

ANA ELISA MARABINI MARTINELLI

**Papel dos lípides plasmáticos e fatores pró-inflamatórios na fisiopatologia
da insuficiência cardíaca.**

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

Programa de Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo

2017

ANA ELISA MARABINI MARTINELLI

**Papel dos lípides plasmáticos e fatores pró-inflamatórios na fisiopatologia
da insuficiência cardíaca.**

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

Programa de Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Martinelli, Ana Elisa Marabini

Papel dos lípidos plasmáticos e fatores pró-inflamatórios na fisiopatologia da insuficiência cardíaca / Ana Elisa Marabini Martinelli. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Cardiologia.

Orientador: Raul Cavalcante Maranhão.

Descritores: 1.Insuficiência cardíaca 2.Lipoproteínas 3.Proteínas de transferência de ésteres de colesterol 4.Peptídeo natriurético encefálico 5.Apolipoproteínas 6.Metabolismo dos lipídeos 7.Interleucinas

USP/FM/DBD-082/17

DEDICATÓRIA

A minha amada avó Sonia que sempre esteve ao meu lado e sem ela nada disso seria possível para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Raul Cavalcante Maranhão pela oportunidade única em minha carreira e orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Antonio Carlos Pereira Barretto e à sua aluna Milena Novaes Cardoso Curiati por acreditarem nesse projeto, permitirem o acesso aos pacientes de forma tão atenciosa e pela sempre presente ajuda.

À Priscila Oliveira de Carvalho pela paciência em me ajudar a entender mais de miRNAs, por me ajudar no desenvolvimento deste trabalho do início ao fim, por conversas fiadas relaxantes e por me acompanhar nessa jornada louca que é a pesquisa.

Agradeço à Fatima Rodrigues Freitas por sempre me socorrer nos momentos de dúvidas, pela amizade sincera, por acreditar e me incentivar a todo o momento e por dividir seu conhecimento não apenas comigo, mas com todos do Laboratório de Lípidos.

Aos amigos Bruna Miranda, Wander e Josefa pela ajuda durante a realização desse projeto nos ensaios e experimentos com a nanoemulsão.

Às amigas e amigos incríveis que fiz durante meu período de doutoramento no InCor: Aleksandra, Débora Deus, Andréia, Aline Derísio, Thauany, Carol Graziani, Orlando, Dalila, Natalia, Marília, Camila Inagaki, Elaine Damineli, Fernanda Gallinaro, Keilinha, Sheila, Wilson e Maria Augusta que fizeram com que eu me sentisse em casa todos os dias e contribuíram de maneira permanente na pessoa me tornei.

À Juliana e a Neusa da pós-graduação, sem as quais eu jamais conseguiria cumprir os prazos exigidos e que sempre foram solícitas e gentis em me ajudar.

Aos pacientes que de forma tão despretensiosa me ajudaram e compareceram às coletas que ocorriam bem cedinho.

À equipe do Hospital Santa Marcelina e do Hospital Auxiliar de Cotoxó por deixarem a porta sempre aberta para mim e meus colegas de trabalho.

À Sonia, minha avó e à Rosa, minha bisavó que são meus exemplos de vida, mulheres fortes e a frente do seu tempo que sempre me inspiraram.

Ao Flávio Oshiro, meu marido, companheiro e confidente que esteve presente em cada etapa e sempre foi meu maior incentivador, obrigada por ser meu porto seguro durante esse período.

Ao meu irmão Carmine Louis, à minha mãe sempre querida Ana Lúcia e à minha inseparável tia Márcia.

Aos amigos de longa data César, Gabriel, Alex e Fabio por nunca me deixarem de lado, mesmo quando precisei ficar ausente e fui péssima amiga.

À Viviane, minha cunhada, que sempre foi fã do meu trabalho e me deu uma sobrinha linda e amada nesse meio tempo.

Ao meu pai Luiz Rogério e a amiga Luciana por mostrarem o caminho de tijolinhos dourados para o doutorado.

À CAPES e a Fapesp pelo suporte financeiro imprescindível na realização desse projeto.

“A amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento, duplicando a nossa alegria e dividindo a nossa dor. A alegria de fazer o bem é a única felicidade verdadeira”.

(Leon Tolstoi & Joseph Addison)

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Feddy, Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de quadros	
Lista de abreviaturas	
Lista de siglas	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	33
3 MÉTODOS	35
3.1 Casuística	36
3.2 Ética	38
3.3 Coleta de material biológico	39
3.4 Características antropométricas e clínicas da população estudada	39
3.5 Determinações lipídicas	41
3.6 Concentrações de apolipoproteína A1 e apolipoproteína B	42
3.7 Concentração da proteína de transferência de colesterol éster	43
3.8 Concentração da enzima lecitina-colesterol aciltransferase	44
3.9 Concentração de LDL oxidada	45
3.10 Atividade de paraoxonase1	45
3.11 Ensaio de transferência de lípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL	46
3.12 Concentração de peptídeo natriurético cerebral	49
3.13 Concentrações de hormônios e citocinas inflamatórias	49
3.14 Análise da expressão de miRNAs circulantes	51
3.16 Análise estatística	55
4 RESULTADOS	57
4.1 Dados bioquímicos	58
4.2 Concentrações plasmáticas de LDL oxidada (LDLox), lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e atividade de paraoxonase 1 (PON1)	59
4.3 Transferências de lípidos para a HDL	60
4.4 Concentrações de citocinas inflamatórias	61
4.5 Análise da expressão de miRNAs circulantes	62
4.7 Análises de correlação	64
5 DISCUSSÃO	68
5.1 Limitações de estudo	77
6 CONCLUSÃO	78
7 REFERÊNCIAS	80
8 ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Metabolismo da HDL e transporte reverso do colesterol	27
Figura 2 –	Fluxograma de inclusão dos pacientes no estudo	37
Figura 3 –	Fluxograma do ensaio de transferência de lípidos para HDL	48
Figura 4 –	Figura esquemática do ensaio Milliplex [®] para dosagem de hormônios e citocinas inflamatórias	51
Figura 5 –	Expressão relativa de miRNAs	63
Figura 6 –	Correlações de BNP com apo A-I, apo B, LDLox, LCAT e transferências de lípidos para a HDL	66
Figura 7 –	Correlações de IL-6 com apo A-I, apo B, LDLox, LCAT e transferências de lípidos para a HDL	67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características antropométricas e dados clínicos dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC. 41
- Tabela 2** - Identificação dos oligonucleotídeos de miRNAs selecionados para análise de expressão por qRT-PCR através de ensaio TaqMan 53
- Tabela 3** - Dados bioquímicos dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC 58
- Tabela 4** - Concentrações plasmáticas de LDL oxidada (LDLox), lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e atividade de paraoxonase 1 (PON1) dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC. 60
- Tabela 5** - Transferência de lípidos para a HDL (%) dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC 61
- Tabela 6** - Concentrações de citocinas inflamatórias dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC. 62
- Tabela 7** - Correlações significativas da classificação funcional dos pacientes com aspectos funcionais da HDL 65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Classificação funcional da IC segundo <i>New York Heart Association</i>	23
Quadro 2 -	miRNAs envolvidos no metabolismo de lipoproteínas e suas funções	29

LISTA DE ABREVIATURAS

IC	Insuficiência cardíaca
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
NT-proBNP	Amino terminal inativo do BNP
LPS	Lipopolissacarídeos bacterianos
LBP	Proteína ligadora do LPS
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IL	Interleucina
sIL-6R	Receptor solúvel de IL-6
HDL	Lipoproteína de alta-densidade
LDL	Lipoproteína de baixa-densidade
SR-B1	Receptor “ <i>scavenger</i> ” classe B tipo I
Apo	Apolipoproteína
TRC	Transporte reverso de colesterol
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
LCAT	lecitina-colesterol aciltransferase
ABCG1	<i>ATP-binding cassette transporter G1</i>
CETP	proteína de transferência de colesterol éster
PLTP	proteína de transferência de fosfolípidos
ROS	espécies reativas oxigênio
PON-1	paraoxonase 1
PAF-AH	enzima acetil-hidrolase do fator de agregação plaquetária

HUVEC	células endoteliais de veia umbilical humana
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular-1
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
miRNA	microRNA
NYHA	New York Heart Association
InCor	Instituto do Coração
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CAPpesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LISTA DE ANEXOS

- Anexo I Dados do perfil hematológico dos pacientes
- Anexo II Termo de consentimento livre e esclarecido
- Anexo III Aprovação CAPpesq
- Anexo IV Ficha de dados dos pacientes
- Anexo V Participações em Congressos

RESUMO

Martinelli AEM. Papel dos lípides plasmáticos e fatores pró-inflamatórios na fisiopatologia da insuficiência cardíaca [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2017.

Introdução: A Organização Mundial da Saúde estimou em 2015 que 23 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de insuficiência cardíaca (IC), com taxas de mortalidade equivalentes às do câncer. Níveis mais elevados de HDL-colesterol têm sido associados com maior sobrevivência na IC. É consensual que as várias funções protetoras da HDL devem ser exploradas além da concentração de HDL-colesterol. Transferência de lípides para HDL, mediada por proteínas de transferência CETP e PLTP, é uma etapa importante no transporte reverso de colesterol e metabolismo de HDL. Desenvolvemos um ensaio *in vitro* para avaliar as transferências de lípides para a HDL, mostrando que esse fenômeno é alterado em várias condições, como na doença arterial coronária, no diabetes mellitus e pelo estilo de vida sedentário. Recentemente, tem sido descrito que a HDL transporta pequenos RNAs não codificadores de proteína, os chamados microRNAs (miRNAs). Alguns miRNAs foram descritos como reguladores críticos do metabolismo das lipoproteínas. O objetivo deste estudo foi comparar lípides plasmáticos, transferência lipídica para HDL, perfil inflamatório, miRNAs relacionados ao metabolismo de lipoproteínas obtidos de pacientes com IC e de pacientes sem IC (sem-IC). **Métodos:** Quarenta e oito pacientes com IC foram avaliados, 25 em classe funcional NYHA I e II (IC-I/II) e 23 em NYHA III e IV (IC-III/IV), bem como 50 pacientes sem-IC pareados por gênero e idade. Todos os pacientes com IC apresentavam uma fração de ejeção $\leq 40\%$. Foram determinadas as concentrações plasmáticas de CETP, LCAT, LDL oxidada (LDLox) e atividade de paraoxonase 1 (PON-1). Transferências de lípides para a HDL foi avaliada a partir da incubação de uma nanopartícula artificial com plasma total. A expressão de miRNAs circulantes envolvidos no metabolismo das lipoproteínas também foi analisada. **Resultados:** Os níveis de colesterol total, LDL e HDL e triglicérides não diferiram entre os três grupos. A concentração da apolipoproteína A-I foi menor no grupo IC-I/II em comparação ao grupo sem-IC (125 ± 23 versus 142 ± 19 ;

$p < 0,05$), enquanto que a concentração da apolipoproteína B foi menor em IC-III/IV comparado ao sem-IC (81 ± 35 versus 114 ± 40 ; $p < 0,001$). A transferência de colesterol esterificado ($5,44 \pm 1,76$ versus $6,26 \pm 0,85$), fosfolípidos ($19,05 \pm 2,5$ versus $20,21 \pm 1,45$) e de triglicérides ($6,29 \pm 2,05$ versus $7,40 \pm 1,47$) foi menor no grupo IC-III/IV do que no grupo sem-IC ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença nas transferências entre IC-I/II e sem-IC. A concentração de LDLox foi menor em ambos os grupos com IC comparados ao sem-IC ($p < 0,0001$). A massa de CETP foi menor em IC-III/IV do que em IC-I/II ($2,77 \pm 1,3$ versus $3,78 \pm 1,3$; $p = 0,021$). A concentração de LCAT e a atividade de PON-1 não foram diferentes entre os grupos. A análise da expressão dos miRNAs circulantes miR-33a, miR-144, miR-185, miR-125, miR-758, miR-26a, miR-106b, miR-122 e miR-30c, mostrou-se significativamente aumentada nos indivíduos com IC em comparação aos indivíduos sem-IC, ao passo que o miR-10b foi o único encontrado diminuído na IC comparado com indivíduos sem-IC ($p = 0,007$). **Conclusão:** Em pacientes com IC mais severa e sintomática da IC, o processo de transferência de lípidos para a HDL está deficiente, bem como alguns dos mecanismos que o regulam, e possivelmente estas alterações influenciem no transporte reverso do colesterol e nas funções protetoras da HDL desses pacientes.

Descritores: Insuficiência Cardíaca; Lipoproteínas; Proteínas de Transferência de Ésteres de Colesterol; Peptídeo Natriurético Encefálico; Apolipoproteínas; Metabolismo dos Lipídeos; Interleucinas.

ABSTRACT

Martinelli AEM. Role of plasma lipids and pro inflammatory factors in the pathophysiology of heart failure [thesis] "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2017.

Background: World Health Organization estimated that there were twenty-three million subjects worldwide suffering from heart failure (HF) in 2015, with mortality rates equivalent to those of cancer. Higher HDL-cholesterol levels have been associated with longer survival in HF. It is now consensual that the various protective functions of HDL should be explored beyond HDL-cholesterol. Transfer of lipids to HDL, mediated by transfer proteins CETP and PLTP, is an important step in reverse cholesterol transport and HDL metabolism. Previously, we developed an in vitro assay to test those lipid transfers and showed that transfer of cholesterol to HDL is altered in several conditions, such as coronary artery disease (CAD), diabetes and sedentary lifestyle. Recently, HDL transports small non-coding RNA molecule, called micro RNAs (miRNAs). Some miRNA are critical regulators of lipoprotein metabolism. The aim of this study was compare plasma lipids, lipid transfers to HDL, inflammatory profile, miRNAs related to plasma lipids from patients with HF with those from patients with without HF (non-HF). **Methods:** Forty-eight HF patients were studied, 25 with functional class NYHA I and II (HF I/II) and 23 with NYHA III and IV (HF III/IV), as well as 50 non-HF patients matched for gender, age and BMI. All HF had ejection fraction $\leq 40\%$. CETP, LCAT, oxidized LDL (oxLDL) and paraoxonase 1 (PON-1) activity were determined. Transfers of lipids from a donor artificial nanoparticle to HDL was determined by an in vitro assay in which the emulsion was incubated with whole plasma. Expression of circulating miRNAs involved in cholesterol metabolism was also analyzed. **Results:** Total, LDL and HDL cholesterol and triglycerides did not differ among the 3 groups. Apolipoprotein A-I was lower in NYHA I/II group compared to non-HF (125 ± 23 versus 142 ± 19 ; $p < 0.05$) and apo B was lower in NYHA III/IV group compared to non-HF (81 ± 35 versus 114 ± 40 , $p < 0.001$). The transfer of esterified cholesterol (5.44 ± 1.76 versus 6.26 ± 0.85), phospholipids (19.05 ± 2.5 versus 20.21 ± 1.45) and of triglycerides (6.29 ± 2.05 versus 7.40 ± 1.47) to HDL was

lower in HF-III/IV than in non-HF ($p < 0.05$), but lipid transfers were not different between HF-I/II and non-HF. oxLDL was lower in both HF groups compared to non-HF ($p < 0.0001$). CETP mass was lower in HF-III/IV than in HF-I/II (2.77 ± 1.3 versus 3.78 ± 1.3 ; $p = 0.021$). LCAT and PON-1 activity was not different among the groups. Regarding to miRNA, miR-33a, miR-144, miR-185, miR-125, miR-758, miR-26a, miR-106b, miR-122 e miR-30c were significantly increased in HF compared to non-HF subjects, whereas miR-10b was the only one found to be decreased in HF compared to non-HF subjects ($p = 0.007$). **Conclusion:** In patients with the more severe and symptomatic HF, the lipid transfer to HDL is deficient, as well as some mechanisms that regulate it, and possibly these changes influence reverse cholesterol transport and the protective functions of HDL in these patients.

Descriptors: Heart Failure; Lipoproteins; Cholesterol Ester Transfer Proteins; Natriuretic Peptide, Brain; Apolipoproteins; Lipid Metabolism; Interleukins.

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é definida como a incapacidade do coração em manter o suprimento sanguíneo adequado para atender as necessidades metabólicas tissulares, na presença de retorno venoso normal, ou fazê-lo somente com elevadas pressões de enchimento (Bocchi *et al.*, 2009). Estima-se que, atualmente, 38 milhões de pessoas sofram de IC no mundo, sendo considerada uma epidemia de âmbito mundial e um problema crescente na saúde pública (Braunwald, 2015). Segundo o Ministério da Saúde no ano de 2012, somente no Brasil, mais de 26 mil óbitos foram atribuídos a complicações da IC e das mais de 1 milhão de internações por doenças do aparelho circulatório, 21% foram decorrentes da IC.

