

FÁBIO DE CERQUEIRA LARIO

Estudo da reserva de perfusão miocárdica pelo ecocardiograma com contraste em tempo real, em indivíduos com hipercolesterolemia grave, antes e após tratamento com inibidores da HMG-CoA redutase.

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

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Mathias Junior

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
©reprodução autorizada pelo autor

L a r i o, Fábio de Cerqueira

Estudo da reserva de perfusão miocárdica pelo ecocardiograma com contraste em tempo real, em indivíduos com hipercolesterolemia grave, antes e após tratamento com inibidores da HMG-CoA redutase / Fábio de Cerqueira Lario. - São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardio-Pneumologia.
Área de concentração: Cardiologia.
Orientador: Wilson Mathias Junior.

Descritores: 1.Hipercolesterolemia 2.Ecocardiografia de contraste 3.Circulação coronária 4.Microcirculação 5.Fisiologia cardiovascular 6.Endotélio

USP/FM/SBD-082/09

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Aparecida e Clemente, pelo incentivo constante, amor, carinho e dedicação incondicionais. Pelo exemplo de perseverança, e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

A minha esposa, Glaucia, pelo amor, amizade, companheirismo, e compreensão nas ocasiões difíceis. Pelo entusiasmo e alegria que consegue trazer a todos os nossos momentos. Pelo grande auxílio na finalização
dessa tese.

Aos meus irmãos, Márcio e Rogério, pela amizade, incentivo e apoio em todas as ocasiões. Por dividirem a alegria dos bons momentos e pelo grande apoio nas dificuldades.

A nossa família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me iluminou até aqui, colocando em meu caminho pessoas formidáveis, verdadeiros exemplos de bondade, integridade, competência e sabedoria.

Aos meus mestres que, com carinho, dedicação e sabedoria, durante toda a minha formação pessoal e profissional, ajudaram a solidificar as bases educacionais e morais estabelecidas em meu núcleo familiar.

Aos pacientes que participaram desse estudo, pelo gesto de cooperação para o desenvolvimento da ciência.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Wilson Mathias Junior, cuja dedicação constante a pesquisa científica será exemplo durante toda a minha vida acadêmica e profissional. Também por dividir suas experiências e conhecimentos e pelo apoio constante durante a elaboração dessa tese.

À Prof. Dra. Jeane Mike Tsutsui, pela ajuda na elaboração dessa tese e por compartilhar suas idéias, incentivando o raciocínio científico.

Ao Dr. Márcio Hiroshi Minami, pela grande ajuda no acompanhamento clínico e inclusão dos pacientes no estudo. Também pelo compartilhamento de soluções e idéias na elaboração dessa tese.

À Dra. Ingrid Kowatsch, pela grande amizade e ajuda na elaboração dessa tese e nos momentos de dificuldade. Pelo companheirismo e incentivo durante a pós-graduação e por compartilhar suas experiências e conhecimentos, tornando mais ameno o caminho percorrido até aqui.

Ao Prof. Dr. Raul Dias dos Santos Filho, pelo incentivo, colaboração e ajuda na elaboração dessa tese. Pela disponibilidade em discutir soluções, experiências e idéias durante todas as fases do estudo, tornando possível o resultado alcançado.

Ao Dr. Marcelo Luiz de Campos Vieira, pelo incentivo e colaboração na análise estatística e descrição dos resultados dessa tese.

Às auxiliares de enfermagem Claudete H. S. Rocha, Elaine Cristina Rodrigues, Ivaneide O. N. Farias, a enfermeira Helena Ogino, e aos demais profissionais da enfermagem que me acompanharam durante o estudo, pelo companheirismo e empenho na realização dos exames dos pacientes.

À Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva Malheiros G. de Oliveira, pelas orientações e compreensão durante a pós-graduação.

À Marisa Goes pelo auxílio na análise das imagens da ultrassonografia vascular.

À Telma Cristina Bastos de Souza, pelo incentivo durante a pós-graduação e ajuda com a documentação dessa tese e junto a FAPESP.

Aos demais médicos assistentes, pós-graduandos, estagiários e funcionários do Serviço de Ecocardiografia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo companheirismo, amizade e convívio diário harmonioso durante esse período.

A todos os colegas que me apoiaram durante esse processo de pós-graduação, assumindo as atividades de assistência aos pacientes, no período de elaboração dessa tese: especialmente aos colegas do Laboratório Fleury.

Aos grandes amigos Janice Caron Nazareth, Marcello Simaro Barduco e Murilo Martins Coelho, pelo apoio constante.

Aos meus tios Luiz Antonio, Márcia, Lucia e Dirceu, Carlos e Silvia e aos avós Clara e Antonio (*i. m.*), pelo amor e dedicação a família e por me acolherem com grande carinho durante um período muito importante em minha formação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Listas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

	pag.
INTRODUÇÃO.....	1
A circulação coronária	4
A reserva de fluxo coronário	6
A ecocardiografia na avaliação da reserva de fluxo microvascular	8
Adenosina: produção endógena e ações farmacológicas	12
Utilização da adenosina na avaliação da reserva coronária.....	14
Efeitos hemodinâmicos da adenosina intravenosa	15
A vasodilatação arterial mediada pelo fluxo	16
Hipótese a ser testada.....	17
OBJETIVOS	18
MÉTODOS.....	20
Critérios de inclusão	22
Aplicáveis a todos os indivíduos.....	22
Aplicáveis aos indivíduos do grupo submetido a tratamento com atorvastatina.....	22
Aplicáveis aos voluntários	22

Critérios de exclusão	23
Relacionados ao método e ao estímulo farmacológico	23
Clínico-laboratoriais	23
Desenho do estudo.....	24
Fluxograma do estudo	24
Avaliação da vasodilatação da artéria braquial	27
Realização do exame	27
Análise das imagens	28
A ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real.....	30
Controles clínicos e eletrocardiográficos	30
Obtenção das imagens.....	31
Determinação quantitativa da perfusão miocárdica.....	35
Análise da placa coronária pela tomografia computadorizada de	
64 detectores.....	39
Quantificação das placas coronárias.....	40
Análise estatística	40
RESULTADOS	42
Casuística.....	43
Características clínicas.....	43
A vasodilatação da artéria braquial mediada pelo fluxo.....	47
Ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real.....	50
Manifestações clínicas	50
Resposta hemodinâmica ao estímulo farmacológico	51
A microcirculação coronária avaliada pela EPMTR.....	52

Fluxo miocárdico ($A_N \times \beta$).....	53
Volume relativo de sangue no miocárdio (A_N).....	55
Velocidade de fluxo sanguíneo miocárdico (β).....	57
DISCUSSÃO.....	59
Casuística.....	60
Características clínicas e efeito do tratamento no perfil lipídico	60
Efeitos hemodinâmicos da adenosina	61
Avaliação da perfusão miocárdica	62
Avaliação da vasodilatação arterial mediada pelo fluxo	68
Limitações	69
Relevância	72
CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS	76

LISTAS



Abreviaturas

ΔD	variação do diâmetro arterial relativamente ao diâmetro basal
A	intensidade acústica de platô ou volume sanguíneo miocárdico
AAS	ácido acetil salicílico
ALT	alanina-amino-transferase
A_M	intensidade acústica de platô no miocárdio
AMP	adenosina monofosfato
A_N	intensidade acústica de platô no miocárdio, normalizada para a cavidade ventricular esquerda ou volume sanguíneo relativo do miocárdio
ANOVA	análise de variância
$A_N \times \beta$	fluxo sanguíneo miocárdico normalizado (absoluto)
ATP	adenosina trifosfato
AV	átrio-ventricular
A_{VE}	Intensidade acústica de platô na cavidade ventricular esquerda
$A \times \beta$	fluxo sanguíneo miocárdico
β	taxa de replecimento do miocárdico por microbolhas ou velocidade de fluxo miocárdico
CPK	creatinofofoquinase
CT	colesterol total
D	diâmetro
DAC	doença arterial coronária
DP	desvio padrão
DPr	duplo produto
ECA	enzima de conversão da angiotensina
ECG	eletrocardiograma
eNOS	sintase do óxido nítrico endotelial
EPMTR	ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real

ERO	espécies reativas de oxigênio
FC	frequência cardíaca
FCL	Fábio de Cerqueira Lario
FGF	fator de crescimento do fibroblasto
FHDE	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
H01	hipótese um
H02	hipótese dois
H03	hipótese três
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL-C	lipoproteína de alta densidade
HF	Hipercolesterolemia
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
LDL-C	lipoproteína de baixa densidade
N	quantidade
NO	óxido nítrico
NS	não significativa
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PFP	perfluoropropano
rec	recuperação
RFC	reserva de fluxo coronário
RI ou ROI	regiões de interesse
t	tempo
TEP	tomografia por emissão de pósitrons
TGC	triglicérides
TSH	hormônio estimulante da tireóide
VE	ventrículo esquerdo
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
vs	<i>versus</i>
W ou e	espessura do feixe de ultrassom

Símbolos

bpm	batimentos por minuto
cm	centímetro
dB	decibel
dL	decilitro
HU	unidades Haunsfield (de densidade radiológica)
kg	quilograma
m	metro
mcg	micrograma
MHz	MegaHertz
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mm Hg	milímetro de mercúrio
ms	milissegundo
n ou N	número
°C	grau Celsius
s	segundo
µg	micrograma
µm	micrometro
%	porcentagem
±	mais ou menos
<	menor que
>	maior que

Tabelas

	pag.
Tabela 1 Características clínicas e ecocardiográficas comparativas entre os indivíduos com hipercolesterolemia e os indivíduos do grupo controle	44
Tabela 2 Características populacionais: fatores de risco para DAC e uso de medicamentos	45
Tabela 3 Perfil lipídico e glicemia do grupo HF e do grupo Controle .	46
Tabela 4 Comparação dos diâmetros e da vasodilatação da artéria braquial mediada pelo fluxo entre os grupos	48
Tabela 5 Características hemodinâmicas durante a EPMTR para os grupos HF e Controle	52
Tabela 6 Comparação dos parâmetros de medidas quantitativas obtidas por ecocardiografia com perfusão miocárdica em tempo real sob estresse pela adenosina	53

Figuras

	pag.
Figura 1 Ilustração do modelo de avaliação da perfusão miocárdica proposto por Wei e colaboradores	9
Figura 2 Demonstração do reenchimento miocárdico com microbolhas nos batimentos posteriores a um “flash” e método de cálculo do fluxo miocárdico regional por ecocardiografia com perfusão miocárdica em tempo real ..	10
Figura 3 Fluxograma do estudo	26
Figura 4 Reprodução da tela do <i>software</i> Q-Lab 5.0 [®] (Philips Medical systems, Bothell, WA, USA) durante quantificação do diâmetro da artéria braquial	29
Figura 5 Exemplo de quantificação do diâmetro da artéria braquial com o <i>software</i> Q-Lab 5.0 [®] (Philips Medical systems, Bothell, WA). A (basal) e B (hiperemia): sem ampliação para definição do pico da onda R no ECG. C (basal) e D (hiperemia): com ampliação para melhor delimitação da interface entre o lume e a parede arterial.....	29
Figura 6 Protocolo de infusão adenosina e contraste durante a EPMTR	33
Figura 7 Esquema da segmentação ventricular esquerda para disposição das regiões de interesse nos 17 segmentos do VE	34
Figura 8 Exemplo de imagem ecocardiográfica da destruição das microbolhas no miocárdio após um pulso ultrassônico de alto índice mecânico	35
Figura 9 Disposição das regiões de interesse nos 17 segmentos do VE durante a análise da perfusão miocárdica por ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real no <i>software</i> Q-lab 5.0 [®] (Philips Medical systems, Bothell, WA, USA)	38

Figura 10	Quantificação da perfusão miocárdica pelo <i>software</i> Q-lab [®] (Philips Medical systems, Bothell, WA, USA)	39
Figura 11	Vasodilatação mediada pelo fluxo nos grupos HF e Controle nas duas fases do estudo	48
Figura 12	Diâmetro da artéria braquial no repouso, nos dois grupos e nos dois momentos do estudo	49
Figura 13	Diâmetro da artéria braquial após reperfusão, nos dois grupos e nos dois momentos do estudo	50
Figura 14	Valor da reserva de fluxo miocárdico ($A_N \times \beta$) para os grupos Controle e HF nas duas etapas do estudo	54
Figura 15	Fluxo sanguíneo miocárdico ($A_N \times \beta$) nos grupos HF e Controle na condição de repouso, nas duas fases do estudo	55
Figura 16	Reserva do volume sanguíneo miocárdico relativo – A_N – dos grupos HF e Controle, nas duas fases do estudo	56
Figura 17	Volume sanguíneo miocárdico relativo – A_N – dos grupos HF e Controle na condição de repouso, nas duas fases do estudo	56
Figura 18	Volume sanguíneo miocárdico relativo – A_N – dos grupos HF e Controle na condição de hiperemia (durante a infusão de adenosina), nas duas fases do estudo	57
Figura 19	Valor da reserva de β para os grupos Controle e HF nas duas etapas do estudo	58
Figura 20	Taxa de repleenchimento miocárdico – β – dos grupos HF e Controle na condição de repouso, nas duas fases do estudo	59

RESUMO



Lario FC. Estudo da reserva de perfusão miocárdica pelo ecocardiograma com contraste em tempo real, em indivíduos com hipercolesterolemia grave, antes e após tratamento com inibidores da HMG-CoA redutase [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 108p.

