso da artéria, o acúmulo de colesterol pode ser estopim para fenômenos iniciais da aterogênese, dado a grande

importância do colesterol na fluidez das membranas celulares e função das proteínas de membrana (Santos *et al.*, 2003; Couto *et al.*, 2007; Maranhão; Freitas, 2014).

Como consequência do impacto da resistência à insulina sobre a ação da lipoproteína lipase e de muitas outras etapas do metabolismo lipídico (Maranhão; Freitas, 2014), a principal característica da dislipidemia do diabetes tipo 2, consiste na hipertrigliceridemia e na redução do HDL-C (Maranhão; Freitas, 2014). Neste estudo, menor HDL-C estava presente na DAOP/DM, mas níveis de triglicérides estatisticamente mais elevados não foram encontrados. Outro aspecto importante dos resultados atuais foi o achado de que a transferência *in vitro* de colesterol não esterificado e esterificado para HDL foi ainda menor em DAOP/DM que em DAOP. De fato, no estudo de Sprandel *et al.* (Sprandel *et al.*, 2015) a transferência de colesterol não esterificado e esterificado foi diminuída em pacientes com diabetes tipo 2 em comparação àqueles sem DAC. Assim, pode-se levantar a hipótese de que, se as transferências marcadamente diminuídas das duas formas de colesterol são de fato um fator de agravamento do processo de aterosclerose nas artérias periféricas.

A concentração de LCAT foi igual entre os três grupos, mas a CETP mostrou uma tendência não significativa para valores de concentração mais baixos quando DAOP e DAOP/DM foram comparados aos controles. No caso de a concentração de CETP, proteína responsável pela troca tanto de éster de colesterol quanto de triglicérides, ser de fato menor nesses grupos, isso poderia, pelo menos em parte, explicar a menor transferência de colesterol

esterificado e triglicérides observadas nos grupos DAOP quando comparados ao controle.

No que diz respeito às correlações encontradas neste trabalho, podemos destacar a correlação positiva encontrada entre as taxas de transferência de colesterol livre e as concentrações de Apo A-I e HDL-C, ou seja, quanto menores são as concentrações de Apo A-I e de HDL-C, menores são as taxas de colesterol livre recebido pela HDL. Neste caso, podemos sugerir que a menor transferência de colesterol não esterificado encontrado neste estudo, está relacionada à menor concentração da lipoproteína receptora encontrada nesses pacientes, sendo mais agravante quando apresentam a diabetes associada.

Outra correlação positiva encontrada foi entre a taxa de colesterol esterificado e as concentrações de CETP. Apesar de não ter sido significativa, a menor concentração de CETP encontrada nos portadores de DAOP pode explicar a menor transferência de colesterol esterificado para HDL encontradas nesses pacientes. De fato, menor concentração de CETP pode levar a menor passagem de colesterol das lipoproteínas doadoras para a HDL, resultando em menor % de éster de colesterol nessa fração lipoproteica. Ressalta-se que a CETP promove dois tipos de troca entre as lipoproteínas. A primeira e mais comum, é a troca de éster de colesterol por triglicérido. A segunda promove troca somente de éster de colesterol entre as lipoproteínas (Rajaram; Chan; Sawyer, 1994). Logo, a diminuição dessa taxa de transferência pode ser devida à quantidade de éster de colesterol presente nessa partícula que recebe além de triglicérides, o próprio éster de colesterol, em processo ciclo-dependente.

No tocante à análise multivariada, houve uma correlação negativa entre as taxas de transferências do fosfolípido e do triglicérido com a presença da

doença, ou seja, significa que a presença de DAOP está relacionada com a diminuição das taxas de transferências desses lípidos.

Como limitação do estudo, o pequeno tamanho amostral pode ter prejudicado o aparecimento de alguma estatisticamente diferença significativa em algum parâmetro onde se presume, por informação da literatura, que haja diferença, embora pequena, entre DAOP e normais, como é o caso do LDL-C. (Fowkes *et al.*, 2017).

Os resultados deste estudo destacam a importância de explorar a associação entre a doença e os aspectos funcionais e metabólicos do HDL. A este respeito, enquanto o HDL-C não foi diferente entre DAOP e controles, as taxas de transferência de colesterol foram menores, indicando uma possível deficiência na capacidade de promover a homeostase do pool plasmático de colesterol.