Essa síndrome gera ônus preocupante aos cofres públicos. Levando em consideração, além do fato da grande incidência em população com idade mais avançada, o alto índice de reinternação desses pacientes. Cerca de 50% dos pacientes diagnosticados com IC são readmitidos em poucos dias após a alta hospitalar. Aliados a esses fatores, o aumento da expectativa de vida e avanços na medicina cardiovascular são os principais responsáveis por esta epidemia em progressão, uma vez que a IC é a via final comum das cardiopatias (Braunwald, 2015; Ambrosy *et al.*, 2014; Nichols *et al.*, 2013).

A avaliação clínica do paciente é essencial para definição de condutas e busca de novos alvos terapêuticos. Esta avaliação engloba o estado funcional medido pela classificação da *New York Heart Association* (NYHA) (Quadro 1), estado nutricional, a disfunção renal, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, diâmetro do ventrículo esquerdo (Abraham *et al.*, 2008; Akhter, 2004 ; Cardoso, 2015) e avaliação de marcadores bioquímicos já bem estabelecidos, como os níveis séricos do peptídeo natriurético cerebral (BNP)

ou amino terminal inativo do BNP (NT-pró BNP) (Boerrigter *et al.*, 2009; Zaya *et al.*, 2012; McKie *et al.*, 2011).

Quadro 1 – Classificação funcional da IC segundo *New York Heart Association*.

Classe I	Ausência de sintomas durante atividades cotidianas. A limitação para esforços é semelhante à esperada para indivíduos normais
Classe II	Sintomas desencadeados por atividades cotidianas
Classe III	Sintomas desencadeados por atividades menos intensas que as cotidianas ou aos pequenos esforços
Classe IV	Sintomas em repouso

FONTE: Criteria Committee, New York Heart Association, Inc. Diseases of the Heart and Blood Vessels. Nomenclature and Criteria for diagnosis, 6th edition Boston, Little, Brown and Co. 1964, p 114.

Além do modelo hemodinâmico clássico onde ocorre resposta inadequada do débito cardíaco e elevação das pressões pulmonar e venosa sistêmica, outros mecanismos estão envolvidos na fisiopatologia da IC, como por exemplo, ativação neuro-hormonal, principalmente do sistema renina-angiotensina-aldosterona, remodelamento ventricular, fatores pró trombóticos e inflamatórios e alterações na expressão gênica (Mann *et al.*, 2002; Jessup & Brozena, 2003).

Não há consenso sobre o início da ativação inflamatória na IC. Atualmente, algumas hipóteses são mais usadas para descrever esse processo: a estimulação antigênica, como as miocardites; ativação secundária

à injúria miocárdica, que pode ocorrer na isquemia do miocárdio; e a ativação secundária à exposição de endotoxinas bacterianas (El-Menyar, 2008).

Sugere-se que as endotoxinas bacterianas ou lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) entram na circulação sanguínea através de translocação em intestinos edemaciados (Genth-Zotz *et al.*, 2002). O LPS se liga à proteína ligadora do LPS (LBP) e o complexo LPS-LBP interage com o receptor *cluster of differentiation 14* (CD14) para induzir a resposta inflamatória. A correlação positiva entre os níveis de CD14 e LPS em pacientes edemaciados, decorrente de disfunção do miocárdio, tratados com diuréticos e a redução significativa dos níveis de LPS, corroboram com esta hipótese (Niebauer, 1999).

Além do aumento de CD14, sabe-se que há aumento nos níveis plasmáticos de proteína C-reativa e outras citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a endotelina 1A e B, interleucina (IL) 1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-18 e seus receptores solúveis, como o receptor solúvel de IL-6 (sIL-6R). A maioria dessas citocinas possui efeito sinérgico e têm sua síntese ativada em presença de TNF- α e LPS (Anker & Von Haehling, 2004; Radauceanu *et al.*, 2008).

Atualmente, estuda-se o mecanismo de “*down-regulation*” das lipoproteínas sobre o LPS em doenças de caráter inflamatório, onde essas partículas, em especial a lipoproteína de alta-densidade (HDL), atuam neutralizando o LPS (Rauchhaus *et al.*, 2000). O LPS se liga as lipoproteínas, formando um complexo extremamente estável e resistente a diversas ações de enzimas contidas no plasma. Dessa forma, o complexo é removido da circulação através de receptores de lipoproteína de baixa-densidade (LDL)

(LDL-R) e o receptor “*scavenger*” classe B tipo I (SR-BI) (Van Lenten *et al*, 1986).

As lipoproteínas são partículas compostas essencialmente por lípidos e proteínas. Tem como características comuns a presença de uma monocamada fosfolipídica, com a cabeça hidrofílica externamente e as caudas hidrofóbicas internamente, que concomitantemente com a presença de apolipoproteínas (apo) em sua composição, conferem a essa macromolécula, solubilidade na corrente sanguínea e transporte de colesterol

livre ou esterificado (Rader & Hobbs, 2012).

As lipoproteínas se diferem por tamanho, constituição lipídica e proteica. Quanto maior a quantidade de proteínas, menor a quantidade de lípidos e mais densa é a partícula. Por isso, essas partículas são denominadas como HDL, LDL, densidade intermediária (IDL) e muito baixa densidade (VLDL) e quilomícrons (Nelson & Cox, 2002).

Dentre as funções das lipoproteínas podemos destacar o transporte reverso do colesterol (TRC) (Figura 1), processo pelo qual a HDL é responsável pela remoção de colesterol dos tecidos periféricos, incluindo o da íntima arterial, a fim de ser excretado na bile pelo fígado.

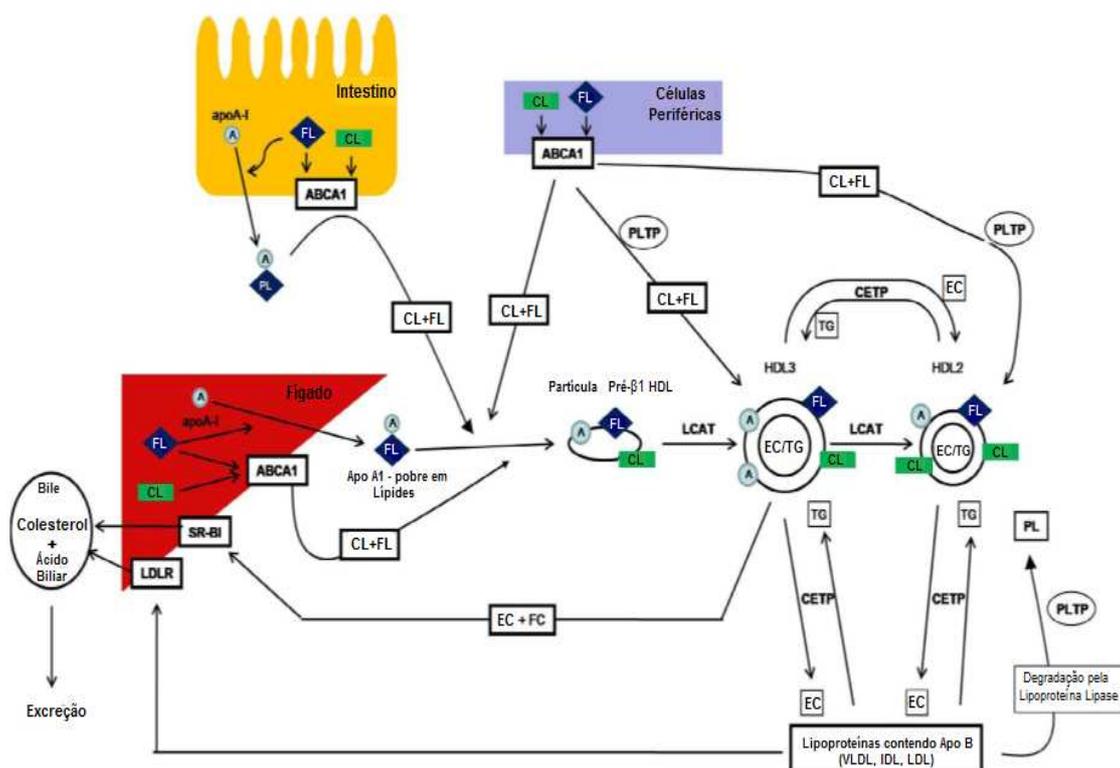
A formação da HDL tem início com a secreção de apo-AI pelo fígado e intestino (Figura 1). A apo-AI se enriquece de colesterol livre (CL) e fosfolípidos (FL) via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) presentes nos hepatócitos, formando partículas de pré-beta HDL. Estas adquirem colesterol livre e fosfolípidos da superfície de células de tecidos periféricos e de outras

lipoproteínas ricas em triglicérides, principalmente via receptor ABCA1, e se tornam HDL3 (Farbstein & Levy, 2012).

A enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), presente principalmente na HDL, e que tem como co-fator a apo-AI, esterifica o colesterol que migra para o núcleo da partícula, tornando-a esférica, partícula esta denominada HDL₂ (Savel *et al.*, 2012). A HDL₂ passa a adquirir mais lípidos da superfície celular via receptores *ATP-binding cassette transporter G1* (ABCG1) e retorna ao fígado pelo SR-BI, onde é facilmente captada pela lipase hepática (Farbstein & Levy, 2012). A HDL sofre constante remodelamento no compartimento vascular, recebendo ou doando lípidos para outras lipoproteínas através de proteínas de transferências de lípidos, denominadas proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP).

A CETP exerce importante papel no metabolismo de lípidos plasmáticos mediando a troca de triglicérides de quilomícrons, de VLDL e de LDL, por colesterol éster da HDL. A PLTP transfere fosfolípidos de quilomícrons, VLDL e LDL para a HDL (Tall, 1993).

Além do TRC, podemos destacar outras atividades essenciais da HDL, como a inibição da oxidação da LDL (Bowry *et al.*, 1992), suprimindo o acúmulo de produtos oxidados na LDL (Kontush & Chapman, 2006), e sendo capaz de se ligar a íons metálicos, potentes catalizadores da oxidação da LDL (Kunitake, 1992). A HDL também inibe a produção de espécies reativas oxigênio (ROS) (Lee *et al.*, 2005).



FONTE: Adaptado de Maranhão & Freitas, 2014.

Figura 1 – Metabolismo da HDL e Transporte Reverso do Colesterol.

Esta característica antioxidante da HDL é devida à duas enzimas antioxidante presentes nesta lipoproteína, a paraoxonase1 (PON1) e enzima acetil-hidrolase do fator de agregação plaquetária (PAF-AH) (Kontush & Chapman, 2006). A PON1 hidroliza ácidos graxos oxidados pelos fosfolípides, prevenindo o acúmulo de lípidos oxidados nas lipoproteínas, principalmente na LDL (Eckerson, 1993; Aviram *et al.*, 1998; Mackness *et al.*, 2001). A PAF-AH é uma enzima independente de cálcio, pertencente à família da fosfolipase A2 e é responsável por funções antioxidantes e anti-inflamatórias da HDL (Six & Dennis, 2000; Karasawa, 2006).

Outra atividade importante da HDL é a sua atividade anti-inflamatória, pela diminuição da expressão de moléculas de adesão, induzida por citocinas, e pela inibição à adesão de monócitos em células endoteliais (Kontush & Chapman, 2006). Em linhagens de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), a HDL inibe a expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), da E-selectina, em presença de TNF- α , IL-1 ou endotoxina (Cockerill, 1995; Calabresi *et al.*, 1997; Baker *et al.*, 1999). Além disso, a HDL atenua a produção de IL-6 em células endoteliais expostas a estímulos pró-inflamatórias, tais como, TNF- α e endotoxina (Gomaraschi *et al.*, 2005).

Uma descoberta recente a respeito da HDL foi a de que esta lipoproteína transporte microRNAs (miRNAs), que são pequenos RNAs constituídos por 19 a 25 nucleotídeos de extensão, não codificadores de proteínas. Os miRNAs modulam a expressão gênica, aumentando ou diminuindo a expressão de alguns genes associados a diversas doenças, como neoplasias (Melo & Kalluri, 2012) e doenças cardiovasculares (Tijssen *et al.*, 2012; Catalucci *et al.*, 2009). Com relação ao transporte reverso do colesterol, já foram identificados alguns miRNAs, os miR-33, miR-144, miR-758, miR-10b, miR-106b e miR-26, que estão diretamente envolvidos na modulação do efluxo de colesterol através da proteína transportadora ABCA1 (Davalos *et al.*, 2011). miR-125a e miR-185 regulam principalmente a expressão de SR-BI miR-122 e miR-30c regulam níveis plasmáticos de LDL-c (Goedeke *et al.*, 2016). Todos esses miRNAs envolvidos direta ou indiretamente no TRC foram selecionados para o presente estudo e estão descritos mais detalhadamente no Quadro 2.

Quadro 2 – MiRNAs envolvidos no metabolismo de lipoproteínas e suas funções, selecionados para o estudo.

MicroRNA	Genes alvos	Tipo celular, tecido	Função	Referências
miR-33a	ABCA1, ABCG1, ABCB11, CYP7A1, ATP8B1, entre outros.	Macrófagos, células endoteliais e células hepáticas.	Regulação da homeostase do colesterol por afetar a biogênese da HDL (via ABCA1), pelo efluxo do colesterol celular dos tecidos periféricos (via ABCA1 e ABCG1), pela síntese (via CYP7A1) e secreção de ácido biliar (via ATP8B1 e ABCB11). Sua expressão aumentada inibe a síntese proteica de ABCA1, reduzindo o efluxo de colesterol pela apo A-I e diminuindo os níveis plasmáticos do colesterol-HDL. Afeta também o metabolismo de ácidos graxos e sinalização insulínica.	Marquart <i>et al.</i> , 2010 Najafi-Shoushtari <i>et al.</i> , 2010 Rayner <i>et al.</i> , 2010 Davalos <i>et al.</i> , 2011 Allen <i>et al.</i> , 2012 Li <i>et al.</i> , 2013 Horie <i>et al.</i> , 2010 Gerin <i>et al.</i> , 2010
miR-144	ABCA1.	Macrófagos, células endoteliais e células hepáticas.	Sua expressão aumentada inibe a síntese proteica de ABCA1, reduzindo o efluxo de colesterol para apo A-I e diminuindo os níveis plasmáticos do HDL-c. Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> utilizando o silenciamento desse miRNA, observam resultados inversos.	Ramirez <i>et al.</i> , 2013 Aguiar Vallim <i>et al.</i> , 2013 Hu <i>et al.</i> , 2014
miR-758	ABCA1, SLC38A1, entre outros.	Macrófagos, células hepáticas e astrócitos.	Regulação do efluxo de colesterol para apo A-I, mas não para a HDL. Regulação de importantes proteínas envolvidas na função neurológica.	Ramirez <i>et al.</i> , 2011
miR-10b	ABCA1, ABCG1.	Macrófagos. Intestino.	Inibe as sínteses de ABCA1 e ABCG1. O ácido protocatecuico (PCA), um metabólito encontrado na microbiota intestinal, é conhecido pelo seu efeito antiaterogênico, possivelmente por agir via dependente da expressão do miR-10b. O PCA aumenta o efluxo de colesterol do macrófago através da inibição do miR-10b.	Tremaroli & Backhed, 2012 Wang <i>et al.</i> , 2012
miR-106b	ABCA1, APP.	Células hepáticas. Cérebro.	Reduz o efluxo de colesterol para a apo A-I, tanto em condições basais como sob estímulo do LXR. Regulação da função neurológica. A inibição do miR-106b pode levar ao aumento da produção das proteínas precursoras amilóides (APP).	Kim <i>et al.</i> , 2012 Bartel, 2009

miR-26a	ABCA1, ARL7.	Macrófagos.	Regulação do efluxo de colesterol dependente de LXR. A ativação do LXR resulta no aumento da expressão de ABCA1 e do fator de ribosilação de ADP-7 (ARL7). Sob condição de excesso de colesterol intracelular, o LXR é ativado, levando à expressão de genes-chave envolvidos no efluxo de colesterol, e ainda, reduzindo a expressão de miR-26a, que, por sua vez, inibe a expressão desses genes.	Sun <i>et al.</i> , 2012
miR-125a	SR-BI.	Células hepáticas.	Sua expressão aumentada diminui a expressão de SR-BI.	Goedeke <i>et al.</i> , 2014
miR-185	SREBP2, LDLR, SR-BI.	Células hepáticas.	Inibição da biossíntese “de novo” colesterol e captação da LDL. Sua expressão aumentada resulta na diminuição da atividade da HMGCR e da internalização da LDL. Sua expressão aumentada inibe a expressão de SR-BI.	Goedeke <i>et al.</i> , 2016 Goedeke <i>et al.</i> , 2014 Yang <i>et al.</i> , 2014 Wang <i>et al.</i> , 2013
miR-122	?	Células hepáticas. Altamente abundante no fígado.	Afeta o metabolismo de lipoproteínas ricas em apo B. Diminui os níveis plasmáticos de LDL-c e de triglicérides, controlando a secreção de VLDL e biossíntese de colesterol.	Goedeke <i>et al.</i> , 2016 Goedeke <i>et al.</i> , 2014
miR-30c	MTP.	Coração, músculo esquelético e rim.	Afeta o metabolismo de lipoproteínas ricas em apo B, por regular a expressão da proteína de transferência de triglicérides microsomal (MTP). Sua expressão aumentada inibe a síntese de MTP.	Goedeke <i>et al.</i> , 2016 Soh <i>et al.</i> , 2013

Do Inglês: ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1; ABCG1: ATP-binding cassette sub-family G member 1; ABCB11: ATP-binding cassette, sub-family B member 11; CYP7A1: cholesterol 7-alpha-monooxygenase A1; ATP8B1: ATPase Phospholipid Transporting 8B1; SLC38A1: Sodium-coupled neutral amino acid transporter 1; SR-BI: scavenger receptor class B type I; PCA: Protocatechuic acid; APP: Amyloid Precursor Protein; LXR: liver X receptor; ARL7: ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7; SREBP2: Sterol regulatory element-binding protein 2; LDLR: low-density lipoprotein receptor; MTP: Microsomal triglyceride transfer protein.