INTRODUÇÃO: A hipercolesterolemia provoca alterações inflamatórias no sistema cardiovascular, induzindo disfunção endotelial e mudanças estruturais na microcirculação, com alterações significativas da homeostase vascular, processo este reversível com o tratamento hipolipemiante. Clinicamente, tais fenômenos podem ser demonstrados pela avaliação da reserva de fluxo coronário e da reatividade vascular periférica. A ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real (EPMTR) possui características que a tornam ideal para a avaliação da microcirculação coronária, como a utilização de contrastes intravasculares, além de ótimas resoluções temporal e espacial. **MÉTODOS:** 16 pacientes com hipercolesterolemia e sem lesões coronárias obstrutivas (grupo HF) e 10 indivíduos saudáveis, sem doença arterial coronária obstrutiva estabelecida (grupo controle) foram avaliados por EPMTR e por ultrassonografia da artéria braquial em dois momentos: pré-tratamento com atorvastatina no grupo HF (período livre de medicação >6 semanas) e 12 semanas após o primeiro exame. A análise do fluxo miocárdico foi realizada nos 17 segmentos do ventrículo esquerdo obtendo-se índices de volume de sangue relativo no miocárdio (A_N), da velocidade do fluxo (β) e do fluxo miocárdico absoluto ($A_N \times \beta$) na condição de repouso e durante a vasodilatação com adenosina. A reserva de fluxo foi definida como a razão entre o fluxo durante vasodilatação e o fluxo do repouso. Para estudo da reatividade vascular periférica, todos os indivíduos foram submetidos à ultrassonografia da artéria braquial, com avaliação dos diâmetros da artéria braquial antes e depois de um período de isquemia de 5 minutos. **RESULTADOS:** Os dois grupos foram comparáveis quanto à idade, sexo, peso, superfície corpórea, índice de massa corpórea, índice de massa do VE, frequência cardíaca e pressões arteriais sistólica e diastólica, tanto no repouso quanto durante a infusão de adenosina. Os valores evolutivos de LDL-C (mg.dL^{-1}) nos dois momentos foram 106 ± 36 e 107 ± 35 ; $p = \text{NS}$ para o grupo controle vs 278 ± 48 e 172 ± 71 ; $p < 0,001$ para o grupo HF. Na avaliação inicial, a dilatação braquial estava reduzida nos pacientes do grupo HF $0,08 \pm 0,04$ vs $0,15 \pm 0,02$; $p < 0,001$ relativamente ao grupo controle, com aumento do diâmetro arterial basal (mm): $3,42 \pm 0,63$ vs $3,07 \pm 0,53$; $p < 0,001$. O grupo HF, quando comparado ao grupo controle na avaliação inicial, apresentava valores mais altos de A_N : (dB) $0,56 \pm 0,08$ vs $0,49 \pm 0,05$; $p = 0,02$, de β (s^{-1}) $0,56 \pm 0,14$ vs $0,45 \pm 0,04$; $p = 0,02$ e $A_N \times \beta$: ($\text{dB.dB}^{-1} \text{s}^{-1}$) $0,28 \pm 0,06$ vs $0,20 \pm 0,02$; $p < 0,001$, maiores valores de A_N : durante infusão de adenosina $0,64 \pm 0,08$ vs $0,57 \pm 0,06$; $p = 0,001$ e menores reservas de β : $2,59 \pm 0,61$ vs $3,25 \pm 0,45$; $p = 0,001$ e de $A_N \times \beta$: $2,78 \pm 0,71$ vs $3,43 \pm 0,66$; $p = 0,03$. Após o uso de atorvastatina, as alterações foram revertidas, tanto na circulação periférica quanto na

coronária. **CONCLUSÕES:** A EPMTR mostrou que em indivíduos com hipercolesterolemia e sem doença coronária obstrutiva existe aumento do fluxo microvascular em repouso e redução da reserva de fluxo miocárdico. Após o tratamento com atorvastatina houve normalização do fluxo em repouso. Adicionalmente, alterações similares ocorreram na circulação periférica dos indivíduos hipercolesterolêmicos, revertidas por utilização da atorvastatina.

Descritores: hipercolesterolemia; ecocardiografia de contraste; circulação coronária; microcirculação; fisiologia cardiovascular; endotélio

SUMMARY

Lario FC. Evaluation of myocardial perfusion reserve in severe hypercholesterolemic patients with real time contrast echocardiography, before and after treatment with HMG-CoA reductase inhibitors [thesis]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 108p.

BACKGROUND: Hypercholesterolemia induces inflammatory changes on the cardiovascular system, causing endothelial dysfunction and structural alterations of microcirculation, with substantial imbalance of vascular homeostasis. Reduction of blood cholesterol levels can stop these processes. These circulation alterations can be demonstrated by coronary flow reserve and peripheral vascular reactivity evaluation. Real time myocardial perfusion echocardiography (EPMTR) is an excellent method to demonstrate coronary microcirculation alterations, as ultrasound contrast agent has rheological properties close to red cells. Additionally, EPMTR has optimal spatial and temporal resolutions. **METHODS:** 16 patients with hypercholesterolemia (group-HF) without overt obstructive coronary disease and 10 healthy volunteers (group-C) were evaluated by EPMTR and vascular ultrasound in 2 moments: before atorvastatin treatment (group-HF, >6 weeks free of statin) and 12 weeks after beginning medication (group-HF), or 12 weeks after the first evaluation (group-C). For myocardial blood flow evaluation, the left ventricle was divided into 17 segments, and indexes of myocardial blood volume (A_N), blood flow velocity (β), and myocardial blood flow ($A_N \times \beta$) were obtained for each myocardial segment at rest condition and after adenosine infusion. Myocardial flow reserve was calculated as the hyperemic to rest values of A_N , β e $A_N \times \beta$. Peripheral vascular reactivity was evaluated by vascular ultrasound. Measures of braquial artery diameter were obtained before and after 5 minutes of arterial flow occlusion. **RESULTS:** Both groups were comparable for age, sex, body weight, body surface area, body mass index, left ventricular mass index, heart rate, and systolic and diastolic arterial blood pressure. These variables were also comparable, under basal or adenosine stress conditions. LDL-C values (mg.dL^{-1}) in different moments (intra-group) were 106 ± 36 and 107 ± 35 ; $p = \text{NS}$ for group-C vs 278 ± 48 and 172 ± 71 ; $p < 0,001$ for group-HF. Group-HF as compared to group-C had higher initial resting values of A_N (dB): $0,56 \pm 0,08$ vs $0,49 \pm 0,05$; $p = 0,02$, β (s^{-1}): $0,56 \pm 0,14$ vs $0,45 \pm 0,04$; $p = 0,02$, and $A_N \times \beta$ ($\text{dBdB}^{-1}\text{s}^{-1}$): $0,28 \pm 0,06$ vs $0,20 \pm 0,02$; $p < 0,001$, and higher hyperemic value of A_N $0,64 \pm 0,08$ vs $0,57 \pm 0,06$; $p = 0,04$, and lesser reserves of β $2,59 \pm 0,61$ vs $3,25 \pm 0,45$; $p = 0,01$ and of $A_N \times \beta$: $2,78 \pm 0,71$ vs $3,43 \pm 0,66$; $p = 0,03$. After atorvastatin treatment no difference was observed at rest, hyperemic and reserve values of A_N , β and $A_N \times \beta$ between the groups. **CONCLUSION:** In patients with hypercholesterolemia and without coronary obstruction, there was augmented myocardial blood flow and reduced coronary flow reserve at rest, compared to healthy volunteers. After atorvastatin treatment at rest myocardial blood flow was normalized in those patients. Additionally, similar

alterations in peripheral circulation could be demonstrated in hypercholesterolemia, and were reverted with atorvastatin.

Keywords: hypercholesterolemia; contrast echocardiography; coronary circulation; microcirculation; cardiovascular physiology; endothelium

INTRODUÇÃO

A aterosclerose é a principal causa de mortalidade no mundo desenvolvido.¹ O início do processo aterosclerótico ocorre ainda na infância, com progressão silenciosa durante um longo período pré-clínico, e eventuais manifestações clínicas a partir da meia idade.² Nos últimos 30 anos, se tornou claro que o início e a progressão da doença dependem de profundas mudanças dinâmicas na biologia vascular.³

O desenvolvimento do conceito sobre os fatores de risco para doença arterial coronária evoluiu de estudos epidemiológicos prospectivos nos Estados Unidos e Europa, que utilizaram critérios de causalidade para estabelecer os principais fatores de risco independentes para aterosclerose: hipertensão, tabagismo, diabetes melito e hipercolesterolemia que é um dos pilares do desenvolvimento da placa aterosclerótica.⁴⁻⁹

A lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) é o fator aterogênico primário, com ação pró-inflamatória, intensificada após a oxidação por interação com espécies reativas de oxigênio nos macrófagos.¹⁰⁻¹³ Um dos efeitos iniciais da inflamação é a disfunção endotelial, que precede as mudanças estruturais da placa aterosclerótica,¹⁴⁻¹⁶ com alterações na sinalização celular de um estado quiescente mediado por óxido nítrico (NO) para ativação mediada por produção de espécies reativas de oxigênio.

A ativação endotelial e a sinalização por espécies reativas de oxigênio, embora façam parte da resposta de defesa normal do hospedeiro, também podem contribuir para a aterogênese e para as complicações da aterosclerose (eventos clínicos), dependendo da natureza, extensão, duração e combinação dos estímulos pró-inflamatórios.¹⁷⁻¹⁹

A produção crônica de espécies reativas do oxigênio (ERO) pode exceder a capacidade dos mecanismos antioxidantes celulares enzimáticos e não enzimáticos, contribuindo para a doença vascular aterosclerótica por indução de ativação endotelial constante,²⁰ o que pode ocorrer em determinadas condições como hipóxia, alterações metabólicas referentes ao aumento da oferta lipídica (aumento dos ácidos graxos circulantes) como acontece na obesidade e no diabetes melito,^{21, 22} ou ainda, por condições que provoquem aumento do estresse oxidativo, e geram disfunção e lesão mitocondrial, como o tabagismo e a hipercolesterolemia, por exemplo.²³

Esse processo, em última análise, pode levar a alterações da sinalização celular e do metabolismo energético das células, com aumento da produção e acúmulo de produtos metabólicos que podem alterar o tônus dos vasos sanguíneos (provocar vasodilatação, como o peróxido de hidrogênio),²⁴ ou, até mesmo, induzir a apoptose celular.²⁵

Em modelos experimentais de aterosclerose, o aumento do estresse oxidativo provocado por fatores de risco cardiovascular como a hipercolesterolemia e a hipertensão, estão associados a alterações da homeostase vascular e a neovascularização do miocárdio²⁶, relacionada aos aumentos da produção e da atividade de fatores de crescimento pró-angiogênicos como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento do fibroblasto (FGF).²⁶⁻²⁸

A hipercolesterolemia pode, então, modificar significativamente a homeostase vascular coronária, seja por alterações na função endotelial, ou por alterações estruturais circulatórias provocadas, tanto por formação das

placas ateroscleróticas na parede arterial, quanto por alterações estruturais microcirculatórias (neovascularização miocárdica). O processo aterosclerótico está associado, ainda, à disfunção mitocondrial e aumento do estresse oxidativo, com elevação da produção e acúmulo de metabólitos vasoativos no miocárdio, o que também poderia contribuir para as alterações da regulação do fluxo coronário.

A circulação coronária

Existem ao redor de 45mL de sangue na circulação coronária humana em um adulto (volume sanguíneo coronário), que se distribuem de forma aproximadamente igual entre as redes arterial, capilar e venosa.²⁹ Em condições de repouso, em torno de 8% da massa ventricular esquerda é constituída por sangue presente na microcirculação (volume sanguíneo miocárdico), e 90% deste se encontra nos capilares. Apenas metade dos capilares, em condições de repouso, está “recrutada”, ou seja, apresenta fluxo sanguíneo.³⁰ A velocidade do sangue nos vasos coronários está relacionada ao seu tamanho: nos capilares, que apresentam comprimento médio de 0,5mm a 1mm e diâmetro médio de 7 μ m, e em condições de repouso, é de 1mms⁻¹.³¹

O sistema arterial coronário pode ser dividido de forma didática em três compartimentos.^{32, 33} O compartimento proximal, representado por grandes artérias epicárdicas, com 500 μ m até 2-5mm, tem função de condutância e oferecem pouca resistência ao fluxo, que não é afetado por

metabólicos miocárdicos, mas, principalmente, por alterações estruturais na parede arterial (placas de ateroma). O tônus das artérias epicárdicas é regulado, principalmente, por vasodilatadores endoteliais dependentes do fluxo sanguíneo (estresse de cisalhamento), reflexos miogênicos da parede arterial, substâncias vasoativas circulantes e estímulos nervosos.^{34, 35}

O compartimento intermediário, composto por pré-arteríolas com aproximadamente 100µm a 500µm, não está sob controle direto dos metabólitos miocárdicos em virtude de sua posição extra-miocárdica e da espessura da parede arterial. Tem como função manter o controle da pressão na origem das arteríolas. Essa função de autorregulação é mediada também por reflexos miogênicos e vasodilatação dependente do fluxo.^{32, 36}

O compartimento mais distal é representado pelas arteríolas intramurais, com menos de 100µm de diâmetro, que oferecem uma grande resistência ao fluxo, e também por capilares e vênulas, está sob controle direto dos metabólitos difusíveis do miocárdio, e mantém o equilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio.^{24, 37}

O fluxo sanguíneo, na microcirculação coronária, é regulado basicamente por dois mecanismos principais: o aumento da velocidade de fluxo microvascular em resposta a vasodilatação coronária ou aos estímulos metabólicos,^{38, 39} e o “recrutamento” capilar (aumento do número de capilares com fluxo sanguíneo), secundário aos estímulos metabólicos desencadeados por aumento do consumo miocárdico de oxigênio.^{24, 40}

A pressão capilar hidrostática é mantida constante dentro do miocárdio, em torno de 30mmHg, com pressões pré- e pós-capilares de

aproximadamente 45mmHg e 15mmHg, respectivamente.⁴¹ As arteríolas coronárias (150-300µm), agem como vasos de resistência capazes de regular o fluxo arteriolar, mantendo a pressão capilar constante (autorregulação) por integração dos diversos estímulos, que agem de maneira integrada e compensatória, para manter essa homeostase circulatória.⁴²⁻⁵⁰

As vênulas coronárias também possuem tênues respostas de reatividade muscular lisa, e controlam a resistência local alterando as propriedades reológicas do sangue. Sua superfície endotelial expressa uma variedade de moléculas de adesão, responsáveis pela interação com leucócitos durante a inflamação e lesão tecidual.^{51, 52}

Uma forma de avaliar a integridade desses mecanismos homeostáticos da circulação coronária, é analisar a reserva de fluxo coronário.⁵⁶

A reserva de fluxo coronário

A reserva de fluxo coronário (RFC), definida como a razão entre o fluxo coronário máximo e o basal, tem sido utilizada como uma variável indireta para avaliar funcionalmente a circulação coronária.⁵³

É uma medida integrada do fluxo coronário nas grandes artérias coronárias epicárdicas e na microcirculação. Portanto, RFC anormal pode ser resultado, ou do estreitamento das artérias epicárdicas, ou disfunção microcirculatória, mesmo na ausência de estenoses epicárdicas detectáveis.