7 Conclusão

Em conclusão, a baixa transferência de colesterol não-esterificado para HDL, estimada pelo ensaio *in vitro*, apareceu como biomarcador da presença de DAOP. Foi marcante, é preciso frisar, que a taxa de transferência de colesterol não-esterificada tenha sido ainda menor nos pacientes com DAOP associada à presença de diabetes mellitus tipo 2 do que naqueles com DAOP sem diabetes. Este achado pode estar relacionado com a fisiopatologia da DAOP nos pacientes diabéticos. Nesta visão, esses pacientes, tendo fração HDL disfuncional, no caso com menor capacidade de captar colesterol não-esterificado, teria defeito em um importante mecanismo anti-aterogênico, estando assim mais predisposto a desenvolver DAOP. Portanto, nossos achados indicam a necessidade de se explorar mais intensamente a HDL e suas propriedades com vistas a aspectos preventivos e terapêuticos da DAOP e, especialmente, da DAOP acompanhada de diabetes.

8 Referências

Aboyans V, Criqui MH, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C, et al; Measurement and interpretation of the ankle-brachial index: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012; 126(24):2890-909

Assmann G, Funje H, Schmitz G. Low-density lipoproteins and hypercholesterolemia. *Drug Research*. 1989;39:996.

Baptista-Silva JCC. *Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado*. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA; 2003. [acesso em 2014 jul 08]. Disponível em: URL: <http://www.lava.med.br/livro>

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

Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R; Future Forum Editorial Board. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis, the unanswered questions. *Atherosclerosis*. 2003;168:195- 211.

Barter PJ. HDL: A recipe for longevity. *Atherosclerosis*. 2004; 5:25-29.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004;95: 764.

Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, Mckinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphism on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*. 2001; 68:1428.

Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Fisher LD, Cheung MC, Morse JS. Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease. *HATS. N Engl J Med*. 2001; 24:1583.

Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, De Palma A, Saresella M, Ferrante P, Taramelli D. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;238: 61.

Cockerill GW, Rey KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15:1987.

Collins, TC, Suarez-Almazor M, Bush RL, Petersen NJ. Gender and peripheral arterial disease. *J Am Board Fam Med.* 2006; 19(2):132-40

Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (pon1) activity. *Biochemical Pharmacology.* 2005;69:541.

Couto RD, Dallan LA, Lisboa LA, Mesquita CH, Vinagre CG, Maranhão RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. *Lipids.* 2007;42(5):411-8.

Criqui MH, Vargas V, Denenberg JO, Ho E, Allison M, Langer RD, et al. Ethnicity and peripheral arterial disease: the San Diego Population Study. *Circulation.* 2005 Oct 25;112(17):2703-7.

Criqui, MH, Aboyans V. Epidemiology of Peripheral Artery Disease. *Circ Res.*2015;116:1509-26.

Daminelli EM, Spada C, Treitinger A, Oliveira TV, Latrilha MC, Maranhão RC. Alterations in lipid transfer to high-density lipoprotein (HDL) and activity of paraoxonase-1 in HIV+ patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50: 223-7.

Dorweiler B, Neufang A, Kreitner KF, Schmiedt W, Oelert H. Magnetic resonance angiography unmasks reliable target vessels for pedal bypass grafting in patients with diabetes mellitus. *J Vasc Surg.* 2002;35(4):766-72.

Dua A, Lee CJ. .Epidemiology of Peripheral Arterial Disease and Critical Limb Ischemia .*Tech Vasc Interv Radiol.* 2016;19(2):91-5.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biolog.* 2001;21:473.

Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. 2017. *Arq Bras Cardiol.*2017;109(2Supl.1):1-76

Feitosa-Filho GS, Seydell TDEM, Feitosa AC, Maranhão RC, Ramires, JA. Lipid transfer to HDL in type-2 diabetic patients: associations with microalbuminuria, statin, and insulin. *Arq Bras Cardiol.*2009;92:94-106.

Ferreti G, Bacheti T, Negre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis.* 2006;184:1-7.