Estudos já demonstraram que a partícula de HDL é transportadora de miRNAs endógenos e que, em indivíduos com hipercolesterolemia familiar apresentam diferença na quantificação de miRNAs circulantes comparados a indivíduos saudáveis, sugerindo assim, que a partícula de HDL possa participar como meio de comunicação intercelular e atuar na regulação gênica (Vickers *et al.*, 2011). Em estudos em primatas e ratos a terapia anti-miRNA, ou seja, a inibição desses miRNAs, tem mostrado que há aumento do efluxo do colesterol, do transporte reverso do colesterol, o que reduz as patologias associadas às dislipidemias (Dávalos & Fernández-Hernandez, 2013).

Tendo em vista a complexidade da via metabólica da HDL e sua ação abrangente, cada vez mais está sendo assinalado que não somente a concentração de HDL-c, mas também seus aspectos funcionais e metabólicos devem ser mensurados para melhor se aquilatar a importância da ação antiaterogênica e reparadora da HDL nas várias situações clínicas.

Recentemente, uma nova metodologia *in vitro* foi desenvolvida no Laboratório de Metabolismo e Lípidos do Instituto do Coração (InCor-HCFMUSP) para avaliar simultaneamente as transferências para a HDL dos quatro principais lípidos da circulação, colesterol éster, fosfolípidos, triglicérides e o colesterol livre. Nesse ensaio, uma nanopartícula artificial é usada como doadora de lípidos. Após incubação da nanopartícula radioativa com o plasma, a HDL é separada no sobrenadante após precipitação química das outras lipoproteínas e da nanopartícula artificial. A transferência dos quatro lípidos da nanopartícula para a fração HDL é medida quantificando-se a radioatividade no sobrenadante após a incubação (Lo Prete *et al.*, 2009).

Com esta abordagem, verificou-se que pacientes com doença arterial coronária (DAC) apresentaram transferência diminuída para a HDL de colesterol livre (Maranhão *et al.*, 2012). Outro estudo mostrou diminuição da transferência de colesterol livre em pacientes submetidos a transplante cardíaco, onde há prevalência de doença coronária de evolução rápida, denominada doença coronária do coração transplantado (Puk *et al.*, 2009). Posteriormente, foi observado que a diminuição da transferência do colesterol livre é marcadora da presença de DAC em pacientes com diabetes tipo 2 (Sprandel *et al.*, 2015).

Considerando que a IC é uma doença com características inflamatórias e a relação entre a inflamação e o metabolismo plasmático dos lípidos, principalmente no que diz respeito ao papel da HDL na IC têm sido ainda pouco investigada, é de crucial importância avaliar as relações entre a inflamação, o metabolismo plasmático dos lípidos, incluindo a transferência de lípidos para a HDL e a expressão de miRNAs relacionados ao transporte reverso do colesterol.

2. OBJETIVOS

No presente estudo o objetivo foi avaliar na IC crônica:

- Transferência de lípidos para a HDL;
- Níveis de lípidos plasmáticos e apolipoproteínas;
- Concentrações plasmáticas de LDL oxidada (LDLox), lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e atividade de paraoxonase 1 (PON1);
- Expressão de miRNAs circulantes envolvidos no transporte reverso do colesterol;
- Correlação entre aspectos funcionais da HDL com fatores inflamatórios preditivos de diagnóstico na IC.

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Os pacientes incluídos no presente estudo foram selecionados em três instituições: Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Incor – HCFMUSP), Hospital Auxiliar de Cotoxó do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Hospital Santa Marcelina. Quarenta e oito pacientes com IC sistólica ou diastólica compensada e com fração de ejeção $\leq 40\%$, confirmada por ecocardiografia, foram divididos em dois grupos de acordo com a classe funcional NYHA no momento da coleta de material biológico: o primeiro grupo constituiu-se de 25 pacientes em classe funcional I e II (grupo IC I/II); o segundo grupo constituiu-se de 23 pacientes em classe funcional III e IV (grupo IC III/IV). O grupo controle foi constituído de 50 pacientes provenientes do ambulatório de dor torácica do Hospital Santa Marcelina (grupo Sem IC). Os três grupos foram pareados por idade e gênero. Esta divisão dos pacientes em cada grupo de estudo que está indicada na Figura 2.

Os pacientes incluídos nesse estudo apresentavam valores dentro da normalidade dos seguintes parâmetros: creatinina, sódio, potássio, hemoglobina, hematócrito e contagem de plaquetas (Anexo I).

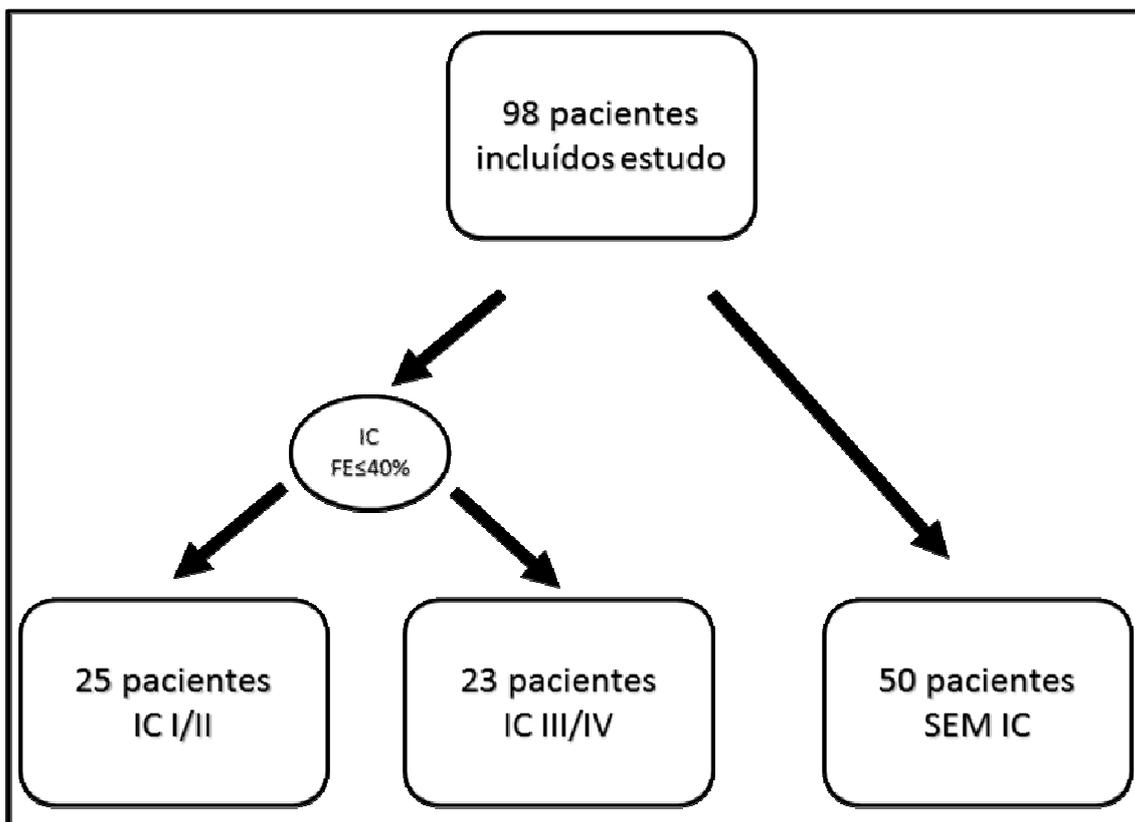


Figura 2 – Fluxograma de inclusão dos pacientes no estudo.

IC: insuficiência cardíaca; FE: fração de ejeção

Houve a suspensão de medicamentos hipolipemiantes 30 dias antes da coleta, devidamente autorizada por médico responsável.

Foram excluídos do estudo, pacientes que apresentavam as seguintes condições:

- Doença de Chagas;
- Neoplasias;
- Presença de caquexia e/ou anorexia importante;
- Doenças com processos infiltrativos;

- Insuficiência renal (*clearance* de creatinina menor que 30 mL/min);
- Insuficiência hepática;
- Disfunção da tireoide;
- Cirurgia recente (procedimento moderado à altamente invasivo);
- Doenças crônico-degenerativas;
- Diabetes mellitus dependente de insulina;
- Etilismo;
- Atividade física vigorosa 48 horas antes da coleta.

3.2 Ética

Os pacientes foram informados sobre o objetivo do estudo, procedimentos e duração da pesquisa. Após todos os esclarecimentos, voluntariamente, eles assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo II) aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) sob o número 9194/12 (Anexo III).

3.3 Coleta de material biológico

Todos os indivíduos que preencheram o TCLE foram agendados para coleta de material biológico e orientados sobre a necessidade de jejum de 12 horas e sobre a obtenção de dados antropométricos. As coletas de sangue foram realizadas no período da manhã no Incor ou no Hospital Santa Marcelina por profissional habilitado. Quatro tubos de plasma contendo EDTA e 2 tubos de soro de cada paciente eram coletados, além de pesagem, medição de estatura e de circunferência abdominal, aferição da pressão arterial e da frequência cardíaca.

O sangue total obtido foi trazido em embalagem térmica protegida da luz para o Laboratório de Metabolismo e Lípidos (Incor-HCFMUSP), onde foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. O plasma e soro obtidos foram separados em alíquotas e imediatamente armazenados em freezer -80°C.

3.4 Características antropométricas e clínicas da população estudada

Na população do estudo, houve a predominância do gênero masculino em mais de 50% dos pacientes, assim como a predominância de uma população

com idade superior a 60 anos em todos os grupos de estudo, tornando-os homogêneos para análises subsequentes (Tabela 1).

Como esperado a concentração de BNP aumenta gradativamente à medida que a classe funcional se agrava. As concentrações de BNP estava maior nos grupos IC I/II ($p < 0,001$) e IC III/IV ($p < 0,001$) comparadas ao grupo Sem IC e, maiores no grupo IC III/IV quando comparada as concentrações do grupo IC I/II ($p < 0,001$), o que confirma um déficit na função miocárdica nos pacientes com IC (Tabela 1).

Dentre as características antropométricas, a circunferência abdominal foi menor nos grupos IC III/IV e IC I/II comparada ao grupo Sem IC ($p < 0,001$). O índice de massa corporal (IMC) foi menor no grupo IC III/IV quando comparado aos grupos IC I/II ($p = 0,009$) e Sem IC ($p = 0,017$) (Tabela 1). Vale ressaltar que a média de IMC dos grupos IC I/II e Sem IC é considerada como excesso de peso e o grupo IC III/IV tem IMC no limite do considerado saudável segundo a Diretriz Brasileira de Obesidade.

O grupo Sem IC apresentou maior número de pacientes com diagnóstico de doença arterial coronária (DAC) comparado aos grupos IC I/II e IC III/IV ($p < 0,001$). O número de pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio (IAM) é maior no grupo IC I/II quando comparado ao grupo Sem IC ($p = 0,006$). O número de pacientes com diabetes mellitus (DM) não diferiu entre os grupos, assim como não houve diferença entre os grupos com relação à média de frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica (Tabela 1).

Tabela 1: Características antropométricas e dados clínicos dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC.

	Sem IC (n=50)	IC I/II (n=26)	IC III/IV (n=23)	<i>p</i>
Gênero masculino (%) [†]	33 (66)	16 (61)	13 (56)	0,672
Idade	64±8	63±12	66±11	0,544
BNP (pg/ml) [†]	56±24	265±77 ^{***}	1066±621 ^{***##}	<0,001
Frequência cardíaca (bpm) [†]	65±9	68±14	68±8	0,222
Pressão diastólica (mm/hg)	76±12	77±12	74±19	0,826
Pressão sistólica (mm/hg)	142±31	123±25	118±28	0,076
Circunferência abdominal (cm)	100±12	98±14 ^{***}	97±14 ^{***}	<0,001
IMC (kg/m ²)	28±4,3	27,8±5,1	24,9±3,7 ^{##}	0,017
DAC (%) [†]	46 (92)	15 (58) ^{***}	7 (30) ^{***}	<0,001
IAM (%) [†]	4 (8)	10 (38) ^{**}	4 (17)	0,006
DM (%) [†]	10 (20)	7 (27)	4 (17)	0,701

Dados expressos pela média ± desvio padrão. IC: Insuficiência Cardíaca; IMC: índice de massa corporal; DAC: Doença Arterial Coronária; IAM: Infarto Agudo do Miocárdio; DM: Diabetes Mellitus [†]: teste de Kruskal-Wallis; ^{**} *p*<0,01 versus Sem IC; ^{***} *p*<0,001 versus Sem IC; [#] *p*<0,05 versus IC I/II; ^{##} *p*<0,01 versus IC I/II.

3.5 Determinações lipídicas

Vinte e nove pacientes eram acompanhados diariamente nas instituições participantes e apresentavam dados de perfil lipídico da mesma semana da coleta de sangue em seus prontuários. Sessenta e nove pacientes não

apresentavam tais dados, sendo o perfil lipídico determinado no Laboratório de Metabolismo e Lípidos.

Para a determinação do colesterol total e triglicérides foi utilizado o método colorimétrico enzimático por kit disponível comercialmente, segundo instruções do fabricante (Merck S.A. Indústrias Químicas, Brasil). O mesmo método foi utilizado para determinar HDL-c, após precipitação química das lipoproteínas que apresentam apo-B. Foram determinados os valores de LDL-colesterol (LDL-c) através da fórmula de Friedewald (Friedewald *et al*, 1972), os valores de VLDL-colesterol (VLDL-c) dividindo os resultados de triglicérides por 5 e os valores de não-HDL-c pela diferença do colesterol total e HDL-c.

Dessa maneira, tem-se:

$$\text{LDL-c} = [\text{colesterol total} - (\text{HDL-c} + \text{VLDL-c})]$$

$$\text{VLDL-c} = \text{triglicérides}/5$$

$$\text{Não-HDL} = \text{colesterol total} - \text{HDL-c}$$

3.6 Concentrações da apolipoproteína A-I e da apolipoproteína B

As determinações plasmáticas das apo A-I e apo B foram realizadas no Laboratório do Instituto Central – HCFMUSP, após cadastro do projeto de pesquisa aprovado pelo comitê de ética. O ensaio foi realizado por método

turbidimétrico por kit disponível comercialmente (Roche Diagnostics, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante.

3.7 Concentração da proteína de transferência de éster de colesterol

A concentração da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) foi determinada através de imunoenensaio (Alpco Immunoassays, EUA). Esta técnica utiliza uma placa onde os poços do teste são revestidos com anticorpo monoclonal anti-CETP, que se liga com CETP da amostra. Após a primeira etapa e lavagens subsequentes para remover todo o material não ligado, foi adicionada a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) marcado com anti-CETP. Após a segunda etapa e lavagens subsequentes a placa foi incubada com uma solução de substrato e, em seguida, com um reagente de parada. A intensidade da cor da reação enzimática foi lida em leitor de microplacas “Multilabel Reader Victor TMX3” (PerkinElmer, EUA). A absorbância obtida é correspondente à concentração de CETP presente na amostra e os valores foram apresentados em µg/mL.