A disfunção microcirculatória pode ser provocada por mudanças estruturais (como a neovascularização miocárdica)²⁷ e alterações funcionais, que podem envolver fatores neuro-humorais⁵⁶⁻⁵⁸ ou disfunção endotelial,⁵⁹ alterações da inervação autonômica,⁶⁰⁻⁶³ e mudanças extravasculares (por exemplo, pressão intramiocárdica aumentada).⁶⁴⁻⁶⁸

Já foi demonstrado que a reserva de fluxo coronário pode estar diminuída em função de alterações da microcirculação coronária em condições como hipercolesterolemia,^{69, 70} hipertensão arterial sistêmica,^{68, 71, 72} diabete melito,⁷³⁻⁷⁵ Síndrome X,^{76, 77} cardiomiopatia hipertrófica⁶⁵ e doenças vasculares inflamatórias.⁷⁸

Em estudos experimentais em animais, a disfunção endotelial e redução da reserva de fluxo coronário foram detectadas antes mesmo da formação de placas ateroscleróticas.⁷⁹

Em humanos, a diminuição da reserva de fluxo coronário já foi demonstrada em pacientes com doença arterial coronária (DAC), tanto em vasos moderadamente estenosados quanto nas artérias sem obstrução,⁸⁰ e também em indivíduos com artérias angiograficamente normais, na presença de alto risco para doença arterial coronária ou hipercolesterolemia familiar.^{70,}

81-85

A relação entre hipercolesterolemia e as alterações na reserva de fluxo coronário, mesmo na ausência de lesões coronárias epicárdicas obstrutivas, é reforçada ainda por diversos estudos que demonstraram melhora significativa na reserva de fluxo coronário e na função endotelial, após a redução dos níveis de colesterol total e LDL-C por tratamento com

estatinas, com a reversão da hipercolesterolemia por meio de dieta, ou ainda por aférese em indivíduos com hipercolesterolemia familiar.⁸⁶⁻⁸⁹

Diversos métodos têm sido utilizados para avaliação das alterações da microcirculação coronária, como a tomografia por emissão de pósitrons (TEP),^{86, 90, 91} a ressonância nuclear magnética⁷⁷ e a ecocardiografia com contraste.^{37, 40, 92, 93}

A ecocardiografia na avaliação da reserva de fluxo microvascular

A ecocardiografia com perfusão miocárdica em tempo real (EPMTR) é um método ideal para medir o fluxo microcirculatório coronário por sua excelente resolução espacial e temporal, além de utilizar agentes de contraste ecocardiográfico com comportamento intravascular muito semelhante ao das hemácias.^{94, 95} O contraste ecocardiográfico consiste de microbolhas preenchidas com gás, ótimas refratoras de ultrassom, utilizadas para acompanhar a passagem das hemácias pelo tecido.⁹⁶

As microbolhas são administradas em infusão contínua e, após 2 a 3 minutos do início da infusão, é atingido um estado de equilíbrio, quando sua concentração, em qualquer amostra sanguínea (cavidade ventricular esquerda, miocárdio, etc.), se torna constante e é proporcional ao volume sanguíneo dessa amostra.⁹³ Na EPMTR, a emissão de um pulso de alta energia ultrassônica no estado de equilíbrio, destrói as microbolhas dentro do miocárdio. Depois disso, pode-se observar o preenchimento progressivo de toda a microcirculação em um determinado campo ultrassônico (Figura 1)

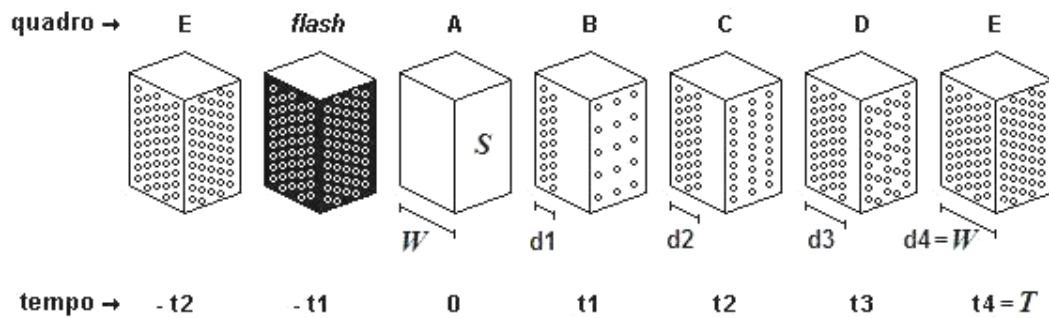


Figura 1 - Ilustração do modelo de avaliação da perfusão miocárdica proposto por Wei e colaboradores.⁹⁷ Com a infusão contínua do contraste, ocorre saturação do miocárdio por microbolhas (quadro E). A aplicação de pulsos ultrassônicos de alta intensidade (“flash”) provoca a destruição das microbolhas no miocárdio (quadro A) e o subsequente reenchimento (quadros B a E). d = distância percorrida pelas microbolhas; S = região de interesse considerada; t = tempo; T = tempo no qual ocorreu saturação das microbolhas no campo ultrassônico; W = espessura do campo ultrassônico.

O preenchimento do miocárdio com as microbolhas em função do tempo pode, então, ser medido pelo aumento da intensidade acústica a cada quadro da seqüência de imagens, o que resulta em uma curva de intensidade acústica *versus* tempo de preenchimento do miocárdio com as microbolhas, que pode ser matematicamente calculada, com aproximação, com auxílio da função seguinte⁹³:

$$y = A (1 - e^{-\beta t})$$

Onde:

- t (segundos) é o tempo;
- y (decibéis) é a intensidade acústica no tempo t ;
- A (decibéis) é a intensidade acústica de platô (concentração máxima das microbolhas);
- β (s^{-1}) é a taxa de reenchimento com as microbolhas;
- e (mm) é a espessura do feixe ultrassônico

São extraídas, destarte, duas variáveis: a taxa de preenchimento do miocárdio com as microbolhas “ β ” e, após a saturação microcirculatória, a intensidade acústica máxima no miocárdio (platô de intensidade acústica): “A”, que é proporcional ao volume sanguíneo miocárdico.⁹⁷ Como o fluxo é resultante de um volume de sangue que se move a uma certa velocidade média, o produto entre o volume sanguíneo do miocárdio (A) e a velocidade do sangue no miocárdio (β) reflete o fluxo miocárdico microvascular (Figura 2).

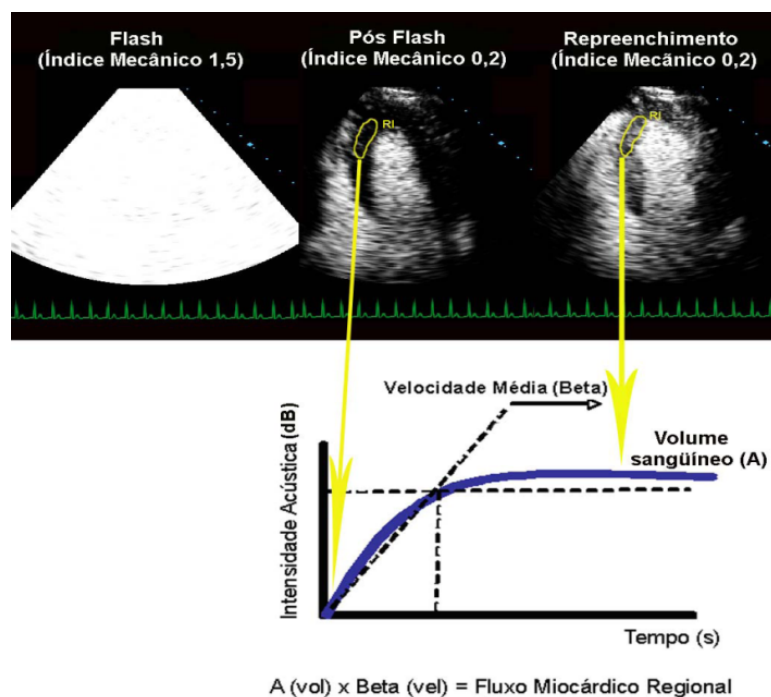


Figura 2 - Demonstração do repleenchimento miocárdico por microbolhas nos batimentos posteriores a um “*flash*” e método de cálculo do fluxo miocárdico regional pela ecocardiografia com perfusão miocárdica em tempo real. RI = região de interesse; vel = velocidade; vol = volume.

Sob condições fisiológicas, o volume de sangue miocárdico é regulado pela demanda de oxigênio dos miócitos. Um discreto aumento na

demanda de O₂ resulta em um leve aumento na velocidade sanguínea nos capilares. Aumentos maiores na demanda miocárdica de O₂ estão associados à presença de fluxo sanguíneo em maior número de capilares, o que reflete um aumento no volume sanguíneo miocárdico conforme observado durante a ecocardiografia com perfusão miocárdica em tempo real.^{40, 98}

O contraste ecocardiográfico mais utilizado atualmente é a solução injetável de perflutren (Definity[®], Bristol-Myers Squibb, Canadá) composta por microbolhas de perfluoropropano (PFP) encapsuladas em fosfolípide, ativadas mediante agitação rápida com auxílio de equipamento específico (Vialmix[®], Bristol-Myers Squibb Medical Imaging, N. Billerica, Massachusetts, EUA).^{99, 100}

O componente perfluoropropano (PFP) da solução é rapidamente eliminado da circulação sistêmica pelos pulmões, e, na maioria dos indivíduos, não é mais detectado após 10 minutos. Concentrações máximas são atingidas após 1 ou 2 minutos do início da injeção. Os três componentes lipídicos do perflutren são naturalmente encontrados na circulação sanguínea humana. A quantidade desses lipídios em uma dose do contraste ecocardiográfico representa menos de 1% dos níveis dos mesmos no plasma e seguem vias metabólicas similares às dos fosfolipídios naturais.¹⁰¹

A quantificação absoluta do fluxo miocárdico, entretanto, pode variar, dependendo da concentração do contraste e de outros fatores, como ângulo de análise da estrutura (posição onde se coloca o transdutor de ultrassom), e ajustes do aparelho em cada estudo.¹⁰² Para resolver essa limitação,

Vogel e colaboradores⁹³ propuseram a normalização ou correção da intensidade acústica obtida nas regiões de interesse no miocárdico (A_M), dividindo-a pelo valor obtido em regiões de interesse na cavidade ventricular esquerda adjacente (A_{VE}), e demonstraram que o valor da intensidade acústica normalizada (A_N) obtido dessa forma, reflete o volume sanguíneo relativo do miocárdico, tornando possível a comparação entre a reserva de fluxo miocárdico obtido por EPMTR com a obtida com a tomografia por emissão de pósitrons, com a vantagem adicional de fornecer os valores do volume sanguíneo miocárdico relativo (A_N) e da velocidade de fluxo miocárdico (β), além do valor absoluto do fluxo miocárdico ($A_N \times \beta$).^{93, 103}

Como o produto de A_N por β representa um índice de fluxo microvascular, pode-se analisar a microcirculação tanto em repouso, quanto durante vasodilatação obtida sob estresse físico ou farmacológico.^{40, 98, 104}

Dentre os vasodilatadores, a adenosina representa uma ótima escolha para essa avaliação, pois induz vasodilatação coronária potente, possui ótimo perfil de segurança nas doses utilizadas para este fim, além de apresentar eliminação ultrarrápida da circulação sanguínea, e de existir ampla experiência até então acumulada com o seu uso para a avaliação da reserva de fluxo coronário.^{98, 105}

Adenosina: produção endógena e ações farmacológicas

A adenosina é um vasodilatador coronário potente, que atua como um dos principais mediadores na regulação metabólica do fluxo local.^{106, 107} É

produzida em pequenas quantidades como parte do metabolismo celular normal e em grandes quantidades durante condições de isquemia ou hipóxia tissular por catabolismo dos nucleotídeos adenina, nas regiões intracelulares, nos momentos em que a utilização de adenosina trifosfato ultrapassa a capacidade das células do miocárdio em sintetizar compostos de fosfato de alta energia, em um processo dependente de fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. Assim, ocorre transformação de trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina, sob a ação da enzima 5-nucleotidase.

A adenosina difunde-se ao interstício e sangue venoso coronário, e o aumento na concentração intersticial é paralelo a elevação do fluxo coronário e a maior produção dependente de relações desfavoráveis entre a oferta e o consumo de oxigênio miocárdico.¹⁰⁸⁻¹¹⁰

No espaço extracelular, os nucleotídeos adenina, incluindo o monofosfato de adenosina, AMP cíclico e ATP, podem ser liberados por células ou também por terminações nervosas adrenérgicas e são degradados até adenosina por meio de ecto-nucleotidases.¹¹¹

Os efeitos da adenosina no coração são mediados principalmente por receptores específicos, denominados A1 e A2.

A interação com os receptores A1 na superfície celular reduz a frequência cardíaca, a contratilidade atrial e a velocidade de condução átrio-ventricular, e antagoniza o estímulo das catecolaminas, além de diminuir a atividade das células marca-passo. Esses efeitos são mediados por proteínas G inibitórias, que reduzem a ativação da adenilato-ciclase. Esses

receptores são encontrados em maior número no cérebro, medula espinhal, testículos e tecidos adiposos e, em menor número nos rins, baço e coração. Ainda em relação à atuação em receptores A1 existentes em regiões proximais do nó átrio-ventricular (AV), verifica-se diminuição da condução do estímulo e inibição do nó sinusal, quando em doses elevadas, possibilitando o aparecimento de bradicardia e bloqueio átrio-ventricular.¹⁰⁸

A interação com os receptores A2, presentes na superfície de células musculares lisas, induz a ativação da enzima adenilato-ciclase, com consequente aumento na produção de AMP cíclico. Ocorre então ativação de grandes canais de condutância de potássio sensíveis ao cálcio nas artérias coronárias e de canais de potássio sensíveis ao trifosfato de adenosina (ATP) nas células musculares lisas vasculares, o que culmina com relaxamento das fibras musculares lisas e queda da resistência em vasos intramiocárdicos, provocando vasodilatação coronária, seguindo-se de aumento do fluxo coronário.¹¹²

Ressalta-se ainda a inibição vagal e ação no sistema nervoso central, em pequenas doses, com consequente elevação da frequência cardíaca, efeito antiadrenérgico, diminuição da lesão de reperfusão e potente dilatação arteriolar.^{113, 114}

Utilização da adenosina na avaliação da reserva coronária

A injeção de adenosina intravenosa provoca um aumento de aproximadamente 4,4 vezes na velocidade de fluxo sanguíneo coronário, em artérias livres de obstrução, quando administrada por via venosa periférica, a

uma velocidade de infusão de $140\mu\text{gkg}^{-1}\text{min}^{-1}$, que gera elevação da velocidade de fluxo coronário similar a atingida com o uso de papaverina intracoronária. Na dose de $140\mu\text{gkg}^{-1}\text{min}^{-1}$ de adenosina intravenosa, o aumento máximo do fluxo é atingido em 92% dos indivíduos. Em doses menores, ocorre ampla flutuação na resposta do fluxo coronário, e pode refletir em mudanças transitórias na concentração de adenosina plasmática; essa flutuação é abolida com a dose de $140\mu\text{gkg}^{-1}\text{min}^{-1}$.¹¹⁵ O aumento máximo da velocidade de fluxo sanguíneo coronário é observado, em média, 55 segundos após o início de infusão nessa dose, conforme avaliado por tomografia por emissão de pósitrons (TEP).⁹⁰

A adenosina exógena, infundida por via intravenosa, apresenta meia vida ultracurta, em torno de dois segundos, graças à rápida incorporação nos glóbulos vermelhos e subsequente metabolização.¹¹⁶