Fontaine R, Kim M, Kieny R. Surgical treatment of peripheral circulation disorders. *Helv Chir Acta.* 1954;21:499-533

Fowkes FGR, Aboyans V, Fowkes FJI, McDermott MM, Sampson UKA, Criqui MH. Peripheral artery disease: epidemiology and global perspectives. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(3):156-170

Frick MH, Elo MO, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P. Helsinki Heart Study: primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia: safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1997;317: 1237.

Gagliardi AC, Maranhão RC, Sousa HP, Schaefer EJ, Santos RD. Effects of margarines and butter consumption on lipid profiles, inflammation markers and lipid transfer to HDL particles in free-living subjects with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Nutr.* 2010 ;64(10):1141-9.

Gardner AW, Alaupovic P, Parker DE, Montgomery PS, Roof A, Casanegra AI. Apolipoprotein profiles in subjects with and without peripheral artery disease. *Vasc Med.* 2013;18(3):129-35.

Garcia LA. Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease. *J Endovasc Ther.* 2006;13(Suppl 2):II-3-9.

Garofolo L, Ferreira SRG, Miranda Junior F. Estudo dos Fatores de Risco Associados à Arteriopatia Periférica em Nipo-brasileiros de Bauru (SP). *Arq Bras Cardiol.* 2014; 102(2):143-50

Gidez LI, Miller GJ, Burstein M, Slagle S, Ede RH. A Separation and quantitation of subclasses of human plasma high density lipoproteins by a simple precipitation procedure. *J Lipid Res.* 1982;23:1206–23.

Ginsberg HN, Huang LS. The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk*. 2000;7:325-31.

Giribela AH, Melo NR, Latrilha MC, Baracat EC, Maranhão RC. HDL concentration, lipid transfer to HDL, and HDL size in normolipidemic nonobese menopausal women. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;104:117-20.

Goldeberg IJ. Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:965-71.

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

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79:8-15.

Granger CB, Califf RM, Young S: Outcome of patients with DM2 mellitus and acute myocardial infarction treated with thrombolytic agents. The Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group. *J. Am Coll Cardiol*. 1993;21:920-25.

Grundy SM. Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. *Am.J.Cardiol*. 1995;75:45-52.

Healy DA, Boyle EM, Clarke Moloney M, Hodnett PA, Scanlon T, Grace PA, Walsh SR. Contrast-enhanced magnetic resonance angiography in diabetic patients with infra-genicular peripheral arterial disease: systematic review. *Int J Surg* 2013;11(3):228-32.

Heijmans BT, Beekman M, Houwing-Duistermaat JJ, Cobain MR, Powell J, et al. Lipoprotein particle profiles mark familial and sporadic human longevity. *PLoS Med*. 2006;3:495-99.

Heslop P, Smith GD, Metcalfe C, Macleod J, Hart C. Sleep duration and mortality: The effect of short or long sleep duration on cardiovascular and all-cause mortality in working men and women. *Sleep Med*. 2002; 3:305.

Hirano T, Nohtomi K, Koba S, Muroi A, Ito Y. A simple and precise method for measuring HDL-cholesterol subfractions by a single precipitation followed by homogenous HDL-cholesterol assay. *J. Lipid Res.* 2008;49:1130–36.

Hueb W.A, Lopes NH. MASS Project- 20 years results from a thematic project. *Rev Assoc Med. Bras.* 2008;4:378-9.

Jaff MR, White CJ, Hiatt WR, Fowkes GR, Dormandy J, Razavi M, Reekers J, Norgren L. An Update on Methods for Revascularization and Expansion of the TASC Lesion Classification to Include Below-the-Knee Arteries: A Supplement to the Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II): The TASC Steering Committee. *Ann Vasc Dis.* 2015;8(4):343-57

Jens S, Koelemay MJW, Reekers JA, Bipat S. Diagnostic performance of computed tomography angiography and contrast-enhanced magnetic resonance angiography in patients with critical limb ischaemia and intermittent claudication: Systematic review and meta-analysis *Eur Radiol* 2013;23(11):3104-14

Junqueira VBC, Gomes LF. Homocysteine and vitamins: risk factors for cardiovascular disease. Disponível em: http://www.helthandage.com/html/res/controversies/content/chap4/homocysteine_ful3_es.htm.