3.8 Concentração da enzima lecitina-colesterol aciltransferase

A concentração da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) foi determinada através do ensaio Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) TWO-STEPS (Alpco Immunoassays, EUA). Esta técnica utiliza uma placa onde os poços do teste são revestidos com anticorpo monoclonal anti-LCAT, que se liga com LCAT da amostra. Após a primeira etapa e lavagens subsequentes para remover todo o material não ligado, foi adicionada a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) marcada com anti-LCAT. Após a segunda etapa e lavagens subsequentes, o complexo anticorpo/LCAT/enzima foi incubado com uma solução de substrato e em seguida com o reagente de parada. A intensidade da cor que se desenvolve na reação enzimática foi lida em leitor de microplacas “Multilabel Reader Victor TMX3” (PerkinElmer, EUA). A absorbância obtida é correspondente à concentração de LCAT presente na amostra e os valores foram apresentados em $\mu\text{g/mL}$.

3.9 Concentração de LDL oxidada

A determinação da concentração plasmática de LDL oxidada (LDLox) foi realizada através de kit disponível comercialmente (Mercodia Oxidized LDL Competitive ELISA, Suécia), segundo instruções do fabricante. Trata-se de um ensaio ELISA, baseado no uso de um anticorpo monoclonal anti-apo B100 oxidada que reage com LDLox da amostra. A reação colorimétrica foi lida em comprimento de onda de 450nm em um leitor de microplacas “Multilabel Reader Victor TMX3” (PerkinElmer, EUA), e os valores obtidos foram apresentados em mU/L.

3.10 Atividade de paraoxonase1

A atividade de paraoxonase (PON1) foi medida pela adição de 500µL de tampão Tris-HCl 0,1M e pH 8,05, contendo 2mmol/L de CaCl₂ e 1,1mmol/L de paraoxon (Sigma–Aldrich, EUA) a 25µL de soro de cada paciente em tubos separados. Em seguida, foram pipetados 200µL da mistura (tampão + soro), em placa de 96 poços fundo chato, em duplicata. A leitura foi feita em leitor de

microplacas “Multilabel Reader Victor TMX3” (PerkinElmer, EUA) em comprimento de onda de 405nm e temperatura de 37°C.

Para o cálculo da atividade, foram feitas 6 leituras em intervalos de um minuto cada. O resultado foi obtido multiplicando-se a média da variação das absorbâncias pelo fator (fator=1163,43nMol/mL-1) descrito por Senti e colaboradores (2003) e Agachaman e colaboradores (2004).

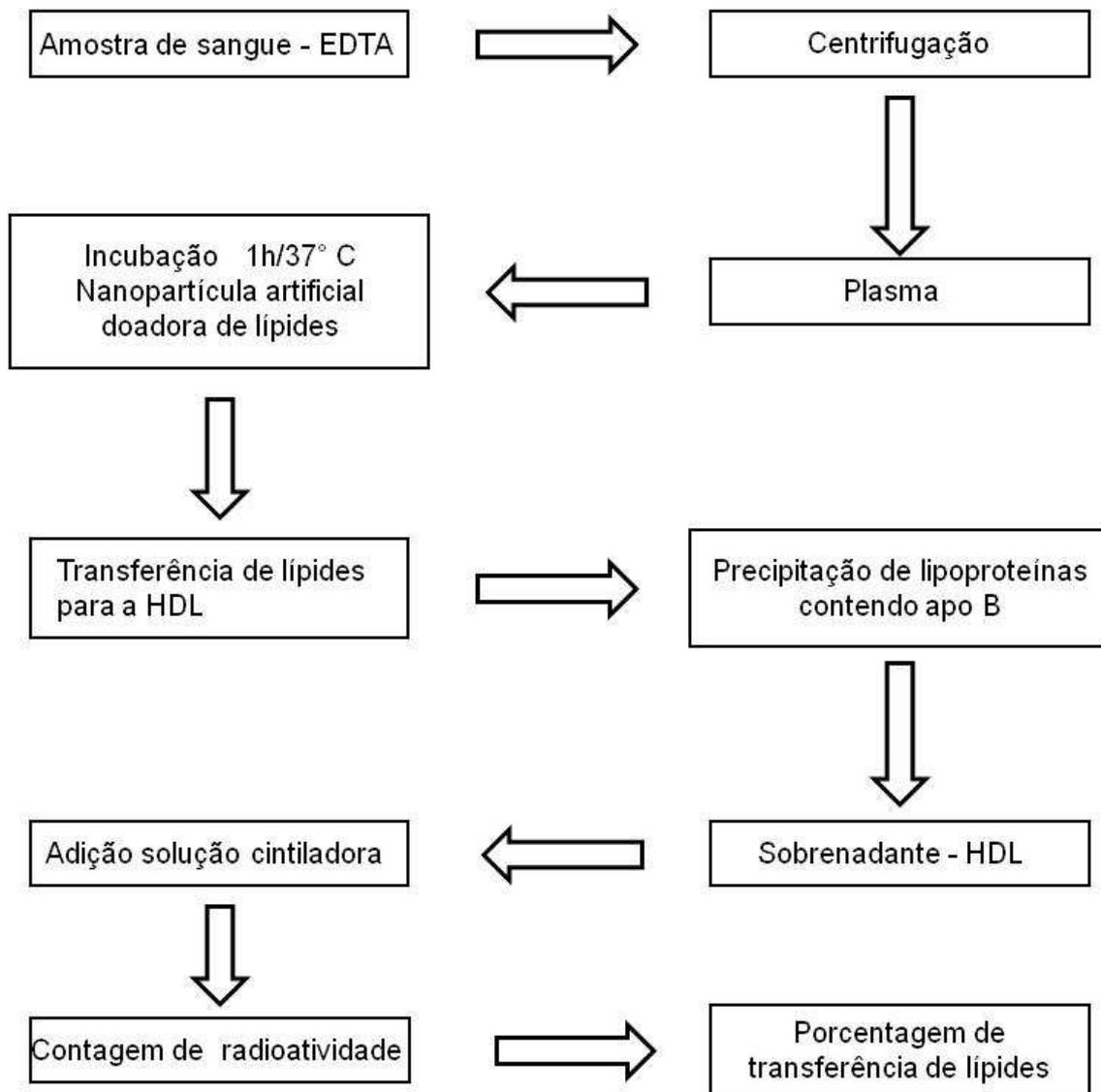
3.11 Ensaio de transferência de lípidos de uma nanopartícula lipídica artificial para HDL

A nanoemulsão lipídica artificial (LDE) foi preparada segundo a técnica modificada por Maranhão e colaboradores (1993). Em um frasco foram pipetados 40mg de fosfatidilcolina, 20mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5mg de colesterol. Posteriormente, são adicionados à mistura de lípidos os lípidos marcados radioativamente: 3H-oleato de colesterol e 14C-fosfatidilcolina ou 3H-trioleína e 14C-colesterol. Após a adição de 10mL de tampão tris-HCl 0,01M, pH 8,0, a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultra-sônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, Brasil) potência 125 watts, durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55°C.

A solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (Optima™ XL100K Ultracentrifuge, rotor SW-41, Beckman, EUA). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da ultracentrifugação a 200.000 x g por 30 minutos, a 4°C, é removido por aspiração (1mL) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para 1,21g/mL. Após a segunda ultracentrifugação (200.000 x g por 2 horas a 4°C), a LDE foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1.000 volumes de tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,0. Finalmente, a emulsão é então esterilizada por filtração em membrana Milipore de 0,22µm de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até 15 dias.

Uma alíquota de 200µL de plasma dos participantes foi incubada com 50µL da nanopartícula marcada com os lípidos radioativos (14C-éster de colesterol, 14C-fosfolípidos, 3H- triglicérides e 14C-colesterol), a 37°C, sob agitação, durante 1 hora. Após esse procedimento, foram adicionados 250µL de reagente precipitante (0,2% dextran/0,3mol/L MgCl₂) seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos a 3.000 rpm. O infranadante, contendo a LDE e as lipoproteínas plasmáticas que contém apo-B, foi desprezado. O sobrenadante, contendo a HDL, foi submetido à contagem da radioatividade em contador beta (Liquid Scintillation Analyzer-TRI-CARB2100TR, PerkinElmer, EUA), que corresponde à transferência dos lípidos radioativos da LDE para a HDL do indivíduo.

Foi calculada a percentagem de transferência de cada um dos lípidos radioativos, considerando como 100% a radioatividade total utilizada na incubação (Figura 3).



FONTE: Adaptado de LoPrette *et al.*, 2009.

Figura 3 – Fluxograma do ensaio de transferência de lípidos para HDL.

3.12 Concentração de peptídeo natriurético cerebral

A concentração (BNP) foi determinada através de imunoensaio (Abcam Inc., Reino Unido). Esta técnica utiliza uma placa onde os poços do teste são revestidos com anticorpo monoclonal anti-BNP, que se liga com BNP da amostra. Após a primeira etapa e lavagens subsequentes para remover todo o material não ligado, foi adicionada a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) marcada com anti-BNP. Após a segunda etapa e lavagens subsequentes a placa foi incubada com uma solução de substrato e em seguida com um reagente de parada. A intensidade da cor que se desenvolve na reação enzimática foi lida em leitor de microplacas Multilabel Reader Victor TMX3 (PerkinElmer, EUA). A absorbância obtida é correspondente à concentração de BNP presente na amostra e os valores foram apresentados em µg/mL.

3.13 Concentrações de hormônios e citocinas inflamatórias

O ensaio para dosagem sérica de IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF-a, insulina e leptina foi realizado através de kit comercial *Milliplex® MAP Human Adipokine Panel*, que utiliza a tecnologia Luminex® xMAP®, da EMD Millipore (Merck Millipore Co., Alemanha). Este ensaio envolve um processo que cora

internamente microesferas de poliestireno (beads) com dois corantes fluorescentes (incubação de 16 horas a 4°C sob agitação). Através de concentrações precisas desses corantes, podem ser criados 100 conjuntos coloridos distintos de esferas, sendo cada um deles revestido com um anticorpo de captura específico.

Após o analito de uma amostra ser capturado pelas esferas, ocorre uma detecção biotinizada do anticorpo, durante uma incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A reação de mistura é, em seguida, incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina (molécula *reporter* que emite um sinal fluorescente), para completar a reação na superfície de cada microesfera. As microesferas passam rapidamente através de um laser que excita os corantes internos, marcando um conjunto de microesferas. Um segundo laser excita o corante fluorescente, na molécula *reporter*.

Finalmente, processadores digitais de alta velocidade de sinais identificam cada microesfera individualmente (o código de cor específico para o ensaio) e os resultados do bio-ensaio baseados em sinais *reporter* fluorescentes podem ser assim quantificados (Figura 4). A leitura da reação foi feita em leitor de microplacas com software de análise específico para este tipo de leitura, o Luminex 100/200TM System (Luminex, Texas, EUA), do Laboratório de Investigação Médica (LIM 17) da Fisiopatologia da Inflamação da FMUSP.

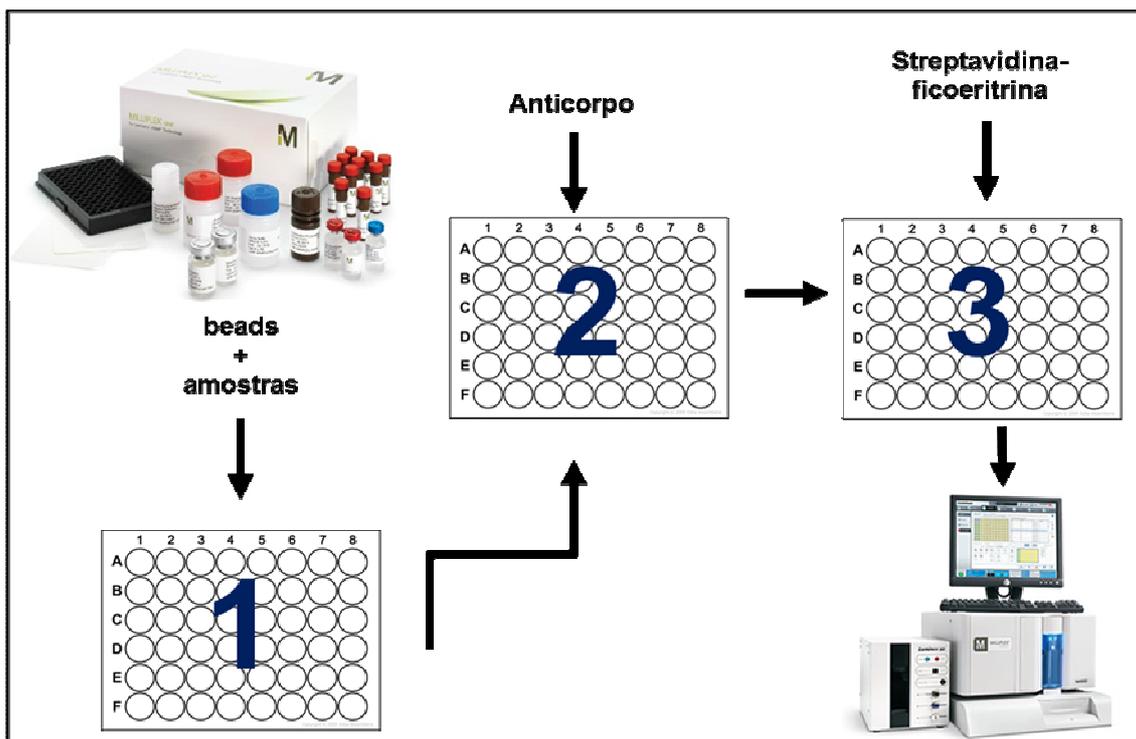


Figura 4 – Figura esquemática do ensaio Milliplex® para dosagem de hormônios e citocinas inflamatórias

3.14 Análise da expressão de miRNAs circulantes por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para a análise dos miRNAs circulantes, foram selecionadas uma parte da casuística, 30 pacientes: 10 Sem IC e 20 com IC, sendo 12 com IC I/II e 8 com IC III/IV.

A extração de RNA total, incluindo a extração de miRNAs, foi iniciada adicionando-se 1ml de Qiazol (Qiagen, EUA) para 200ul de plasma de cada amostra. As amostras foram homogeneizadas e ficaram sob a bancada por 5

minutos. Em seguida foram adicionados 5ul de um “pool” formado por 3sequências de oligonucleotídeos de miRNAs do organismo *Caenorhabditis elegans* sintetizados pela Sigma-Aldrich (EUA) na concentração final de 5 pmol/ul, para a normalização da variação das amostras durante a extração e controle da reação de qRT-PCR, conforme descrito por Mitchell e colaboradores (2008).

Os miRNAs selecionados para o estudo sintetizados pela Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc. EUA) e suas respectivas sequências de oligonucleotídeos e identificação encontram-se na Tabela 2.

O procedimento da extração se seguiu de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial MiRNeasySerum/Plasma (Qiagen, EUA).

Após a extração, foi realizada a reação de transcrição reversa específica para cada miRNA a ser estudado. Foi feito um “pool” com todos os *primers RT* (5x) dos 10 miRNAs alvos mais os 3 controles exógenos (*C. elegans*), em uma concentração final de 0,5x. A enzima responsável pela transcrição reversa foi a *Multiscribe Reverse Transcriptase* do kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems byThermo Fisher Scientific Inc., EUA) e foi seguido o protocolo segundo instruções do fabricante.

Em seguida, as amostras de cDNA foram submetidas a uma reação de pré-amplificação para uma melhor emissão de sinal durante a reação de qRT-PCR. Também foi preparado um “pool” com todos os *primers TM* (TaqMan microRNA Assay, 20x) dos mesmos miRNAs transcritos pela reação anterior, em uma concentração final de 0,2x, e foi seguido o protocolo segundo instruções do fabricante do kit *Taqman Pre-Amp Master Mix (2x)* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). No final da reação com 25ul

de produto, foram adicionados 175ul de tampão TE 0,1x (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) para diluição das amostras, resultando em um volume final de 200ul.