Efeitos hemodinâmicos da adenosina intravenosa

Na condição de vasodilatação provocada pela administração intravenosa ou intracoronária do fármaco, observa-se pequena elevação da frequência cardíaca e diminuição de igual magnitude das pressões arteriais, sistólica e diastólica. Verifica-se também discreto aumento do duplo produto (produto da frequência cardíaca pela pressão arterial sistólica), bem como elevação do débito cardíaco em até 56%, e da pressão capilar pulmonar, tanto em indivíduos controles saudáveis, quanto em portadores de doença arterial coronária.¹¹⁷

Os principais efeitos da administração intravenosa da adenosina na dose de $140\mu\text{gkg}^{-1}\text{min}^{-1}$ incluem desconforto, pressão ou dor torácica (77,2%), calor ou rubor facial (54%), dispnéia (32,9%) e cefaléia (25,7%). Além disso, pequena incidência de bloqueios átrio-ventriculares e broncoespasmo têm sido relatada, sobretudo em pacientes com doenças cardíacas ou pulmonares prévias, embora raramente seja necessária a interrupção do exame.¹¹⁸

A vasodilatação arterial periférica mediada pelo fluxo

A hipercolesterolemia é uma doença sistêmica, por isso a avaliação da circulação periférica é uma outra forma de analisar as alterações da função endotelial por ela provocadas. Isso pode ser feito avaliando-se a vasodilatação da artéria braquial mediada pelo fluxo, com a utilização do ultrassom de alta resolução.¹¹⁹ Já foi observada diminuição dessa resposta em indivíduos com fatores de risco para a aterosclerose,¹²⁰ e sua melhora após o redução dos níveis de colesterol, uso de estatinas, ou mesmo de antioxidantes.¹²¹⁻¹²⁴

O método consiste em avaliar o diâmetro de uma artéria periférica em repouso e durante a vasodilatação máxima que ocorre quando, após um período curto de isquemia por oclusão de uma artéria, existe a liberação de mediadores como a adenosina, íons hidrogênio, fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE), entre outros, no tecido isquêmico, com consequente vasodilatação periférica. Após a desobstrução do fluxo arterial,

ocorre uma hiperemia e conseqüente aumento das forças de cisalhamento na parede da artéria, que estimulam as células endoteliais, e ativam os canais de potássio.^{36, 45, 125} Essa ativação leva ao aumento da entrada de cálcio intracelular, provocando ativação da sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS), que libera óxido nítrico (NO), e provoca relaxamento do músculo liso arterial, e conseqüente vasodilatação, com aumento do diâmetro do vaso.³⁶

Hipótese a ser testada

Postulou-se que a ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real (EPMTR), associada à administração intravenosa de adenosina será capaz de demonstrar melhora na reserva de perfusão miocárdica em pacientes com hipercolesterolemia grave sem DAC obstrutiva, após doze semanas de tratamento com atorvastatina.

Adicionalmente, acredita-se que a EPMTR será capaz de trazer novos conhecimentos a respeito dos padrões de alteração do fluxo microvascular miocárdico induzidos por hipercolesterolemia, porquanto é capaz de avaliar componentes distintos da reserva de fluxo coronário: o aumento da velocidade de fluxo coronário (β) e do volume sanguíneo na microcirculação (A_N), tanto em repouso, quanto em resposta ao estímulo com adenosina.

Como controle dos efeitos da hipercolesterolemia e do tratamento com inibidores da HMG Co-A redutase na função endotelial foi utilizado como padrão a ultrassonografia vascular.

OBJETIVOS

Para testar a hipótese, estabeleceu-se como objetivos:

1. Avaliar pela EPMTR o impacto da hipercolesterolemia grave não controlada sobre a reserva de perfusão miocárdica, antes e após o tratamento com inibidores da HMG-CoA redutase, utilizando como padrão de referência um grupo controle de indivíduos saudáveis, sem evidências de doença arterial coronária estabelecida ou de fatores de risco para o seu desenvolvimento.

2. Avaliar as características da perfusão miocárdica pela EPMTR em indivíduos com hipercolesterolemia grave, comparando-as com um grupo de indivíduos sem fatores de risco para doença arterial coronária, na situação de repouso e sob estresse farmacológico pela adenosina.

3. Adicionalmente, foi verificado se os fenômenos observados na circulação coronária, também ocorrem na circulação periférica, empregando a ultrassonografia de alta resolução para a avaliação da vasodilatação arterial mediada pelo fluxo.

MÉTODOS

No período de março de 2006 a novembro de 2008, em acompanhamento prospectivo, incluiu-se 26 indivíduos com diagnóstico de hipercolesterolemia familiar,¹²⁶ provenientes do ambulatório da Unidade Clínica de Lípidos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP) e um grupo controle de 13 voluntários sem fatores de risco para doença arterial coronária.

A presente investigação foi conduzida nos serviços de Ecocardiografia e do ambulatório da Unidade Clínica de Lípidos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e seu protocolo foi aprovado pela comissão científica desta Instituição, documento N° SDC: 2530/04/150 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, documento N° 1008/04.

Todos os participantes foram informados sobre os procedimentos realizados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Essa pesquisa foi aprovada pelo Conselho Nacional de Saúde (CNS) e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e recebeu o apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, documento N° 2004/16016-4.

Critérios de Inclusão

Aplicáveis a todos os indivíduos:

- idade superior a 18 anos;
- eletrocardiograma normal; e,
- ao ecocardiograma transtorácico, função ventricular esquerda global e segmentar normais com fração de ejeção do ventrículo esquerdo maior ou igual a 0,55 pelo método de Simpson modificado.¹²⁷

Aplicáveis aos indivíduos do grupo submetido a tratamento com atorvastatina:

- níveis séricos de LDL-C maiores que 190mgdL⁻¹; e,
- ausência de tratamento com inibidores da HMG-CoA redutase por pelo menos 6 semanas.

Aplicáveis aos voluntários

- níveis séricos de LDL-C menores que 160mgdL⁻¹;
- ausência de fatores de risco para doença arterial coronária;
- teste ergométrico sem evidência de isquemia miocárdica; e,
- ausência de história de infarto do miocárdio ou angina de peito.

Critérios de Exclusão

Relacionados ao método e ao estímulo farmacológico:

- gestação ou lactação;
- pressão arterial sistólica menor que 90mmHg;
- doença pulmonar obstrutiva crônica ou asma brônquica

descompensadas;

- comunicações intracavitárias com fluxo significativo das câmaras direitas para as esquerdas;

- insuficiência vascular cerebral sintomática;

- utilização de substâncias com cafeína ou metilxantinas nas 24 horas antecedentes a EPMTR;

- história de alergia ou desenvolvimento de hipersensibilidade ao contraste ecocardiográfico (Definity® - Bristol-Myers Squibb - Canada);

- história de hipersensibilidade a adenosina; e,

- impossibilidade de quantificação da perfusão miocárdica por situações inerentes a análise das imagens ecocardiográficas.

Clínico - laboratoriais

- revascularização miocárdica prévia;

- obesidade, definida com índice de massa corpórea $> 30\text{kgm}^{-2}$; ¹²⁸

- hipertensão arterial sistêmica não controlada ou necessidade de indicação, durante o período de estudo, de início ou mudança de terapia medicamentosa com fármacos vasoativos;

- diabetes melito;
- hipertrofia ventricular esquerda no ecocardiograma transtorácico;¹²⁷
- níveis de triglicérides maiores que 400mgdL^{-1} ; e,
- intolerância ou contra-indicação ao uso da atorvastatina, ou efeitos adversos que impedissem a continuidade do tratamento durante o protocolo de estudo;

Desenho do estudo

Prospectivo e controlado.

Fluxograma do estudo

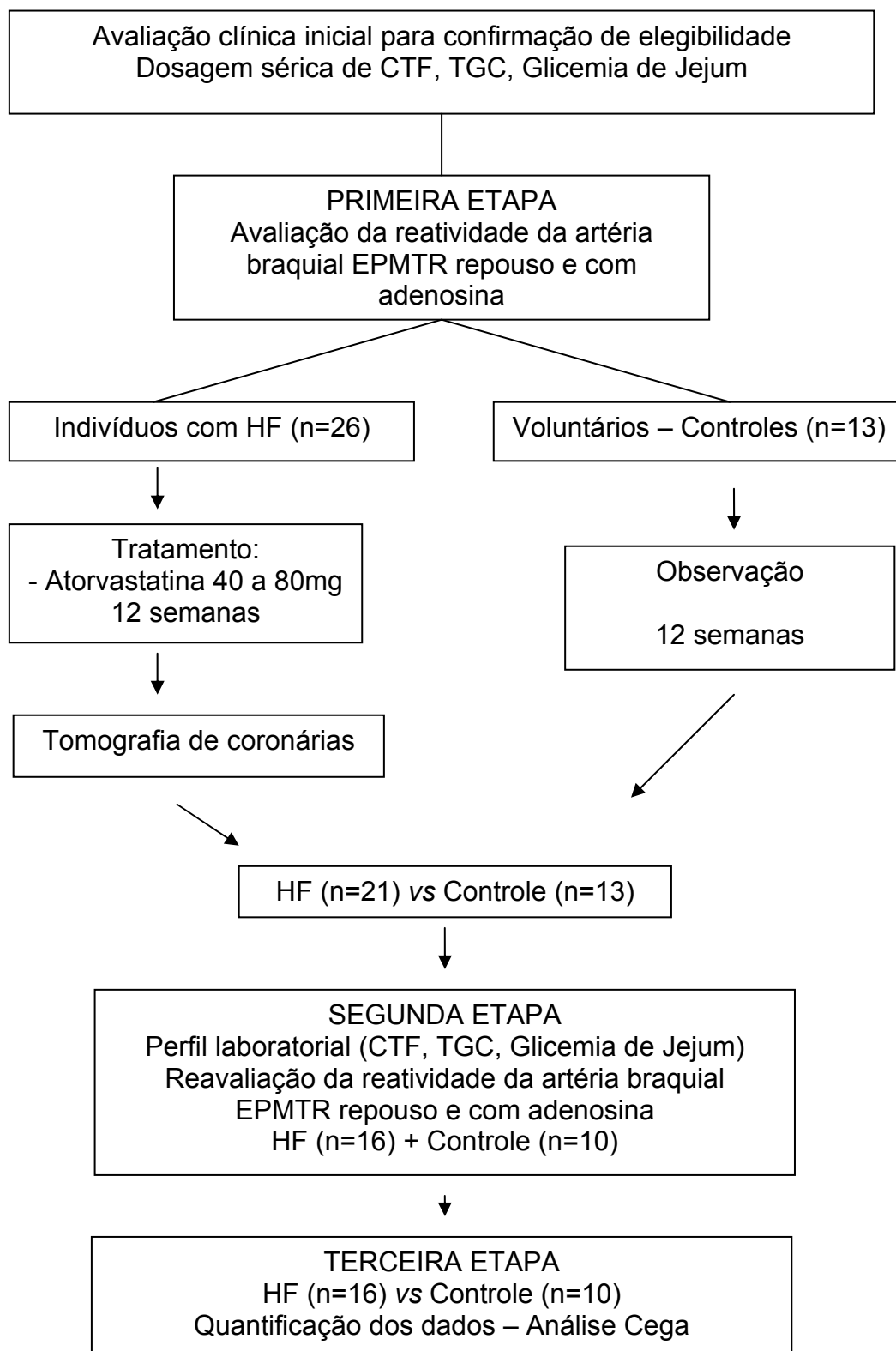
Após avaliação clínica no ambulatório, para confirmação da elegibilidade para o estudo, incluindo uma primeira dosagem de colesterol total e frações, triglicérides, hemograma completo, glicemia de jejum, creatino-fosfoquinase (CPK), alanina-amino-transferase (ALT), e hormônio estimulante da tireóide (TSH), conforme a rotina do ambulatório da Unidade Clínica de Lípidos do InCor HC-FMUSP e, após jejum de 12 horas, foram realizadas a avaliação da vasodilatação mediada pelo fluxo da artéria braquial e a primeira EPMTR para determinação da reserva de fluxo miocárdico na condição de base. Após a realização desses exames os indivíduos com hipercolesterolemia iniciaram o tratamento com atorvastatina (dose mínima de 40mg e máxima de 80mg ao dia).

As medicações vasoativas eventualmente utilizadas durante a primeira avaliação foram suspensas 72 horas antes dos exames, e suas dosagens mantidas constantes durante o período de estudo.

Em um período igual ou superior a 12 semanas de tratamento ininterrupto, confirmado por consulta telefônica direta aos pacientes, estes foram convocados para a reavaliação laboratorial, com dosagem sérica de colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), lipoproteína de alta densidade (HDL-C), triglicérides (TGC) e glicemia de jejum, e para a reavaliação da reatividade da artéria braquial e EPMTR, todos realizados no mesmo período do dia (manhã) e em sequência.

Os portadores de hipercolesterolemia foram submetidos ainda, durante o período de acompanhamento, a uma tomografia de 64 detectores de artérias coronárias para diagnóstico de doença arterial coronária obstrutiva nessa população¹²⁹ (Figura 3).

Após a coleta dos dados de todos os pacientes, esses foram analisados por um único avaliador (FCL) de maneira cega e aleatória.



CTF = colesterol total e frações; EPMTR = ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real; HF = hipercolesterolemia; TGC = triglicérides.

Figura 3 - Fluxograma do estudo.

Avaliação da vasodilatação da artéria braquial

Realização do exame

Os indivíduos, após abstenção, por 24 horas, de álcool, tabaco e de substâncias com derivados de metilxantinas e, por 72 horas, de medicações vasoativas, permaneceram em jejum por um período de 12 horas, e foram submetidos à coleta de uma amostra de sangue para perfil laboratorial anteriormente mencionado.

Foram então avaliados na posição supina, após monitoração eletrocardiográfica, aferição da pressão arterial, com colocação do manguito de pressão arterial no braço esquerdo, seguidos de repouso por 15 minutos.

A imagem da artéria braquial foi obtida utilizando-se um transdutor linear de alta frequência (7-12MHz), acoplado a um aparelho SONOS-7500® (Philips, Bothell, WA, USA). Os ajustes de ganho, profundidade, índice mecânico e compressão foram calibrados para identificação da interface entre o lume e a parede arterial no início do exame, e mantidos constantes durante toda a realização do estudo.¹³⁰

O diâmetro da artéria braquial foi avaliado de forma não invasiva por ultrassonografia de alta resolução, modo bidimensional, posicionando-se o transdutor linear 3cm a 7cm acima da fossa antecubital do braço esquerdo. Após a aquisição das imagens de repouso, contendo 6 a 10 ciclos cardíacos cada uma, totalizando três conjuntos de imagens digitais e 1 minuto de gravação em VHS, o torniquete pneumático (manguito do esfigmomanômetro) localizado na região proximal do braço foi inflado a 250mmHg e mantido assim por 4,5 minutos e, então liberado. Imagem contínua da artéria

braquial foi realizada por 180 segundos, com aquisição de imagens digitais contendo seis ciclos cardíacos, determinados pelo sinal eletrocardiográfico, a cada 30 segundos.^{119, 131}

Todas as imagens foram armazenadas em disco óptico e fitas super-VHS para análise posterior.