Johnsen SH, Mathiesen EB, Fosse E, Joakimsen O, Stensland-Bugge E, Njolstad I. Elevated high-density lipoprotein cholesterol levels are protective against plaque progression a follow-up study of 1952 persons with carotid atherosclerosis the tromsø study. *Circulation.* 2005;112: 498.

Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):342-74.

Kumar Robbins and Cotran. *Pathologic Basis of Disease.* 8th ed: cidade: Saunders;2009.

Kwiterovich Jr, PO. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol.* 2000;86: 452-57.

Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clin Chim Acta*. 1999;286:145-49.

Lan Hsia S, Duncan R, Schob AH, Chakko SC, Mulingtapang R, He JL, Perez GO. Serum levels of high-density lipoprotein phospholipids correlate inversely with severity of angiographically defined coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2000;152: 469-73.

LE Goff W, Guerin M, Chapman MJ. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacol Ther*. 2004;101:17-38.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger: princípios de bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Savier; 2002.

Leiner T, Kessels AG, Schurink GW, Kitslaar PJ, de Haan MW, Tordoir JH, van Engelshoven JM. Comparison of contrast-enhanced magnetic resonance angiography and digital subtraction angiography in patients with chronic critical ischemia and tissue loss. *Invest Radiol*. 2004;39(7):435-44

Lima ES, Maanhao RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin. Chem*. 2004;50:1086-88.

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

Mackness MI, Durrington PN HDL. Its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*. 2001; 115: 243.

Makdisse M, Pereira Ada C, Brasil Dde P, Borges JL, Machado-Coelho GL, Krieger JE et al; Hearts of Brazil Study and Peripheral Arterial Disease Committee of the Brazilian Society of Cardiology/Funcor. Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in the Hearts of Brazil Project. *Arq Bras Cardiol*. 2008;91(6):370-82.

Maranhão RC, Freitas FR. HDL metabolism and atheroprotection: predictive value of lipid transfers. *Adv Clin Chem*. 2014;65:1-41.

Maranhão RC, Freitas FR, Strunz CM, Santos RD, Mansur AJ, Mansur AP. Lipid transfers to HDL are predictors of precocious clinical coronary heart disease. *Clin Chim Acta*. 2012;413(3-4):502-5.

Meijer WT, Grobbee DE, Hunink MG, Hofman A, Hoes AW. Determinants of peripheral arterial disease in the elderly: the Rotterdam study. *Arch Intern Med*. 2000;160(19):2934-8

Meyers CD, Kashyap ML. Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection. *Curre Opin. Cardiol*.2004;104:119-23.

Mota APL, Carvalho MG, Lima LM, Santos MERC, Sousa MO. Lipoproteína (a) em pacientes portadores de doença arterial obstrutiva periférica e/ou diabetes mellitus tipo 2J. *Bras Patol Med Lab*.2008;44 (2):89-85

Natarajan S, Glick H, Criqui M, Horowitz D, Lipsitz SR, Kinoshian B. Cholesterol measures to identify and treat individuals at risk for coronary heart disease. *Am J Prev Med*. 2003;25:50–57.

Ness J, Aronow WS, Ahn C. Risk factors for symptomatic peripheral arterial disease in older persons in an academic hospital-based geriatrics practice. *J Am Geriatr Soc*.2000;48:312–14.

Nicholls SJ, Tuzcu EM, Brennan DM, Tardif JC, Nissen SE. Cholesteryl ester transfer protein inhibition, high-density lipoprotein raising, and progression of coronary atherosclerosis: insights from ILLUSTRATE (Investigation of Lipid Level Management Using Coronary Ultrasound to Assess Reduction of Atherosclerosis by CETP Inhibition and HDL Elevation). *Circulation*. 2008; 118(24):2506-14

Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc*. 2006;16:371-77.

Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*. 2007;45 Suppl:S5-67

Oka T, Kujiraoka, T, Ito M, Nagano M, Ishihara M, Iwasaki T, Egashira T, Miller NE, Hattori H. Measurement of human plasma phospholipid transfer protein by sandwich ELISA. *Clin Chem*. 2000;46:1357-64.

Park SH, Park JH, Kang JS, Kang YH. Involvement of transcription factors in plasma HDL protection against TNF-alpha-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35:168.