Tabela 2: Identificação dos oligonucleotídeos de miRNAs selecionados para análise de expressão por qRT-PCR através de ensaio TaqMan

miRNA	Identificação do ensaio TaqMan (AB)	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3') miRNAs maduros
hsa-miR-33a	002135	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA
hsa-miR-16	000391	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
hsa-miR-26a-1	002443	CCUAUUCUUGGUUACUUGCACG
hsa-miR-758	001990	UUUGUGACCUGGUCCACUAACC
hsa-miR-10b	002218	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
hsa-miR-106b	000442	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU
hsa-miR-122	002245	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
hsa-miR-30c	000419	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC
hsa-miR-185	002271	UGGAGAGAAAGGCAGUUCCUGA
hsa-miR-144	002676	UACAGUAUAGAUGAUGUACU
hsa-miR-125a	002198	UCCUGAGACCCUUUAACCGUGA
cel-miR-39	000200	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
cel-miR-238	000248	UUUGUACUCCGAUGCCAUUCAGA
cel-miR-54	001361	UACCCGUAAUCUUCAUAAUCCGAG
cel-miR-39*		UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
cel-miR-238*		UUUGUACUCCGAUGCCAUUCAGA
cel-miR-54*		UACCCGUAAUCUUCAUAAUCCGAG

AB – Applied Biosystems; * Sigma-Aldrich; miRNA – microRNA; hsa – *Homo sapiens*; cel – *Caenorhabditis elegans*

Por fim, as amostras de cDNA pré-amplificadas e diluídas foram submetidas a reação de qRT-PCR, em duplicata, sob as condições padrão de termociclagem do equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) onde, os 10ul de volume final de reação, 5,0ul foram do reagente *TaqMan Universal PCR Master Mix II no UNG 2x* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), 0,5ul

do *TaqMan MicroRNA Assay 20x* (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), 0,5ul da amostra e 4,0ul de H₂O ultrapura para completar o volume.

Para a quantificação dos miRNAs foi utilizado o método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen, 2001). Este método é um modelo matemático que calcula as alterações na expressão de genes como diferenças relativas entre uma amostra experimental e calibrador. A normalização dos dados utilizou genes de referência análogos em humanos de 3 miRNAs de *C. elegans* (cel-miR-39, -54, -238), conforme descrito anteriormente (Mitchell et al., 2008). Pelo fato de serem análogos em humanos, a quantificação destes miRNAs no plasma deve-se apenas à quantidade inserida durante a extração. Este método de quantificação relativa é o mais aceito em amostras de plasma, já que não foram descritos genes de referência endógena de miRNA eficientes nesta amostra biológica.

Os cálculos de quantificação relativa foram feitos conforme descrito por Kroh e colaboradores (2010) onde foi calculada a mediana de todas as médias dos genes de referência de *C. elegans*, considerando todas as amostras. Em seguida, o fator de normalização foi calculado pela subtração da média dos Ct de miRNA sintético de *C. elegans* da amostra de interesse pelo valor da mediana obtido no passo anterior. O fator de normalização foi adicionado ao valor da média do Ct obtido de cada amostra e foi chamado de Ct normalizado. O delta Ct (ΔCt) foi calculado subtraindo o valor do Ct normalizado pelo valor da mediana dos genes de referência. O delta deltaCt ($\Delta\Delta Ct$) foi calculado pela subtração de dois deltas Ct que se queira analisar, de modo que no grupo controle (grupo Sem IC), é calculado o valor de média dos ΔCt s das amostras

deste grupo, fixando-se esse valor (amostra calibradora) para ser subtraído do ΔCt de cada amostra alvo do grupo COM IC: $\Delta\text{Ct amostra COM IC} - \text{média dos } \Delta\text{Cts amostras Sem IC}$. Finalmente, a expressão relativa é obtida pelo cálculo do algoritmo $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

3.15 Análise estatística

O tamanho da amostra foi estipulado de acordo com outros trabalhos já publicados desenvolvidos pelo grupo do Laboratório de Metabolismo e Lípidos que tiveram como objetivo principal avaliar a transferência de lípidos para a HDL.

Os resultados desse estudo foram avaliados e julgados por métodos estatísticos paramétricos e não paramétricos segundo a avaliação prévia da distribuição da amostragem através dos testes de normalidade Shapiro-Wilk, e da homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa SPSS versão 22.0 (IBM, EUA). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e o nível de significância foi estabelecido pelo valor de $p < 0,05$.

Quando os dados apontaram para uma metodologia paramétrica, foi empregada a análise de variância (ANOVA) e com pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos Sem IC, IC I/II e IC III/IV ou o teste t de Student

para a comparação entre os grupos Sem IC *versus* COM IC. Já quando os dados apontaram para uma metodologia não paramétrica, foi empregada a análise de variância não paramétrica teste de Kruskal-Wallis seguido de pós Teste de Dunn para a comparação entre os grupos Sem IC, IC I/II e IC III/IV ou o teste de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos Sem IC *versus* Com IC. Em seguida foi aplicada a correlação de Spearman.

4. RESULTADOS

4.1 Dados bioquímicos

Como observada na Tabela 3 a glicemia em jejum foi menor nos grupos IC III/IV ($p=0,012$) e IC I/II ($p=0,010$) quando comparada ao grupo Sem IC. Entretanto, a concentração de insulina não apresentou diferença entre os grupos. A concentração de leptina foi menor no grupo IC III/IV quando comparada a dos grupos IC I/II ($p=0,005$) e Sem IC ($p=0,005$).

Os grupos estudados não apresentaram diferença nas concentrações de colesterol total, HDL-c, de LDL-c, de não-HDL-c e triglicérides como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Dados bioquímicos dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC.

	Sem IC (n=50)	IC I/II (n=26)	IC III/IV (n=23)	<i>p</i>
Glicose (mg/dL) [†]	104±31	96±14*	97±15*	0,014
Insulina (pg/mL) [†]	400±369	367±321	559±871	0,686
Leptina (pg/mL) [†]	22645±24611	23149±16021	18553±27475* ###	0,005
Colesterol (mg/dl)				
Total	188±54	194±40	169±70	0,166
HDL [†]	31±12	26±10	28±10	0,313
LDL	122±55	128±34	110±46	0,438
não-HDL	157±59	168±38	141±39	0,179
Triglicérides (mg/dl)	140±58	133±78	119±50	0,443
Apolipoproteínas (mg/dl)				
A-I	142±19	125±23*	133±31	0,011
B	114±40	94±28	81±35***	0,001

Dados expressos pela média ± desvio padrão. [†] teste de Kruskal-Wallis; * $p<0,05$ versus Sem IC; *** $p<0,001$ versus Sem IC. ### $p<0,001$ versus IC I/II.

No entanto, as concentrações das apolipoproteínas foram menores nos grupos com IC. A concentração de apo A-I foi menor no grupo IC I/II ($p=0,011$) e a concentração de apo-B foi menor no grupo IC III/IV ($p<0,001$) quando comparada ao grupo Sem IC (Tabela 3).

4.2 Concentrações plasmáticas de LDL oxidada (LDLox), lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e atividade de paraoxonase 1 (PON1)

A Tabela 4 mostra a concentração da fração de LDLox que foi menor nos grupos IC I/II e IC III/IV, comparada ao grupo Sem IC ($p<0,001$). A concentração de LCAT foi testada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) que apresentou valor de p inferior a 0,05 entre grupos. Porém, quando submetido ao *post-test* de Bonferroni, constatou-se que o valor de p foi maior que 0,05, não se confirmando a diferença estatística entre os grupos. A concentração de CETP foi menor no grupo IC III/IV comparada ao grupo IC II/IV ($p=0,016$). A atividade de PON1 não apresentou diferença entre grupos.

Tabela 4: Concentrações plasmáticas de LDL oxidada (LDLox), lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e atividade de paraoxonase 1 (PON1) dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC.

	Sem IC (n=50)	IC I/II (n=26)	IC III/IV (n=23)	<i>p</i>
LDLox (U/L)	63±20	52±22***	41±21***	<0,001
LCAT (µg/mL)	10±3	8,6±2	8±3	0,038
CETP (µg/mL)	3,31±1,19	3,78±1,30	2,77±1,30 [#]	0,021
PON1 (nmol.min ⁻¹ .ml ⁻¹)	127±59	115±64	133±81	0,635

Dados expressos pela média ± desvio padrão. *** $p < 0,001$ versus Sem IC; # $p < 0,05$ versus IC I/II.

4.3 Transferências de lípidos para a HDL

As taxas de transferências de fosfolípidos, éster de colesterol, colesterol livre e triglicérides para a HDL podem ser visualizadas na Tabela 5. As transferências de fosfolípidos, éster de colesterol e triglicérides foram menores apenas no grupo IC III/IV, comparadas ao grupo Sem IC ($p=0,024$; $p=0,019$; $p=0,017$, respectivamente). A transferência de colesterol livre para HDL apresentou uma tendência à redução no grupo IC III/IV comparada ao grupo Sem IC, porém sem significância estatística.

Tabela 5: Transferência de lípidos para a HDL (%) dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC.

	Sem IC (n=50)	IC I/II (n=26)	IC III/IV (n=23)	<i>p</i>
Colesterol livre	9,07±1,52	8,45±1,32	8,07±2,27	0,059
Fosfolípides	20,22±1,45	19,91±1,12	19,05±2,50*	0,024
Colesterol éster	6,26±0,85	5,97±0,87	5,44±1,76*	0,019
Triglicérides	7,40±1,47	6,73±1,12	6,29±2,05*	0,017

Dados expressos pela média ± desvio padrão. * $p < 0,05$ versus Sem IC.

4.4 Concentrações de citocinas inflamatórias.

Na Tabela 6 estão mostradas as concentrações de citocinas inflamatórias realizadas por ensaio multiplex. A concentração de IL-6 aumentou aproximadamente 10 vezes no grupo IC III/IV quando comparada ao grupo Sem IC ($p=0,009$). A concentração de IL-8 foi maior no grupo IC III/IV comparada ao grupo IC I/II ($p=0,033$). Entretanto, as concentrações de MCP-1, TNF- α e IL-1 β , não apresentaram diferenças entre grupos.

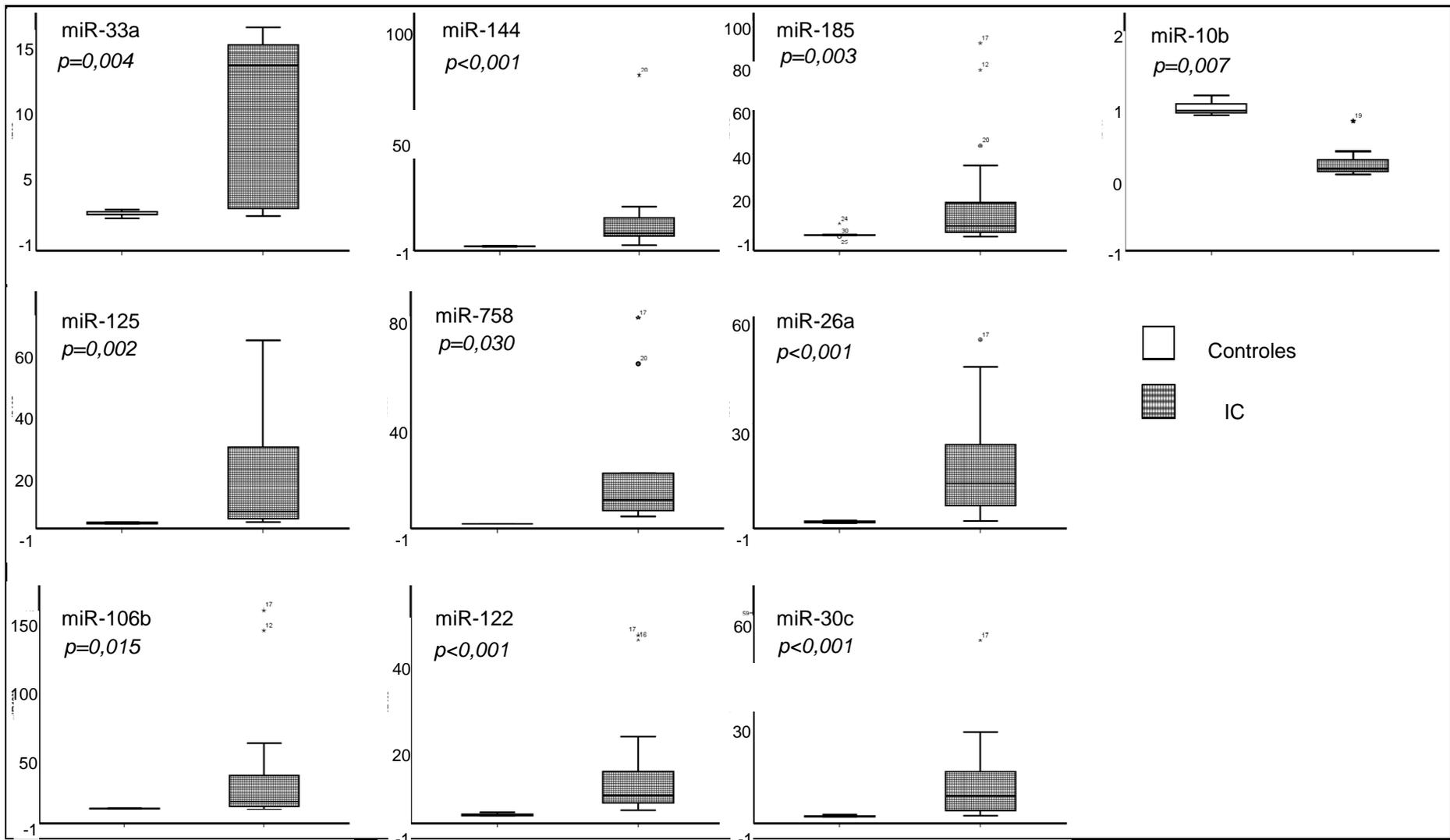
Tabela 6: Concentrações de citocinas inflamatórias (pg/mL) dos pacientes com insuficiência cardíaca (IC) em classe funcional I/II e III/IV e pacientes Sem IC.

	Sem IC (n=50)	IC I/II (n=26)	IC III/IV (n=23)	<i>p</i>
TNF- α	3,48 \pm 1,65	3,31 \pm 1,65	4,18 \pm 2,30	0,536
IL-1 β [†]	1,38 \pm 3,15	1,43 \pm 4,06	0,52 \pm 0,39	0,954
IL-6 [†]	4,45 \pm 8,85	8,40 \pm 14,58	38,93 \pm 80,38**	0,009
IL-8 [†]	5,77 \pm 2,75	5,89 \pm 3,93	9,19 \pm 7,52 [#]	0,033
MCP-1 [†]	161 \pm 70	132 \pm 40	143 \pm 50	0,173

Dados expressos pela média \pm desvio padrão. †: teste de Kruskal-Wallis; ** $p < 0,01$ versus Sem IC; [#] $p < 0,05$ versus IC I/II.

4.5 Análise da expressão de miRNA circulantes

Na Figura 5 observa-se que dentre os miRNAs analisados, os miR-33a, miR-144, miR-185, miR-125, miR-758, miR-26a, miR-106b, miR-122 e miR-30c estão hiperexpressos no grupo IC quando comparados ao grupo controle ($p=0,004$; $p < 0,001$; $p=0,003$; $p=0,002$; $p=0,030$; $p < 0,001$; $p=0,015$; $p < 0,001$; $p < 0,001$). Em contrapartida, o miR-10b mostrou-se diminuído nos pacientes com IC comparados aos controles ($p=0,007$).



1
 2 **Figura 5** – Expressão relativa de miRNA circulantes relacionados ao metabolismo de lipoproteínas.

4.7 Análises de correlação

Como esperado os valores de BNP e alguns marcadores inflamatórios estão relacionados com a gravidade da IC. Visto que foram encontradas diversas alterações no que tange o metabolismo de lípides plasmáticos nos pacientes mais sintomáticos e com mais restrições funcionais, emergiu a possibilidade de que fatores inflamatórios e metabolismo de lípides pudessem estar relacionados. Correlacionamos os principais fatores inflamatórios ligados à IC com importantes marcadores do metabolismo de lípides, com a hipótese de que esses valores se correlacionassem de forma inversa, como se segue abaixo.

Na Tabela 7 observa-se que a intensidade dos sintomas apresentou correlação inversa com as concentrações de apo A-I ($r=-0,259$; $p=0,01$), de apo B ($r=-0,384$; $p<0,001$), de LDL oxidada ($r=-0,420$; $p<0,001$), de LCAT ($r=-0,235$; $p=0,02$), e com as transferências para a HDL de colesterol éster ($r=-0,289$; $p=0,005$), de colesterol livre ($r=-0,233$; $p=0,025$), de fosfolípides ($r=-0,242$; $p=0,019$) e de triglicérides ($r=-0,251$; $p=0,014$).

Tabela 7: Correlações significativas da classificação funcional dos pacientes com aspectos funcionais da HDL

Variável	r	p
Apo A-I	-0,259	0,01
Apo B	-0,384	<0,001
LDLox	-0,42	<0,001
LCAT	-0,235	0,02
Transferências		
Colesterol éster	-0,289	0,005
Colesterol livre	-0,233	0,025
Fosfolípidos	-0,242	0,019
Triglicérides	-0,251	0,014

r=coeficiente de correlação

A Figura 6 mostra a correlação inversa da concentração de BNP com as concentrações de apo A-I ($r=-0,210$; $p=0,038$), de apo B ($r=-0,339$; $p=0,001$), de LDLox ($r=-0,323$; $p=0,001$), de LCAT ($r=-0,251$; $p=0,013$) e com a transferência de colesterol éster ($r=-0,204$; $p=0,049$).