Todo o exame foi realizado em sala com ambiente silencioso, com luminosidade constante e temperatura controlada de 23 °C.

Análise das imagens

A vasodilatação arterial mediada pelo fluxo foi avaliada por um mesmo observador (FCL), de maneira cega e aleatória. As aferições do diâmetro da artéria braquial em repouso e entre 60 e 90 segundos após o término da oclusão arterial, foram realizadas utilizando-se software específico (Q-Lab 5.0[®], Philips Medical systems, Bothell, WA, USA), conforme ilustrado na Figura 4. Os diâmetros arteriais, basal e na dilatação máxima, foram obtidos por média aritmética de seis aferições consecutivas, realizadas em coincidência com o pico da onda R no registro do eletrocardiograma. Imagem ampliada foi utilizada para melhor delimitação da interface entre o lume e a parede arterial (Figura 5).

A vasodilatação arterial mediada pelo fluxo (ΔD) foi definida como a razão entre a variação do diâmetro arterial na condição basal e na condição de dilatação máxima, dividida pelo diâmetro arterial na condição basal, conforme fórmula a seguir¹⁸⁰:

$$\Delta D = \frac{\text{diâmetro durante dilatação} - \text{diâmetro basal}}{\text{diâmetro basal}}$$

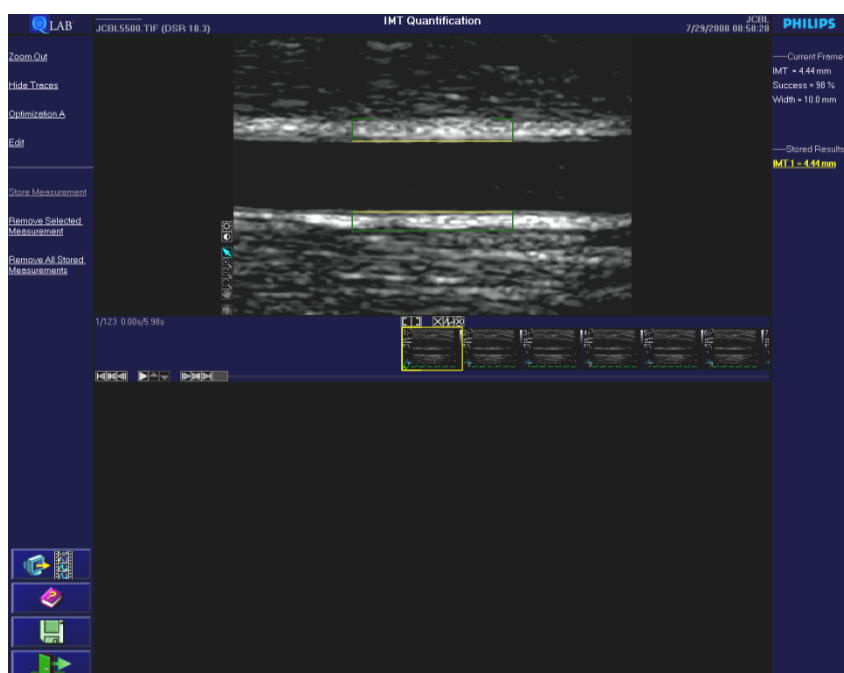


Figura 4 – Reprodução da tela do software Q-Lab 5.0[®] (Philips Medical systems, Bothell, WA, USA) durante quantificação do diâmetro da artéria braquial.

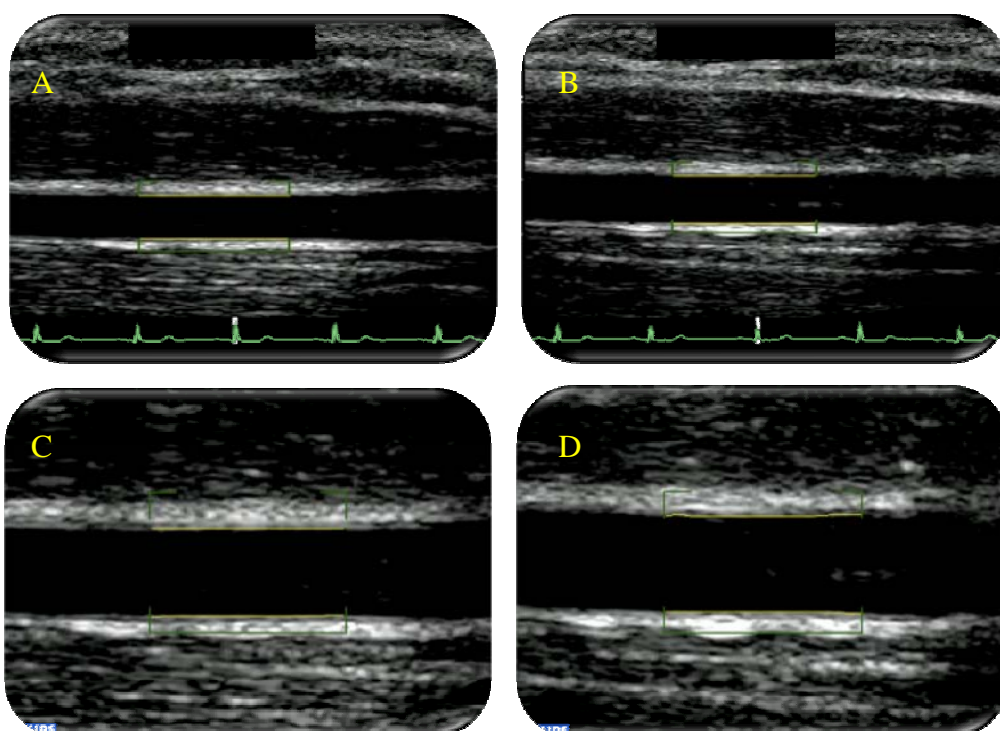


Figura 5 – Exemplo de quantificação do diâmetro da artéria braquial com o software Q-Lab 5.0[®] (Philips Medical systems, Bothell, WA). **A** (basal) e **B** (hiperemia): sem ampliação para definição do pico da onda R no ECG. **C** (basal) e **D** (hiperemia): com ampliação para melhor delimitação da interface entre o lume e a parede arterial.

Ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real (EPMTR)

Controles clínicos e eletrocardiográficos

Após a aquisição das imagens para análise da vasodilatação da artéria braquial mediada pelo fluxo, preparo da pele, monitoração eletrocardiográfica e punções de dois acessos venosos independentes no membro superior direito com cateter venoso tipo GELCO[®] número 22: um para a infusão da solução de adenosina e outro para infusão do contraste ecocardiográfico, o indivíduo foi mantido na mesma maca, em repouso por 15 minutos em decúbito dorsal horizontal.

Foi realizada limpeza com álcool e eventual tricotomia nos locais de fixação dos eletrodos, para obtenção de traçados eletrocardiográficos de boa qualidade.

O sistema de derivações empregado foi o de Mason e Likar¹³² modificado, com posicionamento dos eletrodos dos membros superiores nas regiões infraclaviculares direita e esquerda respectivamente. Os eletrodos dos membros inferiores foram mantidos em posição convencional. Os eletrodos precordiais V1 e V2, foram deslocados para o primeiro espaço intercostal e os eletrodos V3 a V6 foram deslocados dois espaços intercostais para baixo, para permitir a obtenção da imagem ecocardiográfica nos planos padronizados.

Obtenção das imagens

O aparelho utilizado na realização dos exames foi o ecocardiógrafo SONOS-7500[®] (Philips, Bothell, WA, USA), com transdutores de banda larga de 2-3MHz e imagem em segunda harmônica com tecnologia de perfusão miocárdica em tempo real. As imagens ecocardiográficas digitais foram armazenadas em disco óptico para análise posterior.

Após a monitoração eletrocardiográfica, foi realizado o ecocardiograma transtorácico modo M, bidimensional, Doppler, e mapeamento de fluxo em cores, nos planos ecocardiográficos padronizados: paraesternal longitudinal e transversal, apical quatro câmaras, três câmaras e duas câmaras, supraesternal e subcostal. Planos adicionais não padronizados foram utilizados, quando necessários, para análise mais detalhada e diagnóstico adequado.

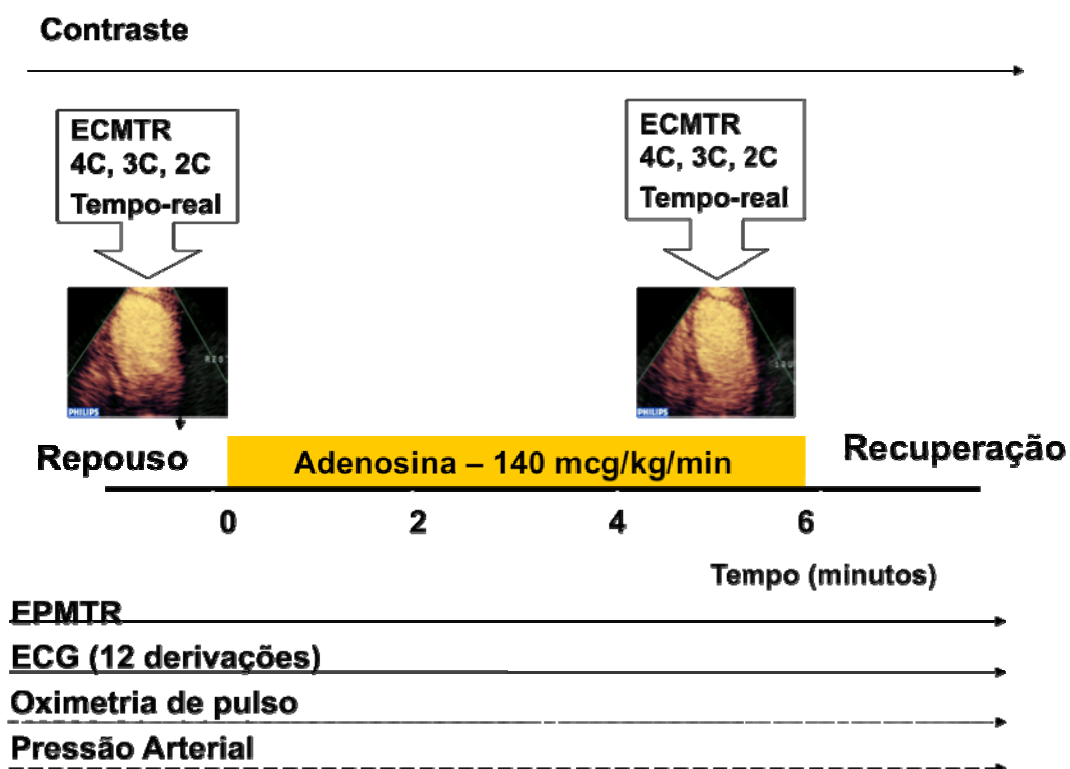
As medições das câmaras cardíacas, da espessura miocárdica, e o cálculo da fração de ejeção pelo método de Simpson e do índice de massa ventricular esquerda, foram realizadas segundo as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.¹³³

Terminado o ecocardiograma transtorácico de repouso, iniciou-se a infusão do contraste de microbolhas, que havia sido preparado pela mistura de 60mL de soro fisiológico a 0,9% e 1,7mL do contraste ecocardiográfico (solução lipídica de perflutren)¹³⁴, previamente aquecido a temperatura ambiente e ativado por agitação em equipamento específico (Vialmix[®]) por 45 segundos. A solução foi administrada com injeção inicial de 2mL a 4mL,

seguida de administração contínua, e a velocidade de infusão foi ajustada até que se conseguisse completa opacificação do ventrículo esquerdo, sem que houvesse o aparecimento de sombra acústica na cavidade ventricular esquerda, acima do plano valvar mitral.

Nesse ponto, a administração da solução de contraste ecocardiográfico foi mantida constante, e assim permaneceu durante a aquisição das imagens basais, e também durante a infusão da adenosina, para aquisição das imagens com vasodilatador.

A infusão de adenosina foi iniciada logo após a aquisição das imagens de repouso, por acesso venoso exclusivo. A solução continha 50mg de adenosina, na concentração de $2,5\text{mgmL}^{-1}$ e foi infundida a velocidade de $140\mu\text{gkg}^{-1}\text{min}^{-1}$, por seis minutos. Um minuto após o início da administração intravenosa da solução de adenosina, controles de pressão arterial, frequência cardíaca e eletrocardiográficos foram realizados, repetidos a cada dois minutos e, adicionalmente, dois minutos após o término da infusão de adenosina. As imagens ecocardiográficas de pico foram obtidas entre o quarto e o sexto minuto da infusão da solução de adenosina, seguindo a mesma padronização das imagens do repouso, para permitir a comparação entre os dois momentos (Figura 6).



ECMTR = ecocardiografia com contraste em tempo real. ECG = eletrocardiograma; EPMTR = ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real. 4C, 3C e 2C = planos apicais de quatro câmaras, duas e três câmaras.

Figura 6 – Protocolo de infusão adenosina e contraste durante a EPMTR.

O ventrículo esquerdo foi avaliado em três planos ecocardiográficos padronizados: apical quatro, três e duas câmaras e em planos adicionais não padronizados, para permitir a visualização adequada dos 17 segmentos, conforme as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia.¹³⁵ (Figura 7)

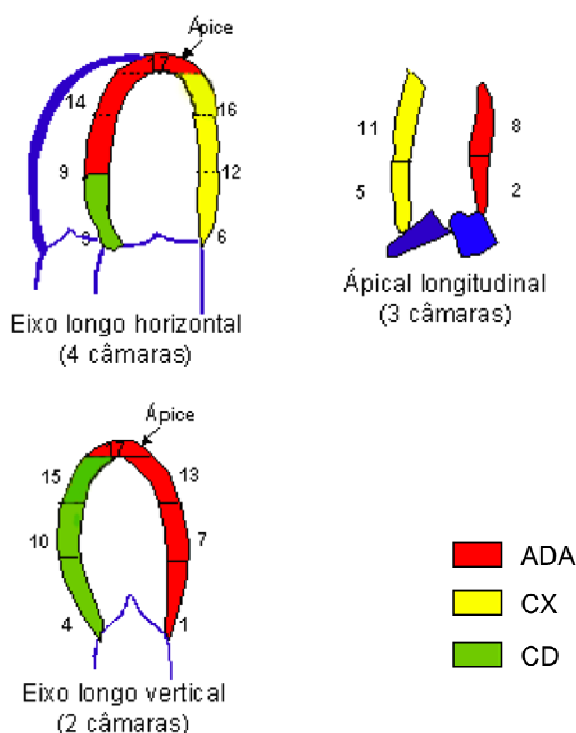


Figura 7 – Esquema da segmentação ventricular esquerda para disposição das regiões de interesse nos 17 segmentos do VE.