Patti AM, Giglio RV, Papanas N, Rizzo M, Rizvi AA. Future perspectives of the pharmacological management of diabetic dyslipidemia. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2019;12(2):129-143

Price JF, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. Lipoprotein (a) and development of intermittent claudication and major cardiovascular events in men and women: the Edinburgh Artery Study. *Atherosclerosis.* 2001; 157: 241–249.

Puk CG, Bocchi EA, Lo Prete AC, Ferreira SM, Stolf NA, Maranhão RC. Transfer of cholesterol and other lipids from a lipid nanoemulsion to high-density lipoprotein in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28:1075-80.

Rader DJ. High-density lipoprotein and atherosclerosis. *Am J Cardiol.* 2002; 90 (8A): 62.

Rajaram OV, Chan RY, Sawyer WH.. Effect of unesterified cholesterol on the activity of cholesteryl ester transfer protein. *Biochem J.* 1994;304 (Pt 2):423-30.

Rashid S, Watanabe T, Sakaue T. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem,* 2003;36: 421-26.

Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50: 230-38.

Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA.* 2001;285:2481–85

Rocha MP, Maranhao RC, Seydell TM, Barcellos CRG, Bacarat EC, Hayashida SAY, Bydlowisk SP, Marcondes JA. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and transfer of lipids to high-density lipoprotein in young obese and normal weight patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2010 ;93(6):1948-56.

Rooke TW, Hirsch AT, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK, et al. American College of Cardiology Foundation; American Heart Association Task Force; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Interventional Radiology; Society for Vascular Medicine; Society for Vascular Surgery, 2011 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline). *Vasc Med.* 2011;16(6):452-76.

Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, Johnston KW, Porter JM, Ahn S. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg* 1997;26:517-38.

Santos RD, Hueb W, Oliveira AA, Ramires JA, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or without coronary artery disease. *J Lipid Res.* 2003;44(3):464-9.

Saydah SH, Eberhardt MS, Loria CM, Brancati FL. Age and the burden of death attributable to diabetes in the United States. *Am J Epidemiol.* 2002;156:714-19.

Sociedade Brasileira de Angiologia de Cirurgia Vascular.

Diretrizes. Disponível em:
<http://www.sbacv.com.br/lib/media/pdf/diretrizes/daopmmii.pdf>

Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA H, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.* [Internet]. 2007 Apr [cited 2019 Aug 26]; 88(Supl 1): 2-19. Available from: <http://www.scielo.br/>

Sprandel MC, Hueb WA, Segre A, Ramires JA, Kalil-Filho R, Maranhão RC. Alterations in lipid transfers to HDL associated with the presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 2015;14:107.

Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis. *JAMA.* 1990;264:3047.

Stoekenbroek RM, Boekholdt SM, Luben R, Hovingh GK, Zwinderman AH, Wareham NJ, et al. Heterogeneous impact of classic atherosclerotic risk factors on different arterial territories: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Eur Heart J.* 2016;37(11):880-9.

Sultan S, Tawfick W, Hynes N. Ten-year technical and clinical outcomes in TransAtlantic Inter-Society Consensus II infrainguinal C/D lesions using duplex ultrasound arterial mapping as the sole imaging modality for critical lower limb ischemia *J Vasc Surg* 2013;57(4):1038-45.

Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2002;161; 245-54.

Terry DF, Evans JC, Pencina MJ, Murabito JM, Vasan RS, Wolf PA, et al. Characteristics of Framingham offspring participants with long-lived parents. *Arch. Inter. Med.* 2007;12:438- 441.

Van den Berg MJ, van der Graaf Y, Borst GJ, Kappelle LJ, Nathoe HM, Visseren FLJ, SMART Study Group. Low-Density Lipoprotein Cholesterol, Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol, Triglycerides, and Apolipoprotein B and Cardiovascular Risk in Patients With Manifest Arterial Disease. *Am J Cardiol* 2016;118:804-10

Vitalis A, Lip GY, Kay M, Vohra RK, Shantsila A. Ethnic differences in the prevalence of peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2017;15(4):327-338.

Wang CS, Briggs MR. HDL: the metabolism, function and therapeutic importance. *Chem Rev*, 2004;04:19-123.

World Health Organization (WHO) Health topics. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>

Zhang Y, Huang J, Wang PA. Prediction Model for the Peripheral Arterial Disease Using NHANES Data. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(16):e3454.