A Figura 7 mostra a correlação inversa entre a concentração de IL-6 com as concentrações de apo A-I ($r=-0,367$; $p<0,001$), de apo B ($r=-0,200$; $p=0,048$), de LCAT ($r=-0,386$; $p<0,001$) e com a diminuição das transferências para a HDL de colesterol éster ($r=-0,386$; $p<0,001$), de fosfolípidos ($r=-0,374$; $p<0,001$) e de triglicérides ($r=-0,325$; $p<0,001$).

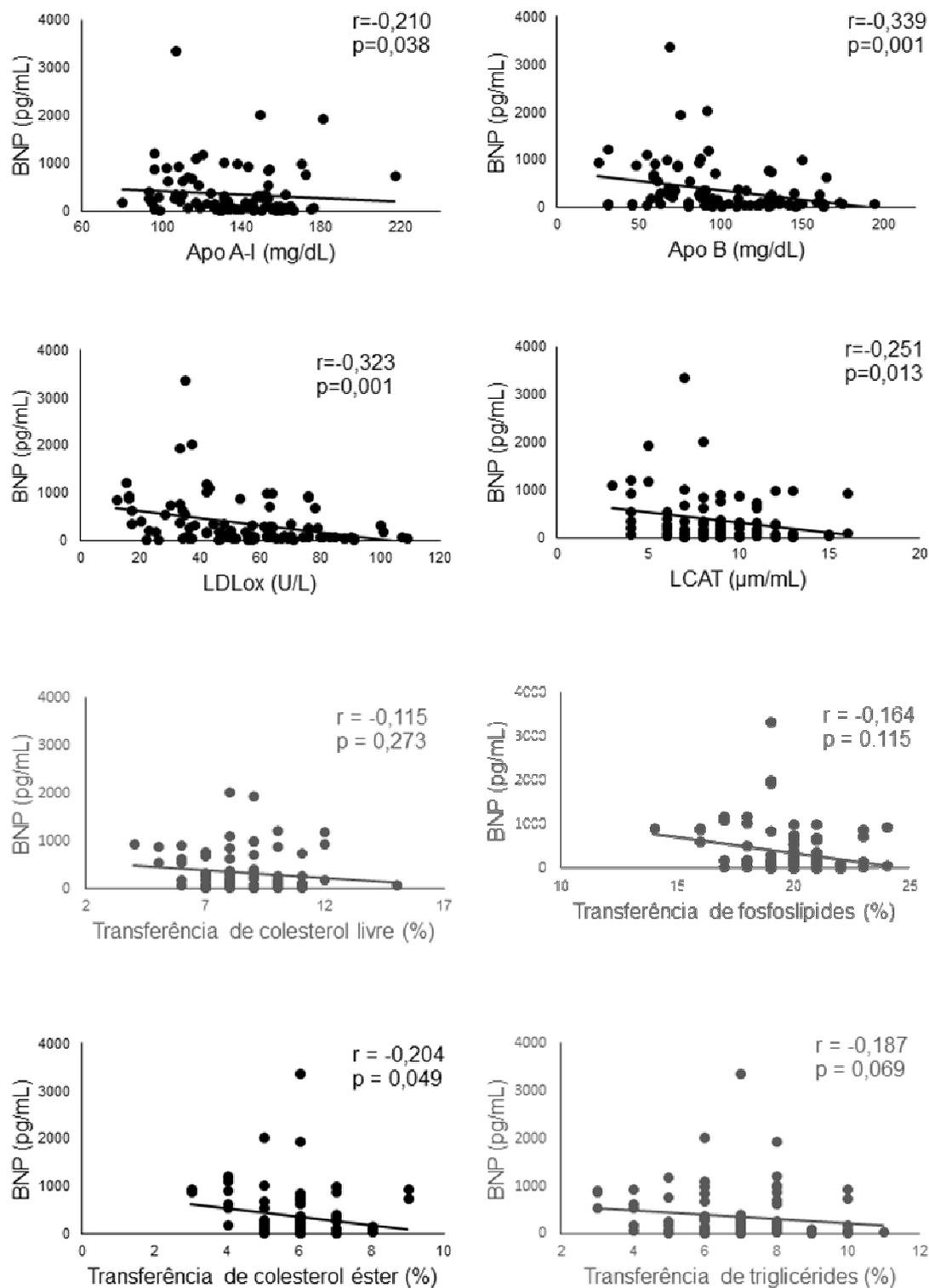


Figura 6 – Correlações de BNP com apo A-I, apo B, LDLox, LCAT e transferências para a HDL.

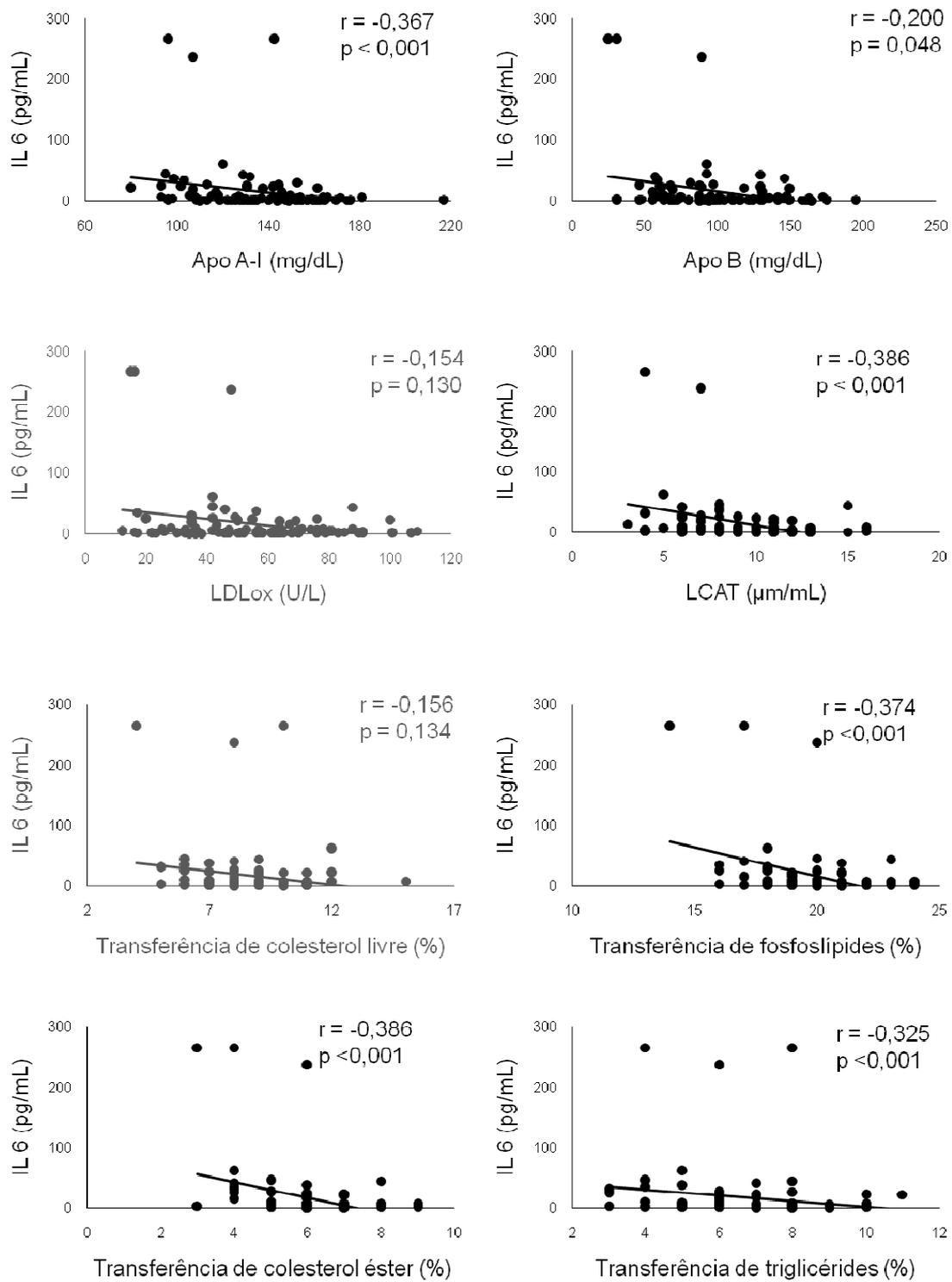


Figura 7 – Correlações de IL-6 com Apo A-I, Apo B, LDLox, LCAT e transferências para a HDL.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi encontrado que as taxas de transferências de colesterol éster, fosfolípidos e triglicérides para a partícula HDL foram menores nos pacientes com IC III/IV em comparação aos pacientes dos grupos IC I/II e Sem IC. Lembrando que as concentrações de triglicérides, LDL-c, HDL-c, e não-HDL-c eram semelhantes entre os grupos estudados, podemos sugerir que, a capacidade da HDL em receber lípidos está ligada, principalmente, a funcionalidade dessa lipoproteína e não apenas a sua concentração no plasma, como demonstrado em estudo anterior em pacientes com DAC (Sprandel *et al.*, 2015).

Outros fatores como, atividades e concentrações de LCAT, CETP e PLTP, também interferem diretamente no processo de transferência de lípidos para a HDL. Quando analisada a concentração de CETP, encontramos que seus níveis plasmáticos estão diminuídos em pacientes com IC III/IV comparados com pacientes Sem IC. Não há na literatura até o momento, trabalhos que avaliam a concentração de CETP em pacientes com IC. Sabe-se que a CETP está envolvida no processo de transferência de colesterol éster e triglicérides entre as lipoproteínas, além de favorecer a remoção de colesterol da circulação e tecidos endoteliais (Tall, 1995). É importante ressaltar que em nosso estudo as trocas de colesterol éster e triglicérides também estão diminuídas no grupo IC III/IV. Assim, podemos inferir que a transferência desses lípidos tenha sido prejudicada pela menor concentração de CETP disponível no plasma. Embora a atividade de LCAT não tenha sido diferente entre os grupos, podemos observar uma tendência da diminuição da atividade dessa enzima nos indivíduos com IC comparado aos Sem IC. LCAT tem papel fundamental no fenômeno de transporte reverso de colesterol já que é

responsável pela esterificação do colesterol livre presente na circulação para que ele seja removido para o fígado e até mesmo para a própria maturação da HDL (Savel *et al*, 2012).

Alterações na transferência de colesterol éster e triglicérides podem contribuir para a instabilidade de HDL (Maranhão & Freitas, 2014). A partícula HDL necessita receber lípidos de outras proteínas para amadurecer. Possivelmente, a diminuição da transferência de lípidos encontrada nos pacientes com IC III/IV pode impactar neste processo, embora outros fatores não avaliados neste estudo também possam estar envolvidos, como tamanho de HDL e ação da PLTP. Em conjunto, as alterações na transferência de lípidos podem afetar a composição, tamanho e concentração de HDL, o que pode levar a uma HDL disfuncional (Norata *et al.*, 2006).

Apesar das concentrações dos lípidos plasmáticos não apresentarem diferenças entre os grupos estudados, as concentrações das apolipoproteínas A-I e B, e a concentração de LDLox apresentaram diferenças que podem ter tido influência direta ou indireta na transferência de lípidos para a HDL.

A concentração de apo A-I foi menor nos pacientes com IC I/II comparada ao grupo Sem IC. Esse dado é semelhante ao encontrado em um estudo conduzido com 117 pacientes com IC de origem não isquêmica (Iwaoka *et al.*, 2007). Os autores reportaram que uma menor concentração de apo A-I foi fator independente de pior prognóstico e que, pacientes mais idosos com IC e com concentrações mais elevadas de BNP, já apresentaram concentração de apo A-I diminuída, logo no início do seguimento.

A concentração de apo B foi menor nos pacientes com IC III/IV comparados aos pacientes Sem IC. Sabe-se que concentrações mais elevadas de apo B estão associadas ao aumento do risco cardiovascular e DAC (Sigurdsson *et al.*, 1992; Talmud *et al.*, 2002). Apesar disso, estudos que explorem o papel da apo B na IC são escassos. Em estudo anterior, foi mostrado que pacientes com IC na forma mais severa apresentavam concentrações basais de apo B mais baixas associadas a um pior prognóstico. Os autores associaram esse fato à questões energéticas que o paciente com IC enfrenta e a presença de caquexia (Wedel *et al.*, 2008). Em nosso estudo apesar do IMC dos pacientes do grupo IC III/IV estar dentro da faixa de normalidade ele é menor comparado ao grupo Sem IC ($24,9 \pm 3,7$; $28 \pm 4,3$; $p=0,017$).

A concentração de LDLox foi menor nos grupos com IC comparada ao grupo Sem IC. Este dado contraria um estudo recente que mostrou que concentrações mais elevadas de LDLox estão associadas a estágios mais graves da IC e à um pior prognóstico (Charach *et al.*, 2015). Entretanto, uma diferença desse estudo com o nosso, está no grupo controle utilizado. O grupo controle do estudo anterior era saudável e não apresentava DAC, diferente do presente estudo em que 92% dos indivíduos do grupo Sem IC apresentavam DAC e 20% também eram diabéticos. A presença de DAC está relacionada com concentrações altas de LDLox (Huang *et al.*, 2012).

Por ter a HDL função anti-inflamatória e por ser a inflamação um processo chave dentro da fisiopatologia da IC, foram analisados alguns marcadores inflamatórios na população do presente estudo. Pudemos observar que dentre as citocinas analisadas, apenas a IL-6 e a IL-8 se mostraram

aumentadas. A concentração da IL-6 foi maior em pacientes com IC III/IV comparada a do grupo Sem IC. A IL-6, frente à injúria miocárdica, é liberada pelos próprios miócitos, possuindo efeitos pleitrópicos que protege o coração durante a resposta aguda, porém cronicamente, induz hipertrofia adaptativa e diminui a função contrátil (Fontes *et al.*, 2015). Pacientes com IL-6 elevada apresentam quadro clínico desfavorável e pior prognóstico (Jug *et al.*, 2009).

A concentração da IL-8 também foi maior em pacientes com IC III/IV comparada a dos pacientes do grupo Sem IC. Em estudo com mais de 1400 pacientes, sugeriu-se que concentrações mais elevadas de IL-8 estão relacionadas com re-internações em curto prazo e pior prognóstico na IC crônica (Nymo *et al.*, 2014). A IL-8 pode estar relacionada com outros fatores depreciativos na IC como necrose de tecido miocárdico em pacientes com IC aguda (Husebeye *et al.*, 2014).

Ao contrário da IL-8, a IL-6 (Jug *et al.*, 2009) é um marcador inflamatório já bem estabelecido na IC, bem como o TNF-a (Sinagra *et al.*, 2013). Nossos resultados com relação à concentração de TNF-a não foram diferentes entre os grupos estudados. Possivelmente, o fato da concentração de TNF-a não ter sido diferente entre os grupos, seja porque outras doenças de fundo inflamatório crônico ou autoimunes estejam presentes nos indivíduos avaliados, tanto do grupo Sem IC quanto dos grupos com IC, não alterando assim, a concentração desse marcador.

As análises de citocinas inflamatórias e hormônios serviram de base para confirmar o quadro inflamatório que esses pacientes apresentam e para correlacioná-los com fatores intrínsecos de funcionalidade das lipoproteínas.

Outro dado que contraria a literatura é o da concentração da leptina, que se mostrou diminuída no grupo IC III/IV quando comparada aos grupos IC I/II e Sem IC. Em estudo anterior, com seguimento de 6 meses, foi mostrado que níveis elevados de leptina estavam associados com a progressão da doença (Bobbert *et al.*, 2012). É sabido que a concentração de leptina tem relação direta com o IMC (Frederich *et al.*, 1995), além de ser secretada pelos adipócitos (Zhang *et al.*, 1994). Associados ao fato de que nosso estudo ter sido transversal, uma vez que não analisamos os efeitos em longo prazo da concentração de leptina nos pacientes com IC, e sim, foram comparados com indivíduos Sem IC, que apresentaram níveis elevados desse hormônio.

Em nosso estudo encontramos uma correlação inversa entre classe funcional da IC e marcadores inflamatórios com as transferências de lípidos para a HDL. Isto nos sugere que alterações nas funções da HDL estão relacionadas com a exacerbação do quadro inflamatório e clínico do paciente com IC.

A classificação funcional e as concentrações de BNP e IL-6 foram escolhidas para a análise de correlação por já serem marcadores bem estabelecidos na IC. Concentrações de apo A-I, apo B, LDLox e LCAT também foram selecionados para as análises de correlações, pelas alterações que esses parâmetros apresentaram no presente estudo, e pelas funções que desempenham no metabolismo de lípidos.