As imagens ecocardiográficas para avaliação de perfusão foram ajustadas para minimizar os artefatos em decorrência da mobilidade cardíaca. Ajustes específicos do aparelho incluíram: índice mecânico entre 0,1 e 0,2, e ajustes de ganho e compressão para melhor qualidade de imagem de perfusão. Após o ajuste, estes parâmetros foram mantidos constantes para cada estudo. Um pulso ultrassônico de alta energia chamado de “*flash*”, usualmente com índice mecânico $>1,3$ foi utilizado para a destruição de microbolhas dentro do miocárdio, permitindo a observação subsequente da reperfusão miocárdica (Figura 8). A aquisição digital das imagens foi acionada um a dois ciclos antes do disparo manual do pulso de alto índice mecânico e foi adquirido um total de 15 ciclos cardíacos em

formato digital para cada sequência de imagens¹⁰⁵. Todas as imagens foram armazenadas em disco óptico para análise posterior.

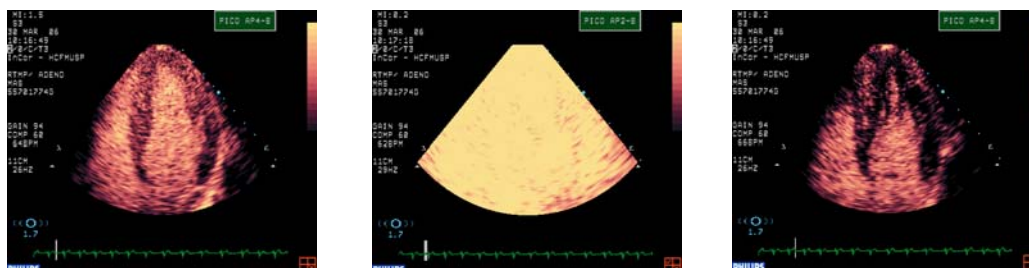


Figura 8 - Exemplo de imagem ecocardiográfica da destruição das microbolhas no miocárdio após um pulso ultrassônico de alto índice mecânico (aproximadamente 1,5). Imagens obtidas antes (a esquerda), durante (centro) e logo após (a direita) o pulso com alto índice mecânico. Nota-se a destruição das microbolhas no miocárdio (a direita).

Após o término do exame, o paciente foi mantido sob monitoração eletrocardiográfica, com oximetria de pulso e de pressão arterial não invasiva por 10 minutos e em observação sem monitoração por mais 20 minutos.

Todos os exames foram realizados pelo mesmo operador, com experiência na técnica.

Determinação quantitativa da perfusão miocárdica

A quantificação da intensidade acústica das imagens de perfusão miocárdica foi realizada utilizando-se um *software* específico para análise de imagens digitais (Q-Lab 5.0[®], Philips Medical systems, Bothell, WA, USA), pelo mesmo observador, de maneira cega e aleatória ao final do estudo.

Inicialmente, em cada seqüência armazenada de 15 ciclos, foram selecionadas apenas as imagens ecocardiográficas correspondentes ao final

da sístole ventricular em cada ciclo. Análises quantitativas da perfusão miocárdica foram realizadas posicionando-se manualmente regiões de interesse (ROI) no miocárdio ventricular esquerdo correspondendo a cada um dos 17 segmentos padronizados, e em 17 regiões adjacentes da cavidade ventricular esquerda, no estado basal e durante o pico da infusão de adenosina (Figuras 9 e 10).¹⁰⁵

Para cada sequência de imagens, desde o pulso de alta energia ultrassônica e destruição completa das microbolhas, até o reenchimento do miocárdio pelo contraste, foram construídas curvas de intensidade acústica em função exponencial, segundo a equação de Vogel et al.⁹³ (pág 9).

A taxa de reenchimento do miocárdio com o contraste (β), que reflete a velocidade de fluxo miocárdico, a intensidade acústica de platô no miocárdio (A_M) e a intensidade acústica de platô nas regiões adjacentes da cavidade ventricular esquerda (A_{VE}), foram determinadas automaticamente pelo *software*.

A intensidade acústica normalizada (A_N), que reflete o volume sanguíneo relativo no miocárdico, foi obtida pela divisão da intensidade acústica de platô no miocárdio pela intensidade acústica de platô no ventrículo esquerdo, conforme ilustrado a seguir:¹⁰³

$$A_N = A_M / A_{VE}$$

Multiplicando-se o volume sanguíneo miocárdico (A_N) pela taxa de reenchimento (β) obteve-se um valor " $A_N \times \beta$ ", que é proporcional ao fluxo sanguíneo miocárdico.¹⁰⁵

Desse modo, resultaram índices do fluxo sanguíneo miocárdico ($A_N \times \beta$) e de seus componentes: velocidade de fluxo miocárdico (β) e volume sanguíneo miocárdico (A_N) para cada indivíduo, nas situações de repouso e com infusão de adenosina, em cada um dos 17 segmentos miocárdicos.

Foi então calculada a média aritmética de A_N , β e $A_N \times \beta$ dos segmentos quantificados em repouso e durante a infusão de adenosina. As reservas de A_N , β e $A_N \times \beta$ de cada indivíduo foram obtidas por média aritmética da reserva de cada um dos 17 segmentos, calculada separadamente, segmento a segmento. Dessa forma, foram avaliadas as mudanças na perfusão miocárdica pelos índices de velocidade do fluxo miocárdico (β), volume sanguíneo miocárdico (A_N) e fluxo sanguíneo miocárdico ($A_N \times \beta$) e respectivas reservas (valor obtido durante a infusão de adenosina dividido pelo valor obtido no repouso) no momento da inclusão no estudo e após 12 semanas de tratamento com atorvastatina (para o grupo HF) ou após 12 semanas de observação (para o grupo controle), com posterior comparação entre os grupos.

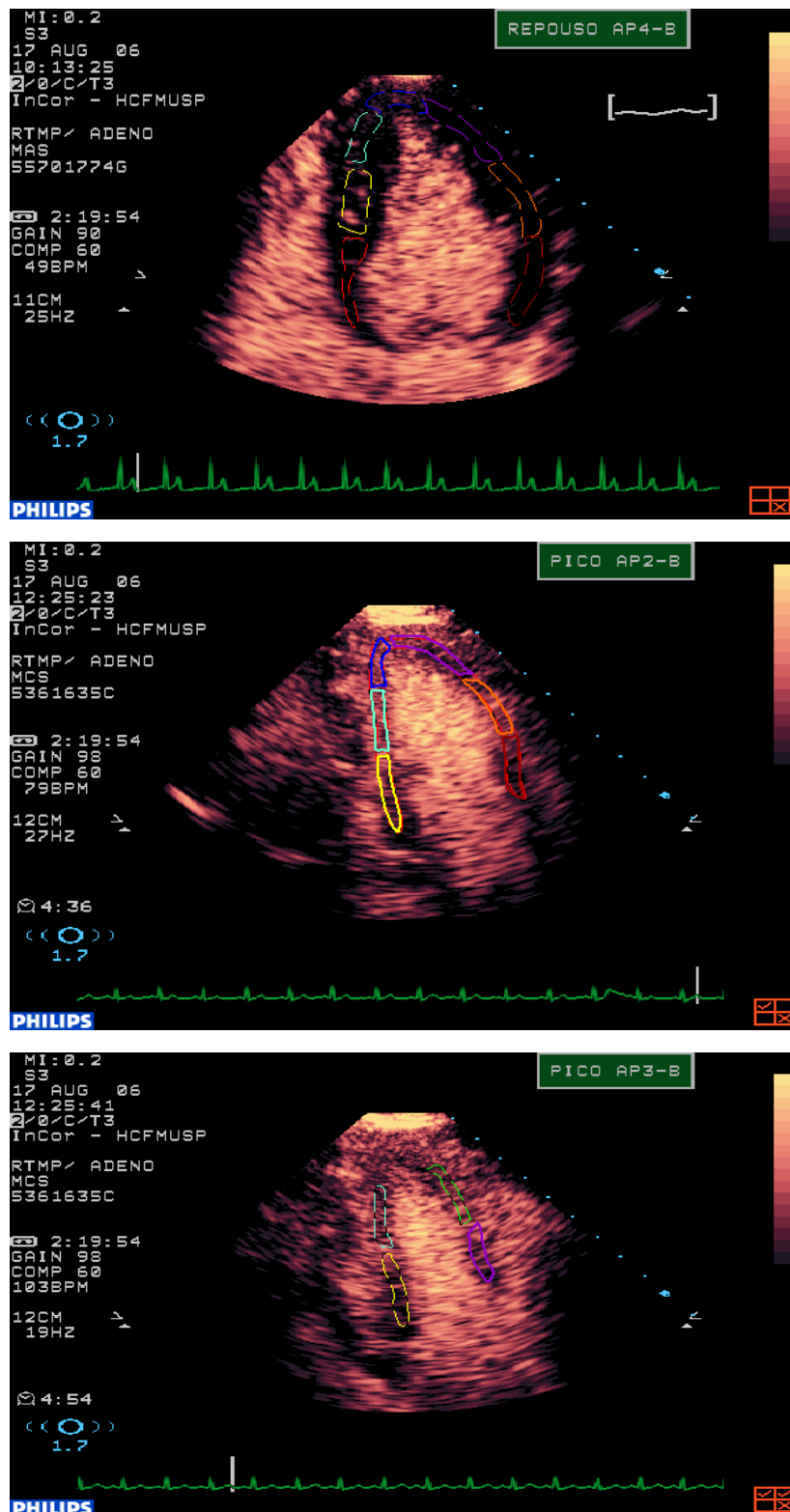


Figura 9 - Disposição das regiões de interesse nos 17 segmentos do VE durante a análise da perfusão miocárdica pela ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real no software Q-lab 5.0[®] (Philips Medical systems, Bothell, WA, USA).

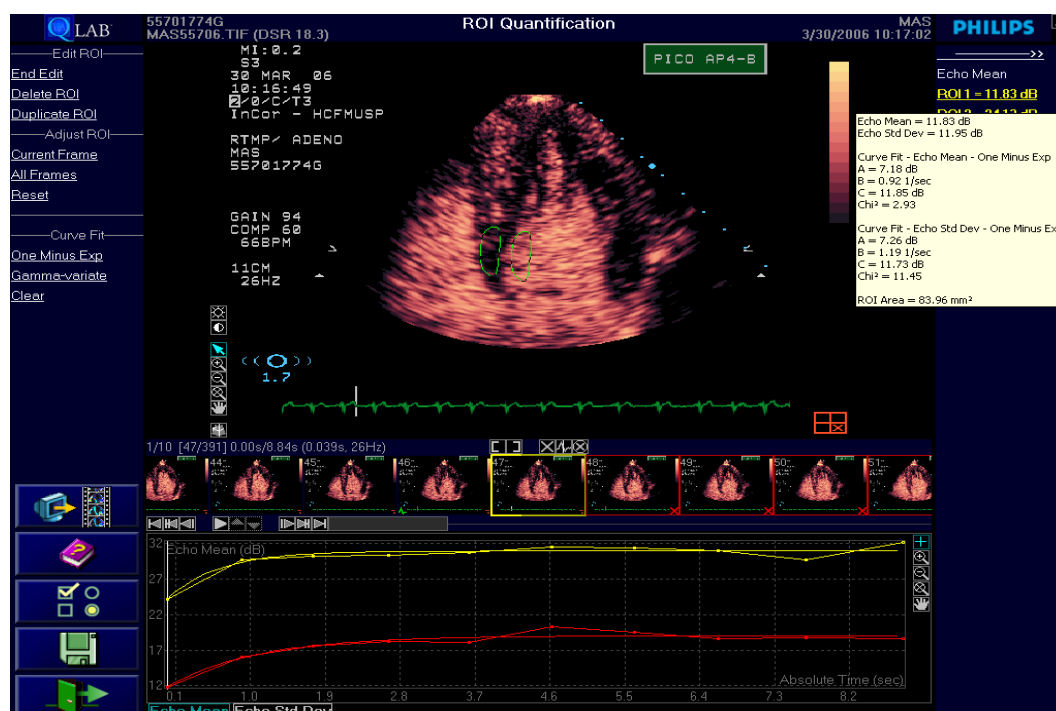


Figura 10 - Quantificação da perfusão miocárdica pelo software Q-lab[®] (Philips Medical systems, Bothell, WA, USA). Pode-se observar as curvas de intensidade acústica no tempo para as áreas de interesse definidas (ROI). Em vermelho, a curva de intensidade acústica da parede miocárdica. Em amarelo, a curva de intensidade acústica de região adjacente da cavidade ventricular esquerda. Na caixa, ao lado direito, quadrante superior, observa-se o cálculo da intensidade acústica de platô (A) e da taxa de preenchimento do miocárdio pelas microbolhas (β).

Análise da placa coronária por tomografia computadorizada de 64 detectores

A angiografia não invasiva foi realizada com auxílio do aparelho de tomografia computadorizada com múltiplas colunas de detectores (Aquilion[®] 64R - Toshiba, com 64 detectores). Foram obtidas até 160 imagens por segundo, e o sistema de resolução temporal máxima de 125-250ms e a espessura de corte de 0,5mm. As imagens foram analisadas em estação de trabalho da Toshiba (VITREA-2[®]).

Na realização da angiografia coronária não invasiva, o paciente recebeu contraste iodado não-iônico no volume de 60mL a 80mL (proporcional a massa corporal do paciente) injetados por via endovenosa em uma velocidade de até $3,5-5,0\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$. Foi utilizado betabloqueador quando a frequência cardíaca foi maior que 65bpm.

Quantificação das placas coronárias

Foi utilizado um *software* (Sure Plaque[®] - Toshiba) para aferição da densidade radiológica dos diferentes componentes da placa. Foram consideradas placas calcificadas aquelas com densidade superior a 130HU. Esse método permite a avaliação da composição das placas ateroscleróticas.^{136, 137}

Os pacientes que apresentavam calcificações coronárias ou lesões obstrutivas (obstrução acima de 50% da luz arterial) foram excluídos da análise final.¹²⁹

Análise estatística

Para a presente análise utilizou-se o programa de análise estatística SPSS-13.0[®] (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

As variáveis classificatórias foram apresentadas em Tabelas contendo frequências absolutas (n) e relativas (%). A associação destas variáveis com os grupos foi avaliada com o teste exato de Fisher.