A literatura é escassa com relação a estudos que avaliam a correlação de apo A-I com a IC. Porém, em um estudo com pacientes em IC III e IV e com concentrações mais altas de BNP, foi encontrado menor concentração de apo

A-I (Iwaoka *et al.*, 2007). No presente estudo, apesar das concentrações de apo A-I não apresentarem diferença nas classes III e IV, apenas nas classes I e II, pudemos observar a correlação inversa da concentração dessa apolipoproteína com a classificação funcional, e com as concentrações de BNP e IL-6, ou seja, concentrações mais baixas de apo A-I, estão correlacionadas com a piora dos sintomas e do perfil inflamatório.

Da mesma maneira, também são escassos estudos avaliando a correlação direta de apo B, LDLox e LCAT com os fatores inflamatórios na IC selecionados no presente estudo. Observamos que concentrações mais altas de IL-6 estão correlacionadas com concentrações mais baixas de apo B e de LCAT. Concentrações mais altas de BNP se correlacionam com concentrações mais baixas de apo B, LDLox e LCAT. É provável que a inflamação exacerbada encontrada em nosso estudo e já esperada pelo perfil dos pacientes em questão, tenha influenciado diretamente nas alterações desses parâmetros envolvidos no metabolismo lipídico.

No que tange as transferências de lípidos, a transferência de colesterol éster se correlaciona de forma inversa com a classe funcional do paciente, e com as concentrações de BNP e IL-6. As transferências de fosfolípidos e triglicérides estão correlacionadas inversamente com a classe funcional do paciente e com a concentração de IL-6. No entanto, a transferência de colesterol livre está correlacionada inversamente, apenas com a classe funcional do paciente. Esses fatores associados à diminuição da transferência de lípidos para a HDL, encontrada em pacientes em classe funcional mais grave, nos indica que, o quadro inflamatório presente na IC, possa ter

influenciado na diminuição da habilidade da HDL em receber lípidos, prejudicando assim, a funcionalidade desta lipoproteína.

A redução da capacidade anti-inflamatória da HDL já está relacionada com a IC e seu prognóstico. Em estudo envolvendo 96 pacientes com IC foi avaliado o chamado “HDL inflammatory index” e correlacionado com níveis de BNP e de proteína C-reativa. Foi encontrado que, em pacientes com IC a HDL atinge “status” de pró-inflamatória comparados aos controles. A hipótese do grupo é que a piora da IC e, conseqüentemente, o aumento do quadro inflamatório, leve a uma deterioração das funções anti-inflamatórias da HDL (Kim *et al.*, 2012). Outro estudo, do mesmo grupo, avaliou quase 100 participantes, e observou que uma HDL disfuncional ou pró-inflamatória, avaliada pela diminuição da atividade da PON-1 em pacientes com IC comparado aos controles, teve relação com o aumento do quadro inflamatório na IC (Kim *et al.*, 2013).

Doenças que têm como pano de fundo a inflamação crônica, como a psoríase, apresentam alterações na composição da HDL e na capacidade de efluxo de colesterol, correlacionando-se, de forma inversa, com a severidade e extensão da lesão na doença (Holzer *et al.*, 2012).

A diminuição da transferência de lípidos, diminuição das concentrações de CETP, de LDLox e das apolipoproteínas A-I e B, corroboram com a hipótese de que o quadro inflamatório característico da IC, prejudique, de forma direta ou indireta, o TRC.

A fim de complementar esse estudo transversal sobre o papel dos lípidos plasmáticos na IC, nosso grupo selecionou alguns miRNAs envolvidos

no metabolismo das lipoproteínas e, principalmente ao TRC. MiRNAs diretamente relacionados com a fisiopatologia da IC já são bem explorados atualmente, tais como: miR-21, miR-23a, miR-24, miR-26, miR-27, miR-125, miR-195 e miR-199-3p; os quais exercem papel fundamental nos processos de angiogênese, hipertrofia, apoptose e fibrose do miocárdio (Matkovich *et al.*, 2009). Como o presente estudo teve como alvo principal o metabolismo de lípidos, selecionamos miRNAs que estão diretamente envolvidos com a HDL, no que concerne o TRC. Dos 10 miRNAs analisados, 9 estavam hiperexpressos na IC. Foram eles: miR-33a, miR-144, miR-185, miR-125, miR-758, miR-26a, miR-106b, miR-122 e miR-30c. Os miR-33, miR-144, miR-758, miR-10b, miR-106b e miR-26 estão principalmente relacionados à síntese de ABCA1 (Davalos *et al.*, 2011). A superexpressão desses miRNAs inibe a produção de ABCA1 prejudicando de forma direta o transporte reverso de colesterol, diminuindo a captação de colesterol das células endoteliais pela HDL, e até mesmo, podendo influenciar nos níveis plasmáticos de HDL-c (Canfrán-Duque *et al.*, 2014). Os miR-125a e miR-185 regulam principalmente a expressão de SR-BI, receptor essencial envolvido na captação de EC da HDL (Goedeke *et al.*, 2016). Os miR-122 e miR-30c estão mais envolvidos com apolipoproteínas contendo apo B e, conseqüentemente, podendo alterar os níveis de triglicérides e de LDL-c no plasma (Goedeke *et al.*, 2016). Esses achados vão de encontro com demais achados deste estudo relacionados às alterações nas transferências de lípidos e concentração de CETP.

Em contrapartida, somente o miR-10b estava diminuído nos pacientes com IC comparados aos controles. O miR-10b, além de regular a síntese de ABCA1, tem relação direta com o intestino e a produção de ácido

protocatecuico pela microbiota intestinal. O ácido protocatecuico age acelerando a retirada de colesterol dos macrófagos (Wang *et al.*, 2012). Porém, em pacientes com IC a microbiota da região intestinal está alterada por hipoperfusão e congestão no órgão (Nagatomo & Tang, 2015; Pasini *et al.*, 2016), podendo justificar assim, o resultado encontrado em nosso estudo.

5.1 Limitações do estudo

Nosso trabalho avaliou vários aspectos importantes do metabolismo de lípidos. Ainda assim, algumas lacunas precisam ser fechadas para uma ampla interpretação de todos os dados, como: tamanho da HDL, concentração de ácidos graxos livres e proteômica da HDL.

Se faz necessário um acompanhamento desses pacientes para avaliar a real interferência do déficit no metabolismo de lípidos e no impacto disso na vida do paciente com IC.

Todos os pacientes envolvidos neste trabalho eram oriundos de centros médicos, o que impossibilitou um grupo controle saudável. Porém, mesmo trabalhando com indivíduos que já apresentam alterações no metabolismo de lípidos conseguimos encontrar diversas alterações que nos permitiram inferir diferenças presentes na IC, mas ausentes nos controles não saudáveis.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos em nosso estudo podemos concluir que, nos pacientes com a forma mais severa e sintomática da IC, o processo de transferência de lípidos para a HDL está deficiente, bem como alguns dos mecanismos que o regulam, e possivelmente estas alterações influenciem o TRC e outras funções essenciais e protetoras da HDL desses pacientes.

7. REFERÊNCIAS

Abraham WT, Fonarow GC, Albert NM, Stough WG, Gheorghiade M, Greenberg BH, O'Connor CM, Sun JL, Yancy CW, Young JB. Predictors of in-hospital mortality in patients hospitalized for heart failure. Insights from the organized program to initiate lifesaving treatment in hospitalized patients with heart failure (OPTIMIZE-HF). *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(5):347-56.

Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Kim T, Civelek M, Baldan A, Esau C, Edwards PA. MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor. *Circ Res* 2013;112:1602–1612

Akhter MW, Aronson D, Bitar F, Khan S, Singh H, Singh RP, Burger AJ, Elkayam U. Effect of elevated admission serum creatinine and its worsening on outcome in hospitalized patients with decompensated heart failure. *Am J Cardiol*. 2004;94:957-60.

Allen RM, Marquart TJ, Albert CJ, Suchy FJ, Wang DQ, Ananthanarayanan M, Ford DA, Baldan A. miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin and diet-induced hepatotoxicity. *EMBO Mol Med* 2012;4:882–895.

Ambrosy AP, Fonarow GC, Butler J, Chioncel O, Greene SJ, Vaduganathan M, Nodari S, Lam CS, Sato N, Shah AN, Gheorghiade M. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63:1123-33.

Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*. 2004;90(4):464-470.

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, LaDu BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase, *J. Clin. Invest.* 1998;101:1581–1590.

Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Ability of reconstituted high density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *J. Lipid Res.* 1999;40:345–353.

Bartel DP. Micronas: Target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009; 136:215–233

Bobbert P, Jenke A, Bobbert T, Köhl U, Rauch U, Lassner D, Scheibenbogen C, Poller W, Schultheiss HP, Skurk C. High leptin and resistin expression in chronic heart failure: adverse outcome in patients with dilated and inflammatory cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2012;14(11):1265-75. doi: 10.1093/eurjhf/hfs111. Epub 2012 Jul 4.

Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(1 supl.1):1-71.

Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Burnett JC. Natriuretic peptides in the diagnosis and management of chronic heart failure. *Heart Fail Clinic.* 2009;5(4):501-14.

Bowry V, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89:10316–10320.

Braunwald E. The war against heart failure: the Lancet lecture. *Lancet.* 2015;385:812-24.

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;238:61–5.

Canfrán-Duque A, Ramírez CM, Goedeke L, Lin CS, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and HDL life cycle. *Cardiovasc Res.* 2014 1;103(3):414-22. doi: 10.1093/cvr/cvu140. Review.

Cardoso JN. Estratégias farmacológicas para preservação de função renal em insuficiência cardíaca aguda descompensada. *Rev Soc Cardiol.* 2015;25(2):100-4.

Catalucci D, Gallo P, Condorelli G. MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(4):402-8.

Charach G, Michowitz Y, Rogowski O, Charach L, Argov O, George J, Grosskopf I. Usefulness of Antibodies to Oxidized Low-Density Lipoproteins as Predictors of Morbidity and Prognosis in Heart Failure Patients Aged ≥ 65 Years. *Am J Cardiol.* 2015;116(9):1379-84.

Criteria Committee, New York Heart Association, Inc. Diseases of the Heart and Blood Vessels. Nomenclature and Criteria for diagnosis, 6th edition Boston, Little, Brown and Co. 1964, p 114.

Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;15:1987–1994.

Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramirez CM, Warriar NP, Andreo U, Cirera-Salinas D, Rayner K, Suresh U, Pastor-Pareja JC, Esplugues E, Fisher EA, Penalva LO, Moore KJ, Suarez Y, Lai EC, Fernandez-Hernando C. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:9232-9237.

Dávalos A, Fernández-Hernando C. From evolution to revolution: miRNAs as pharmacological targets for modulating cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Pharmacol Res.* 2013;75:60-72.

El-Menyar AA. Cytokines and myocardial dysfunction: state of the art. *J Card Fail.* 2008;14(1):61-74

Eckerson HW, Wyte CM, LaDu BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1993;35:1126–1138.

Farbstein D, Levy AP. HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012;10(3):353-361.

Fontes JA, Rose NR, Čiháková D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine.* 2015;74(1):62-8. Review

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1995;1(12):1311-4.

Genth-Zotz S, von Haehling S, Bolger AP, Kalra PR, Wensel R, Coats AJ, Anker SD. Pathophysiologic quantities of endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha release in whole blood from patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 2002;90(11):1226-1230.

Gerin I, Clerboux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, Leclercq IA, MacDougald OA, Bommer GT. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J Biol Chem*. 2010;285:33652–33661.

Goedeke L, Aranda JF, Fernández-Hernando C. microRNA regulation of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(4):282-8

Goedeke L, Wagschal A, Fernández-Hernando C, Näär AM. miRNA regulation of LDL-cholesterol metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1861:2047-2052.

Gomaschi M, Basilico N, Sisto F, Taramelli D, Eligini S, Colli S, Sirtori CR, Franceschini G, Calabresi L. High-density lipoproteins attenuate interleukin-6 production in endothelial cells exposed to pro-inflammatory stimuli. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1736:136–143.

Holzer M, Wolf P, Curcic S, Birner-Gruenberger R, Weger W, Inzinger M, El-Gamal D, Wadsack C, Heinemann A, Marsche G. Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res.* 2012;53(8):1618-24. doi: 10.1194/jlr.M027367.

Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Marusawa H, Iwanaga Y, Hasegawa K, Yokode M, Kimura T, Kita T. MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:17321–17326.

Hu YW, Hu YR, Zhao JY, Li SF, Ma X, Wu SG, Lu JB, Qiu YR, Sha YH, Wang YC, Gao JJ, Zheng L, Wang Q. An Agomir of miR-144–3p accelerates plaque formation through impairing reverse cholesterol transport and promoting pro-inflammatory cytokine production. *PLoS ONE* 2014;9:e94997.

Huang H, Ma R, Liu D, Liu C, Ma Y, Mai W, Dong Y. Oxidized low-density lipoprotein cholesterol and the ratio in the diagnosis and evaluation of therapeutic effect in patients with coronary artery disease. *Dis Markers.* 2012;33(6):295-302.

Husebye T, Eritsland J, Arnesen H, Bjørnerheim R, Mangschau A, Seljeflot I, Andersen GØ. (2014) Association of Interleukin 8 and Myocardial Recovery in Patients with STElevation Myocardial Infarction Complicated by Acute Heart Failure. *PLoS ONE.* 2014;9(11)

Iwaoka M, Obata JE, Abe M, Nakamura T, Kitta Y, Kodama Y, Kawabata K, Takano H, Fujioka D, Saito Y, Kobayashi T, Hasebe H, Kugiyama K.

Association of low serum levels of apolipoprotein A-I with adverse outcomes in patients with nonischemic heart failure. *J Card Fail.* 2007;13(4):247-53.

Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med.* 2003;348:2007-18.

Jug B, Salobir BG, Vene N, Sebestjen M, Sabovic M, Keber I. Interleukin-6 is a stronger prognostic predictor than high-sensitive C-reactive protein in patients with chronic stable heart failure. *Heart Vessels.* 2009;24(4):271-6.

Karasawa K. Clinical aspects of plasma platelet activating factor-acetylhydrolase. *Biochim Biophys. Acta.* 2006;1761:1359–1372.

Kim J, Yoon H, Ramirez CM, Lee SM, Hoe HS, Fernandez-Hernando C. Mir-106b impairs cholesterol efflux and increases a beta levels by repressing abca1 expression. *Exp Neurol.* 2012; 235:476–483

Kim JB, Hama S, Hough G, Navab M, Fogelman AM, Maclellan WR, Horwich TB, Fonarow GC. Heart failure is associated with impaired anti-inflammatory and antioxidant properties of high-density lipoproteins. *Am J Cardiol.* 2013;112(11):1770-7.

Kontush A, Chapman MJ, Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006;58:342–374.

Kunitake ST, Jarvis MR, Hamilton RL, Kane JP. Binding of transition metals by apolipoprotein A-I-containing plasma lipoproteins: inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:6993–7.

Lee CM, Chien CT, Chang PY, Hsieh MY, Jui HY, Liao CS, Hsu SM, Lee YT. High-density lipoprotein antagonizes oxidized low-density lipoprotein by

suppressing oxygen free-radical formation and preserving nitric oxide bioactivity. *Atherosclerosis*. 2005;185:251-8.

Li T, Francl JM, Boehme S, Chiang JY. Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the cholesterol 7 α -hydroxylase/steroid response element-binding protein 2/ microRNA-33a axis in mice. *Hepatology* 2013;58:1111–1121.

Lo Prete AC, Dina CH, Azevedo CH, Puk CG, Lopes NH, Hueb WA, Maranhão RC. In vitro simultaneous transfer of lipids to HDL in coronary artery disease and in statin treatment. *Lipids*. 2009;44(10):917-24.

Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.2001;21:1451–7.

Mann DL, Deswal A, Bozkurt B, Torre-Amione G. New therapeutics for chronic heart failure. *Annu Rev Med*. 2002;53:59-74.

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)502-505.

Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldan A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:12228–12232.

Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, Dorn LE, Watson MA, Margulies KB, Dorn GW 2nd. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation*. 2009 Mar 10;119(9):1263-71.

McKie PM, Cataliotti A, Sangaralingham SJ, Ichiki T, Cannonne V, Bailey KR, Redfield MM, Rodeheffer RJ, Burnett JC Jr. Predictive utility of atrial, N-terminal pro atrial, and N-terminal pro-B-type natriuretic peptides for mortality and cardiovascular events in the general community: a 9-year follow-up study. *Mayo Clin Proc*. 2011;86(12):1154-60.

Melo SA, Kalluri R. Molecular Pathways: MicroRNAs as Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2012; 15; 18(16): 4234–4239.

Ministério da Saúde. Datasus: mortalidade - 1996 a 2012, pela CID-10 – Brasil [Internet]. Brasília (DF); Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>

Nagatomo Y, Tang WH. Intersections Between Microbiome and Heart Failure: Revisiting the Gut Hypothesis. *J Card Fail*. 2015;21(12):973-80.

Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Naar AM. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328:1566–1569.

Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger: princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Savier, 2002, 975p.

Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Trends in age -specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980-2009. *Eur Heart J.* 2013;34:3017-27.

Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, Poole-Wilson PA, Coats AJ, Anker SD. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet.* 1999;353(9167):1838-1842

Norata, G.D.; Pirillo, A; Catapano, A.L.; Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr. Metab. Cardiovasc Dis.* 2006;16(5)371-386.

Nymo SH, Hulthe J, Ueland T, McMurray J, Wikstrand J, Askevold ET, Yndestad A, Gullestad L, Aukrust P. Inflammatory cytokines in chronic heart failure: interleukin-8 is associated with adverse outcome. Results from CORONA. *Eur J Heart Fail.* 2014;16(1):68-75.

Pasini E, Aquilani R, Testa C, Baiardi P, Angioletti S, Boschi F, Verri M, Dioguardi F. Pathogenic Gut Flora in Patients With Chronic Heart Failure. *JACC Heart Fail.* 2016;4(3):220-7.

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(10):1075-80.

Radauceanu A, Ducki C, Virion JM, Rossignol P, Mallat Z, McMurray J, Van Veldhuisen DJ, Tavazzi L, Mann DL, Capiamont-Vin J, Li M, Hanriot D,

Zannad F. Extracellular matrix turnover and inflammatory markers independently predict functional status and outcome in chronic heart failure. *J Card Fail.* 2008;14(6):467-474.

Rader DJ, Hobbs HH. Capítulo 356. Disorders of Lipoprotein Metabolism. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e.* New York, NY: McGraw-Hill; 2012.

Ramirez CM, Rotllan N, Vlassov AV, Davalos A, Li M, Goedeke L, Aranda JF, Cirera-Salinas D, Araldi E, Salerno A, Wanschel A, Zavadil J, Castrillo A, Kim J, Rauchhaus M, Coats AJ, Anker SD. The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet.* 2000;9;356(9233):930-3.

Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernandez-Hernando C. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010;328:1570–1573.

Savel J, Lafitte M, Pucheu Y, Pradeau V, Tabarian A, Couffignal T. Very low levels of HDL cholesterol and atherosclerosis, a variable relationship – a review of LCAT deficiency. *Vasc Health Risk Manag.* 2012;8:357-361.

Sigurdsson G, Baldursdottir A, Sigvaldason H, Agnarsson U, Thorgeirsson G, Sigfusson N. Predictive value of apolipoproteins in a prospective survey of coronary artery disease in men. *Am J Cardiol.* 1992;69(16):1251-4.

Sinagra E, Perricone G, Romano C, Cottone M. Heart failure and anti tumor necrosis factor-alpha in systemic chronic inflammatory diseases. *Eur J Intern Med.* 201;24(5):385-92.

Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1488:1–19.

Soh J, Iqbal J, Queiroz J, Fernandez-Hernando C, Hussain MM. MicroRNA-30c reduces hyperlipidemia and atherosclerosis in mice by decreasing lipid synthesis and lipoprotein secretion. *Nature medicine*. 2013;19:892–900.

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;14:107.

Suarez Y, Fernandez-Hernando C. Control of cholesterol metabolism and plasma high density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circ Res* 2013;112:1592–1601

Sun D, Zhang J, Xie J, Wei W, Chen M, Zhao X. Mir-26 controls lxr-dependent cholesterol efflux by targeting abca1 and arl7. *FEBS Lett*. 2012;586:1472–1479

Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*. 1993;34(8):1255-1274.

Talmud PJ, Hawe E, Miller GJ, Humphries SE. Nonfasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 1;22(11):1918-23.

Tijssen AJ., Pinto YM., Creemers EE. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 1;303(9):H1085-95. Review.

Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012; 489:242–249.

Van Lenten BJ, Fogelman AM, Haberland ME, Edwards PA. The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:2704-2708.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011;13:423-433.

Wang D, Xia M, Yan X, Li D, Wang L, Xu Y, Jin T, Ling W. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing mirna-10b. *Circ Res*. 2012; 111:967–981

Wedel H, McMurray JJ, Lindberg M, Wikstrand J, Cleland JG, Cornel JH, Dunselman P, Hjalmarson A, Kjekshus J, Komajda M, Kuusi T, Vanhaecke J, Waagstein F; CORONA Study Group. Predictors of fatal and non-fatal outcomes in the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA): incremental value of apolipoprotein A-1, high-sensitivity C-reactive peptide and N-terminal pro B-type natriuretic peptide. *Eur J Heart Fail*. 2009 Mar;11(3):281-91.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;1;372(6505):425-32

Zaya M, Phan A, Schwarz ER. Predictors of re-hospitalization in patients with chronic heart failure. *World J Cardiol*. 2012;4(2):23-30.

ANEXO I – Dados do perfil hematológico dos pacientes

	Sem IC (n=50)	IC I/II (n=25)	IC III/IV (n=23)	<i>p</i>
Creatinina (mg/dL)	1,18±0,81	1,08±0,49	1,16±0,57	0,677
Sódio (mEq/L)	140±3,4	141±4,1	141,2±6,6	0,334
Potássio (mEq/L)	4,45±0,6	4,51±0,52	4,16±0,58	0,072
Hemoglobina (g/dL)	13,6±1,4	13,5±1,5	13,4±1,7	0,778
Hematócrito (%)	41±4,3	41,5±4,8	40,7±5,2	0,822
Leucócitos (/μL)	6501±1533	6569±1535	8126±2617*	0,002*
Plaquetas (/μL)	215367±6615	238500±83011	239609±92723	0,324

BPM: batimentos por minuto; IMC: índice massa corporal; DAC: doença arterial coronária; IAM: infarto agudo do miocárdio; # $p < 0,01$ versus Sem IC.

ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Papel do lípides plasmáticos e fatores pró-inflamatórios na fisiopatologia, evolução e prognóstico da Insuficiência Cardíaca da cardiopatia isquêmica e não isquêmica.

PESQUISADOR: Dr, Raul Cavalcante Maranhão

CARGO/FUNÇÃO: Diretor do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 20122

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Metabolismo de Lípidos

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

- 1 – O senhor (a) está participando voluntariamente dessa pesquisa, que tem por objetivo definir o papel do lípidos (gorduras) presentes no sangue dos pacientes com Insuficiência Cardíaca e também traçar um perfil desses pacientes em todos os estágios da doença.
- 2 – Vamos coletar sangue de uma veia do braço, o senhor (a) vai sentir uma picadinha e a região pode ficar um pouco dolorida e com um roxinho. No outro braço também vamos medir a pressão arterial, além de medir a altura, o peso e sua cintura;
- 3 – Vamos também perguntar sobre os medicamentos em uso, sobre sua doença e se algum familiar já esteve doente da mesma forma. Vamos olhar seus exames anteriores relacionados a sua doença;
- 4 – Ao final da pesquisa talvez possamos destacar outros alvos terapêuticos para melhorar a terapia do paciente com Insuficiência Cardíaca;
- 5 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Antonio Carlos Pereira Barretto. que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – Bloco II, 1º subsolo sala 17 – Cerqueira César – São Paulo – CEP 05403-900 Telefone: 2661-5417. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.
- 6 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- 7 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, inclusive de outras instituições (Hospital Auxiliar Cotoxó, Hospital Santa Marcelina e Hospital das Clínicas) não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;
- 8 – Caso seja verificada alguma anomariedade nos resultados obtidos, seu médico responsável será informado.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

9 – Não há despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

10 – Informar o compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

11 – Seu sangue ficará armazenado em nosso laboratório por um período de 5 anos, nele poderemos reavaliar seu colesterol, seu hemograma e outras análises comuns que se realizam nas consultas de rotina com seu médico. Sua amostra poderá fazer parte de algum estudo relacionado à sua doença, que possa contribuir no tratamento e conforto das pessoas com Insuficiência Cardíaca, sem a necessidade de uma nova coleta.

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar a cada pesquisa futura na qual será utilizado com o meu material.

(....) NÃO. Eu dispenso a autorização futura para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Papel do lípidos plasmáticos e fatores pró-inflamatórios na fisiopatologia, evolução e prognóstico da Insuficiência Cardíaca da cardiopatia isquêmica e não-isquêmica”.

Eu discuti com o Dr. Raul Cavalcante Maranhão sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO IV - Aprovação CAPpesq



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

09756112.3.0000.0068

PROJETO DE PESQUISA

Título: PAPEL DOS LÍPIDES PLASMÁTICOS E FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS NA FISIOPATOLOGIA, EVOLUÇÃO E PROGNÓSTICO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA DA CARDIOPATIA ISQUÊMICA E NÃO ISQUÊMICA.

Pesquisador Responsável: Antonio Carlos Pereira-Barretto **Versão:** 2

Pesquisador Executante: Ana Elisa Marabini Martinelli **CAAE:** 09756112.3.0000.0068

Co-autores: Raul Cavalcante Maranhão, Nilson Silveira Aranha.

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9194

Número do Parecer: 164.158

Data da Relatoria: 05/12/2012

Apresentação do Projeto: Papel dos lípides plasmáticos e fatores pró-inflamatórios na fisiopatologia, evolução e prognóstico da Insuficiência Cardíaca da cardiopatia isquêmica e não isquêmica.

Objetivo da Pesquisa: Investigar se a transferência de lípides para a HDL e a concentração das proteínas de transferência está alterada na insuficiência cardíaca crônica avançada e se estes parâmetros têm importância no prognóstico dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O risco ao paciente é mínimo e relacionado à punção venosa para coleta de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Pesquisador anexa documento do comitê de ética do Hosp. Sta Marcelina e faz as modificações necessárias no TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O projeto está bem desenhado, apresenta hipótese clara e metodologia já utilizada pelos autores. Na documentação apresentada, não observamos termo de anuência do Hospital Sta Marcelina, co-participe no estudo. No projeto, os autores referem que farão armazenamento das amostras.

Recomendações: Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências relacionadas o projeto.

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado

Andressa
COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
13 / 12 / 2012

São Paulo, 12 de Dezembro de 2012

Alfredo Mansur
PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

ANEXO III - Ficha de dados dos pacientes

Nome: _____

Nº matrícula: _____ Grupo: _____ () 1ª coleta () 2ª coleta

Hospital de origem: _____

Dados antropométricos

Idade: _____ Peso: _____ Altura: _____ P.A: _____ Sexo: _____ FC: _____

Circunferências: Abdominal: _____ Torácica: _____ Quadril: _____

Tabagismo: _____ Etilismo: _____ IMC: _____ Etnia: _____

Diabetes: _____ Dislipidemia: _____

Insuficiência cardíaca: () Sim () Não CF: _____

Determinações laboratoriais

HDL: _____ LDL: _____ TG: _____ Glicemia: _____ Insulina: _____

Leucograma: CG: _____ Eosinófilo: _____ Basófilo: _____

Eritograma: HB: _____ HT: _____

Uréia: _____ Creatinina: _____ Na: _____ K: _____

Outros: _____

Medicamentos em uso

Histórico familiar ICC: _____ Coronariopatia: _____ Diabetes: _____

Dislipidemia: _____

Histórico da doença

CAT _____

_____ ECO: DDVE: _____

FEVE: _____ DAE: _____

PAP: _____ Hipocinesia: _____ Acinesia: _____

I. Mitral: _____ I. Tricúspide: _____

Revascularizações: _____

Testes provocativos de isquemia: _____

Outros: _____

Informações adicionais: _____

Data: _____ Responsável: _____

ANEXO V – Participações em congressos



71º CONGRESSO BRASILEIRO DE CARDIOLOGIA | FORTALEZA/CEARA



CERTIFICADO

377 - Alterações no metabolismo de lipoproteínas em pacientes com insuficiência cardíaca.

Autoria: ANA ELISA MARABINI MARTINELLI, RAUL CAVALCANTE MARANHÃO, MILENA NOVAES CARDOSO, PRISCILA OLIVEIRA DE CARVALHO, BRUNA MIRANDA DE OLIVEIRA SILVA, FATIMA RODRIGUES FREITAS, ANTONIO CARLOS PEREIRA BARRETO,
Instituição: InCor - FMUSP; Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Foi apresentado no 71º Congresso Brasileiro de Cardiologia, realizado no período de 23 a 25 de setembro de 2016, na cidade de Fortaleza/CE, na qualidade de TEMAS LIVRES PÔSTERES, na sessão: Hipertensão Arterial.


Marcus Vinícius Bolívar Malachias
Presidente da Sociedade
Brasileira de Cardiologia

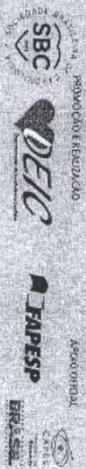

Raul Dias dos Santos Filho
Diretor Científico da Sociedade
Brasileira de Cardiologia


João David de Souza Neto
Presidente do 71º Congresso
Brasileiro de Cardiologia


Andréa Araújo Brandão
Coordenadora de Temas Livres do
71º Congresso Brasileiro de Cardiologia



CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho

Alterações no metabolismo de lipoproteínas se correlacionam com fatores inflamatórios e quadro sintomatológico em pacientes com insuficiência cardíaca

dos autores **Ana Elisa Marabini Martinelli, Raul Cavalcante Maranhão, Milena Novaes Cardoso, Priscila Oliveira de Carvalho, Bruna Miranda de Oliveira Silva, Fatima Rodrigues Freitas, Antonio Carlos Pereira Barretto**

foi apresentado na forma de **POSTER**

no **XV CONGRESSO BRASILEIRO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**, realizado no período de 11 a 13 de agosto de 2016, no Campos do Jordão Convention Center, Campos do Jordão/São Paulo

Luis Eduardo Paim Rohde
Presidente do Departamento de Insuficiência Cardíaca da SBC

Fabiana G. Marcondes Braga
Coordenadora da Comissão de Temas Livres do XV Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca

Fernando Bacal
Presidente do XV Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca



A CARDIOLOGIA ATUAL E FUTURA

CERTIFICADO

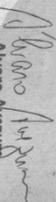
Conferido a **Ana Elisa Marabini Martinelli**

Por sua participação na qualidade de **CO-AUTOR** do trabalho: **Alterações nas transferências de lipídeos para a lipoproteína de alta densidade (HDL) em pacientes com insuficiência cardíaca** apresentado na Sessão de Temas Livres – modalidade **Oral**, no dia **27 de Maio de 2016**.


Ibraim Mascarenelli Francisco Pinto
Presidente SOCESP


Rui Fernando Ramos
Presidente XXXVII Congresso


Carlos Alberto Cyrillo Sellera
Coordenador Científico do Congresso


Alvaro Avezun
Coordenador Científico da SOCESP

Protocolo CNA: 116245 • Cardiologia: **15** | Cirurgia cardiovascular: **10** | Geriatria: **10** | Cirurgia geral: **10** | Cirurgia torácica: **10** | Cirurgia vascular: **10** | Clínica médica: **10**
Ergometria: **10** | Hemodinâmica e cardiologia intervencionista: **10** | Eletrofisiologia clínica invasiva: **10** | Ecografia vascular com doppler: **10** | Medicina de urgência: **10**
Angiorradiologia e cirurgia endovascular: **10** | Ecocardiografia: **10** | Cardiologia pediátrica: **10**



Organização

Apio

CERTIFICADO

TLO 161 - As transferências de lipídeos para a HDL estão diminuídas em pacientes com insuficiência cardíaca sintomática

autoría: Antonio Carlos Pereira Barretto, Ana Elisa Marabini Martinelli, Milena Novaes Cardoso, Priscila Oliveira De Carvalho, Thauany Martins Tavori, Fatima Rodrigues Freitas, Raul Cavalcante Maranhao

Foi apresentado no **70º Congresso Brasileiro de Cardiologia**, realizado de **18 a 21 de setembro de 2015**, na cidade de Curitiba - PR, na qualidade de tema livre ORAL, na sessão: Aterosclerose, Dislipidemia e Diabetes.

Angelo Amato Vincenzo de Paola
Presidente
Sociedade Brasileira de Cardiologia

Maria da Consolação Vieira Moreira
Diretora Científica
Sociedade Brasileira de Cardiologia

José Carlos Moura Jorge
Presidente do 70º Congresso
da Sociedade Brasileira de Cardiologia