As variáveis quantitativas foram apresentadas descritivamente em Tabelas contendo média e desvio-padrão e comparadas com o teste t-*Student*, após ter sido confirmada distribuição normal com o teste de normalidade de D'Agostino-Pearson.¹³⁸

As médias das variáveis, mensuradas em duas condições (inicial e final) foram avaliadas com análise de variância para medidas repetidas, onde as três hipóteses básicas foram testadas:

- H01: Os perfis de médias são paralelos, ou seja, o comportamento dos grupos é igual ao longo do tempo;
- H02: Os perfis de médias são coincidentes, ou seja, não existe diferença de médias entre os grupos;
- H03: Não existe efeito de tempo, ou seja, os perfis são paralelos ao eixo das abscissas.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Casuística

Dos 39 pacientes incluídos inicialmente no estudo (26 com hipercolesterolemia familiar e 13 voluntários sem fatores de risco para doença arterial coronária), sete pacientes foram excluídos. Três (23,1%) voluntários e um (3,8%) dos pacientes com hipercolesterolemia foram excluídos após realizar a EPMTR, pois as imagens foram consideradas inadequadas para análise da perfusão miocárdica. Outros quatro pacientes (15,4%) com hipercolesterolemia (grupo HF) foram excluídos do seguimento por apresentar lesões coronárias consideradas obstrutivas ou calcificadas pela tomografia.¹²⁹

Dos 21 (100%) pacientes do grupo HF restantes, 16 (76,2%) realizaram os exames de acompanhamento e dos 10 pacientes restantes do grupo controle, todos (100%) repetiram a segunda avaliação. Dessa forma, passaram a constituir a amostra do estudo 16 pacientes no grupo HF e 10 pacientes no grupo controle.

As doses de atorvastatina utilizadas foram: 80mg (3 indivíduos), 60mg (1 indivíduo), e 40mg (demais indivíduos).

Características clínicas

As características clínicas e ecocardiográficas dos 16 pacientes do grupo HF (idade média (39±14)anos, 7 indivíduos do sexo masculino) e dos 10 pacientes do grupo controle (idade média (36±9)anos, cinco indivíduos do

sexo masculino) estão descritas na Tabela 1 e a distribuição dos fatores de risco e medicamentos utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1 - Características clínicas e ecocardiográficas comparativas entre os indivíduos com hipercolesterolemia e os indivíduos do grupo controle.

Variável	Grupo HF	Controle	P
N	16	10	
<i>Características clínicas</i>			
Sexo Masculino (%N)	7 (44%)	5 (50%)	NS
Idade (anos)	39 ± 14	36 ± 9	NS
Peso (kg)	65 ± 8	63 ± 11	NS
Altura (cm)	164 ± 8	163 ± 10	NS
IMC (kg.m ⁻²)	24 ± 3	24 ± 3	NS
Superfície Corpórea (m ²)	1,71 ± 0,12	1,67 ± 0,18	NS
<i>Características ecocardiográficas</i>			
Esp. septo (mm)	8,6 ± 1,0	8,3 ± 1,0	NS
Esp. parede (mm)	8,4 ± 0,7	8,1 ± 1,0	NS
DDVE (mm)	46,8 ± 3,9	47,6 ± 3,1	NS
DSVE (mm)	31,1 ± 3,2	30,9 ± 3,0	NS
FEVE	0,62 ± 0,04	0,64 ± 0,05	NS
Índice de Massa do VE (g.m ⁻²)	81 ± 16	80 ± 14	NS

DDVE = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DP = desvio padrão; DSVE = diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; FEVE = fração de ejeção do ventrículo esquerdo; Grupo HF = grupo de pacientes com hipercolesterolemia; IMC = índice de massa corpórea; N = quantidade de indivíduos; NS = não significativo; VE = ventrículo esquerdo;

Obs: as variáveis categóricas estão descritas como frequências absolutas (n) e relativas (%) e as variáveis contínuas como média±DP

Ao analisar a Tabela 1, pode-se notar que não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quantos as características clínicas e ecocardiográficas.

Tabela 2 - Características populacionais: fatores de risco para DAC e uso de medicamentos

Variáveis	GRUPO HF (N = 16)	Grupo Controle (N = 10)
<i>Fatores de risco</i>		
Sexo Masculino (N%)	7 (44%)	5 (50%)
Hipertensão Arterial (N%)	1 (6,3%)	0 (0%)
Hipercolesterolemia (N%)	16 (100%) *	0 (0%)
Diabetes melito (N%)	0 (0%)	0 (0%)
Tabagismo (N%)	3 (18,8%)	0 (0%)
<i>Antecedentes familiares</i>	16 (100%) *	0 (0%)
<i>Medicações em uso</i>		
Betabloqueadores (N%)	1 (6,3%)	0 (0%)
AAS (N%)	1 (6,5%)	0 (0%)
Inibidores da ECA (N%)	1 (6,3%)	0 (0%)

AAS = ácido acetil salicílico; ECA = enzima de conversão da angiotensina; N = quantidade de indivíduos.

* $p < 0,05$ para a comparação com o grupo controle.

Obs: as variáveis categóricas estão descritas como frequências absolutas (n) e relativas (%) e as variáveis contínuas como média \pm DP

O Grupo HF apresentava um indivíduo com hipertensão arterial e três tabagistas, enquanto o grupo controle não apresentava indivíduos com fatores de risco para DAC. Contudo, não houve diferenças estatisticamente significantes para essas características entre os dois grupos.

Quanto ao uso de medicamentos, no grupo HF, um indivíduo estava em uso de betabloqueador, um indivíduo utilizava AAS e um indivíduo utilizava inibidor da ECA (três indivíduos diferentes), enquanto no grupo controle, nenhum dos indivíduos os utilizava. Contudo, na análise comparativa entre os dois grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 3 – Perfil lipídico e glicemia do grupo HF e do grupo controle.

Variável	Grupo HF N = 16		Grupo controle N = 10	
	Inicial (média ± DP)	Final (média ± DP)	Inicial (média ± DP)	Final (média ± DP)
CT (mg.dL ⁻¹) ¥	353 ± 46 *	237 ± 62 * #	175 ± 40	175 ± 43
LDL-C (mg.dL ⁻¹) ¥	278 ± 48 *	172 ± 71 * #	106 ± 36	107 ± 35
HDL-C (mg.dL ⁻¹)	43 ± 10 *	43 ± 12 *	57 ± 8	54 ± 9
TGC (mg.dL ⁻¹) ¥	154 ± 60 *	109 ± 38 * #	64 ± 28	76 ± 36
Glicemia (mg.dL ⁻¹)	91 ± 8	86 ± 8	86 ± 7	82 ± 9

CT = colesterol total sérico; DP = desvio padrão; HDL-C = colesterol de lipoproteínas de alta densidade; LDL-C = colesterol de lipoproteínas de baixa densidade; N = quantidade de indivíduos em cada grupo; TGC = triglicérides;

* **p<0,05** para a comparação com o grupo controle;

p<0,05 para a comparação entre os momentos (inicial e final), no mesmo grupo;

¥ **p<0,05** para a comparação entre os grupos no decorrer do tempo (ANOVA).

Ao analisar o perfil lipídico e glicêmico de ambos os grupos, Tabela 3, nota-se que o grupo HF apresentava, em média, níveis de colesterol total 102% maiores que o grupo controle ($p<0,001$), e também níveis de LDL-C 162% maiores ($p<0,001$), de HDL-C 25% mais baixos ($p<0,001$), e de TGC 141% maiores que os níveis do grupo controle: ($p<0,001$).

A glicemia de jejum inicial do grupo HF era, em média, 6% mais alta do que a do grupo controle, todavia sem significância estatística ($p=0,08$).

Na comparação evolutiva, nota-se que o grupo HF apresentou redução bastante significativa, após tratamento com atorvastatina, dos níveis de colesterol total: 33% ($p<0,001$), de LDL-C: 38% ($p<0,001$) e triglicérides: 29% ($p=0,002$) sem mudanças significativas nos níveis de HDL-C ($p=0,33$) e glicemia de jejum ($p=0,7$).

Vasodilatação da artéria braquial mediada pelo fluxo

Pode-se notar, ao observar a Tabela 4, que a reatividade vascular se mostrava reduzida no grupo HF, no início do estudo, relativamente ao grupo controle, com uma dilatação na hiperemia de $0,08\pm 0,04$ e $0,15\pm 0,02$ ($p<0,001$), respectivamente, para os grupos HF e controle comparado com o diâmetro basal do vaso. Após o tratamento com atorvastatina, ocorreu normalização da reatividade vascular no grupo HF, não havendo diferença quando comparada com o grupo na avaliação final ($p=0,07$), conforme pode-se observar na Figura 11. Nota-se, ainda, que o comportamento entre os dois grupos foi diferente ao longo do tempo ($p=0,001$).

Tabela 4 – Comparação dos diâmetros e da vasodilatação da artéria braquial mediada pelo fluxo entre os grupos

Variável	Grupo HF N=16		Grupo Controle N=10	
	Inicial (média ± DP)	Final (média ± DP)	Inicial (média ± DP)	Final (média ± DP)
D basal (mm) ‡	3,42 ± 0,63 *	3,17 ± 0,56 #	3,07 ± 0,53	3,09 ± 0,56
D hiperemia (mm)	3,69 ± 0,62	3,56 ± 0,55	3,54 ± 0,58	3,53 ± 0,60
ΔD ‡	0,08 ± 0,04 *	0,13 ± 0,05 #	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,03

D basal = diâmetro da artéria braquial na condição basal; D hiperemia = diâmetro da artéria braquial na condição de vasodilatação máxima; DP = desvio padrão; ΔD = variação do diâmetro da artéria braquial entre a condição basal e a condição de vasodilatação máxima, relativamente ao diâmetro basal.

* $p < 0,05$ para a comparação com o grupo controle

$p < 0,05$ para a comparação entre os momentos (inicial e final), no mesmo grupo;

‡ $p < 0,05$ para a comparação entre os grupos no decorrer do tempo (ANOVA).

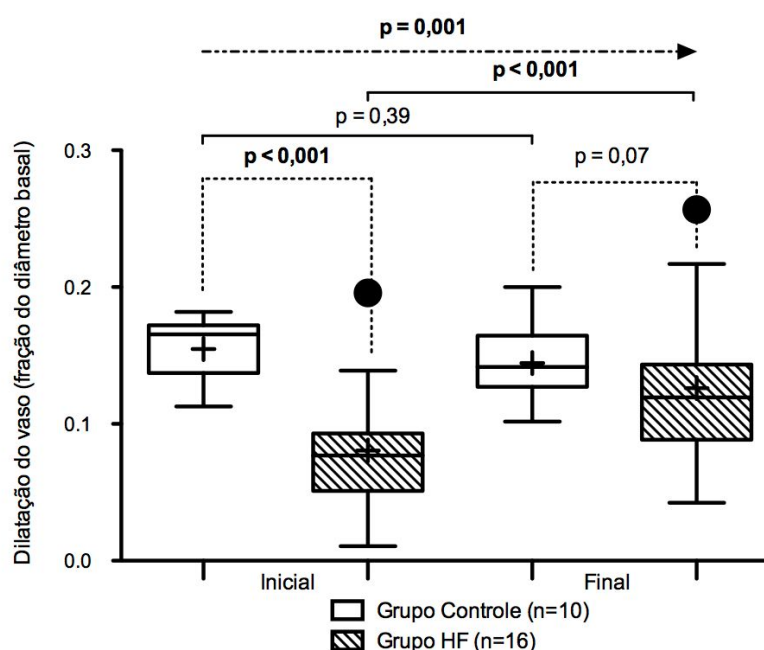


Figura 11. Vasodilatação mediada pelo fluxo nos grupos HF e Controle nas duas fases do estudo. Os sinais de “+” representam o valor médio e os círculos preenchidos representam os valores extremos.

Observa-se, ainda, redução do tônus vascular no repouso (Figura 12), com um diâmetro arterial maior na condição de repouso no grupo HF relativamente ao grupo controle ($p < 0,001$). Após o tratamento com atorvastatina, essa redução do tônus vascular foi revertida no grupo HF comparada com a avaliação inicial ($p = 0,001$). Enquanto o diâmetro médio da artéria braquial dos indivíduos do grupo controle não mostrou diferença entre as avaliações, o diâmetro braquial do grupo HF em repouso apresentou redução significativa ($p = 0,02$). No que concerne ao diâmetro da artéria durante a vasodilatação mediada pelo fluxo, não foram observadas diferenças entre os grupos ($p = 0,25$), conforme demonstrado na Figura 13.

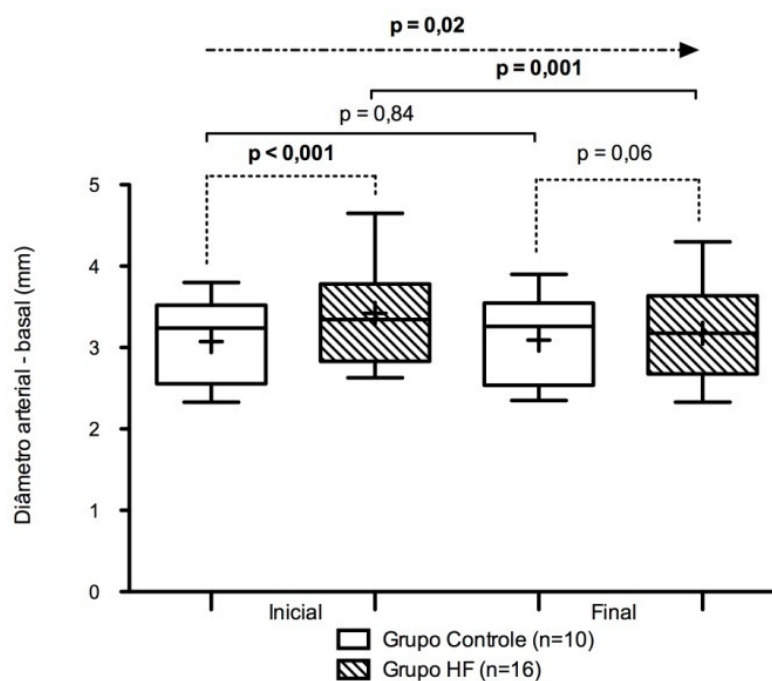


Figura 12. Diâmetro da artéria braquial no repouso, nos dois grupos e nos dois momentos do estudo. Os sinais de “+” representam o valor médio.

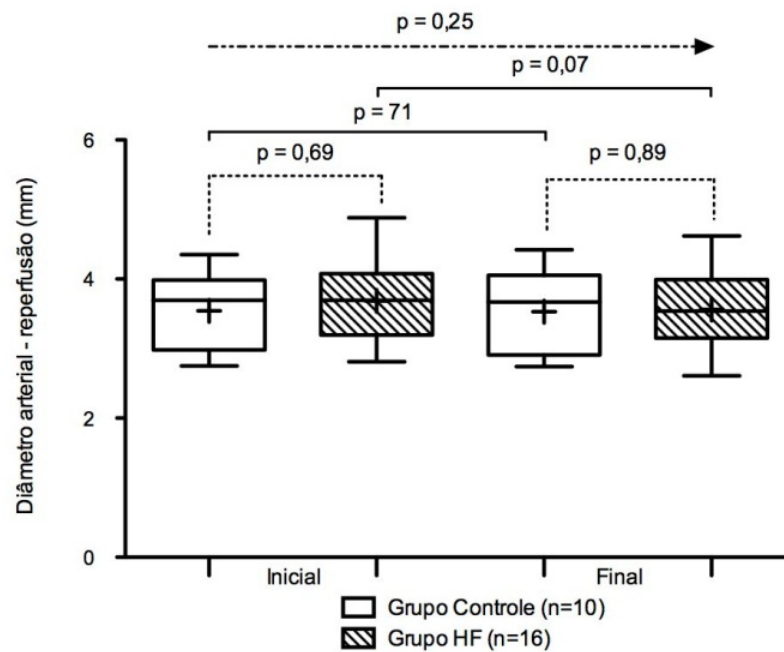


Figura 13. Diâmetro da artéria braquial após reperusão, nos dois grupos e nos dois momentos do estudo. Os sinais de “+” representam o valor médio.

Ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real associada a adenosina

Manifestações Clínicas

Não foi necessário interromper o exame em nenhum indivíduo. Apenas um indivíduo do grupo HF apresentou bradicardia sinusal associada a hipotensão transitória na fase inicial do estudo (início da infusão de adenosina) revertidas rápida e espontaneamente, sem necessidade de interrupção do exame. Nenhum dos indivíduos apresentou alterações eletrocardiográficas sugestivas de isquemia miocárdica durante a infusão de adenosina.

Resposta hemodinâmica ao estímulo farmacológico

Ao analisar a Tabela 5, nota-se que não existiu diferença no comportamento hemodinâmico em resposta a injeção de adenosina, entre os grupos HF e controle, em nenhum momento do exame e nem entre as avaliações inicial e final dos grupos. Em relação à frequência cardíaca, observa-se que, entre o repouso e o pico de infusão de adenosina (4 a 6 minutos), aumentou em 33% (avaliação inicial) e 35% (avaliação final) no grupo HF ($p < 0,05$) e aumentou em 29% (avaliação inicial) e 35% (avaliação final) no grupo controle ($p < 0,05$). A pressão arterial sistólica caiu, em média, 4% (avaliação inicial) e 3% (avaliação final) no grupo HF ($p =$ não significativa (NS)) vs 5% (avaliação inicial) e 4% (avaliação final) no grupo controle ($p =$ NS), enquanto a pressão arterial diastólica caiu 6,4% (inicial) e 5,1% (final) no grupo HF ($p =$ NS) e 7,1% (inicial) e 10,1% (final) no grupo controle ($p =$ NS). O Duplo produto se elevou em média 27,3% (inicial) e 27,3% (final) no grupo HF ($p =$ NS) e 18,9% (inicial) e 26,8% (final) no grupo controle ($p =$ NS).

Tabela 5 – Características hemodinâmicas durante a EPMTR para os grupos HF e Controle

Variável (unidade)	Grupo HF (N = 16)		Controle (N = 10)	
	Inicial (média±DP)	Final (média±DP)	Inicial (média±DP)	Final (média±DP)
FC repouso (bpm)	64 ± 7	65 ± 9	68 ± 15	63 ± 10
FC 6min (bpm)	85 ± 19*	88 ± 16*	86 ± 15*	85 ± 19*
PAS repouso (mmHg)	125 ± 14	123 ± 16	119 ± 14	123 ± 16
PAS 6min (mmHg)	120 ± 17	119 ± 18	113 ± 8	118 ± 5
PAD repouso (mmHg)	79 ± 10	78 ± 10	72 ± 11	79 ± 13
PAD 6min (mmHg)	74 ± 13	74 ± 14	69 ± 7	71 ± 7
DPr repouso	7 958 ± 1 273	8 120 ± 1 446	8 124 ± 2096	7 830 ± 1 667
DPr 6min	10 127 ± 2 132	10 340 ± 2 452	9 658 ± 1 740	9 932 ± 2 339

bpm = batimentos por minuto; DP = desvio padrão; DPr = duplo produto; FC = frequência cardíaca; N = número indivíduos; mmHg = milímetros de mercúrio; PAD = pressão arterial diastólica; PAS = pressão arterial sistólica; rec. = recuperação;

* **p<0,05** para a comparação com o repouso

Obs.: não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as variáveis entre os grupos e entre os diferentes momentos (p=NS).

A microcirculação coronária avaliada pela EPMTR

A avaliação da microcirculação coronária pela EPMTR nos dois grupos durante os diferentes momentos do estudo mostrou que existiram diferenças dos padrões do fluxo miocárdico entre os grupos HF e controle e que as alterações presentes no grupo HF sofreram influência do tratamento com atorvastatina (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação dos parâmetros de medidas quantitativas obtidas pela ecocardiografia com perfusão miocárdica em tempo real sob estresse pela adenosina

Variável	Grupo HF N=16		Controles n=10	
	Inicial (média ± DP)	Final (média ± DP)	Inicial (média ± DP)	Final (média ± DP)
<i>Reserva</i>				
$A_{NX}\beta$	2,78 ± 0,71 *	3,31 ± 0,63	3,43 ± 0,66	3,48 ± 0,89
A	1,20 ± 0,10	1,23 ± 0,12	1,24 ± 0,15	1,22 ± 0,14
β	2,59 ± 0,61 *	2,96 ± 0,66	3,25 ± 0,45	3,24 ± 0,96
<i>Repouso</i>				
$A_{NX}\beta$ (dB dB ⁻¹ s ⁻¹) ‡	0,28 ± 0,06 *	0,24 ± 0,04 #	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,03
A_N (dB dB ⁻¹)	0,56 ± 0,08 *	0,53 ± 0,08	0,49 ± 0,05	0,52 ± 0,05
β (s ⁻¹)	0,56 ± 0,14 *	0,47 ± 0,06	0,45 ± 0,04	0,46 ± 0,06
<i>Durante infusão de adenosina</i>				
$A_{NX}\beta$ (dB dB ⁻¹ s ⁻¹)	0,72 ± 0,21	0,72 ± 0,17	0,65 ± 0,08	0,71 ± 0,19
A_N (dB dB ⁻¹) ‡	0,64 ± 0,08 *	0,61 ± 0,08	0,57 ± 0,06	0,61 ± 0,05
β (s ⁻¹)	1,25 ± 0,39	1,29 ± 0,28	1,22 ± 0,23	1,36 ± 0,29

A_N = intensidade acústica de platô normalizada; $A_{NX}\beta$ = fluxo sanguíneo miocárdico. β = velocidade do fluxo sanguíneo miocárdico; DP = desvio padrão

* $p < 0,05$ para a comparação com o grupo controle;

$p < 0,05$ para a comparação entre os momentos (inicial e final), no mesmo grupo;

‡ $p < 0,05$ para a comparação entre os grupos no decorrer do tempo (ANOVA).

Fluxo miocárdico ($A_{NX}\beta$)

Ao analisar o gráfico da Figura 14, observa-se que a reserva de fluxo miocárdico estava reduzida no grupo HF comparado ao grupo controle na avaliação inicial ($p=0,03$), e se tornou comparável ao grupo controle após o tratamento com atorvastatina ($p=0,56$), embora a avaliação evolutiva (ANOVA) não tenha mostrado diferença estatística do efeito do tratamento

na reserva de fluxo miocárdico na comparação entre os dois grupos ($p=0,32$).

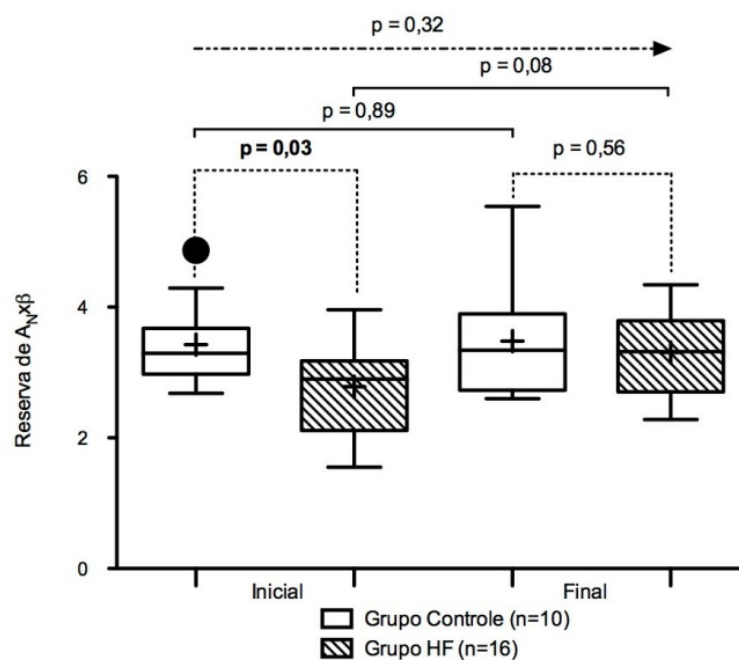


Figura 14. Valor da reserva de fluxo miocárdico ($A_{N \times \beta}$) para os grupos Controle e HF nas duas etapas do estudo. Os sinais de “+” representam o valor médio e os círculos preenchidos representam os valores extremos.

Na condição de repouso, o fluxo miocárdico, avaliado pela EPMTR ($A_{N \times \beta}$), estava elevado no grupo HF, em comparação ao grupo controle ($p<0,001$), e se normalizou após o tratamento com atorvastatina ($p=0,21$), conforme ilustrado na Figura 15. Cabe ainda ressaltar, que a comparação entre os dois grupos também mostrou diferença significativa ($p=0,02$).

Durante a infusão de adenosina, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos HF e controle, quanto o parâmetro $A_{N \times \beta}$ ($p=0,52$)

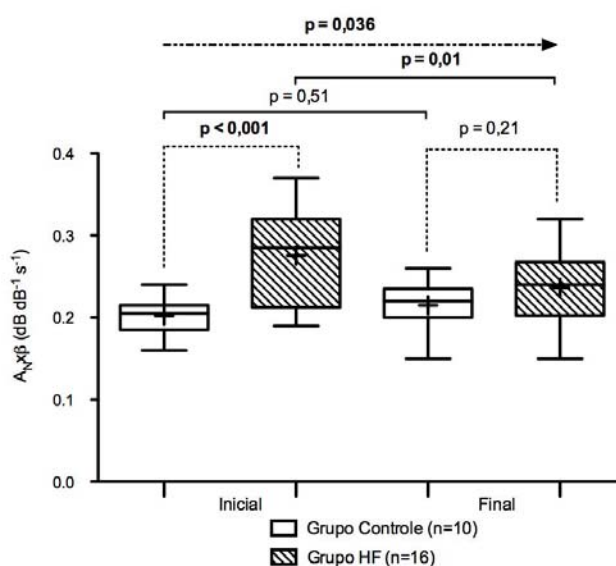


Figura 15. Fluxo sanguíneo miocárdico ($A_N \times \beta$) nos grupos HF e Controle na condição de repouso, nas duas fases do estudo. Os sinais “+” representam o valor médio.

Volume relativo de sangue no miocárdio (A_N)

A reserva do parâmetro A_N , que reflete o aumento do volume sanguíneo miocárdico,⁹⁸ no grupo HF, na primeira avaliação, foi estimada em $1,20 \pm 0,10$ e na segunda avaliação, em $1,23 \pm 0,12$ ($p=0,07$). Para o grupo controle, a reserva de A_N foi estimada, na avaliação inicial em $1,24 \pm 0,15$ e na final em $1,22 \pm 0,14$ ($p=0,71$), conforme ilustrado na Figura 16. (Não foi observada diferença na avaliação evolutiva entre os dois grupos: $p=0,25$).

Na condição de repouso, o volume relativo de sangue miocárdico – A_N – estava mais elevado no grupo HF que no grupo controle ($p=0,02$), e embora na avaliação final não se tenham observado diferenças entre os grupos HF e controle ($p=0,79$), a análise de variância não mostrou diferença no comportamento dos grupos no decorrer do tempo ($p=0,07$), conforme ilustrado na Figura 17.

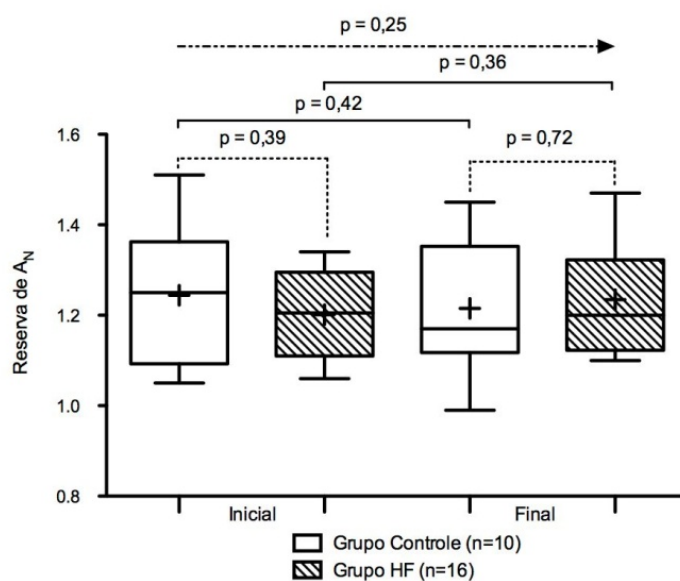


Figura 16. Reserva do volume sanguíneo miocárdico relativo – A_N – dos grupos HF e Controle, nas duas fases do estudo. Os sinais de “+” representam o valor médio.

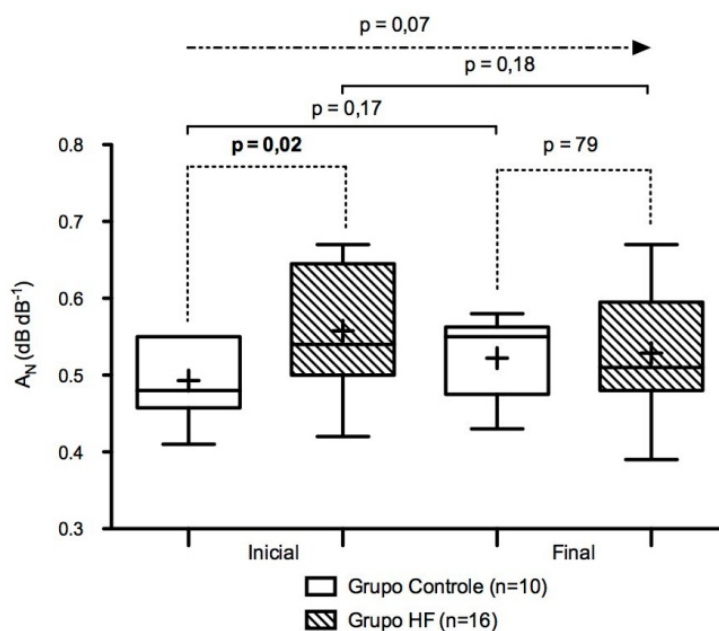


Figura 17. Volume sanguíneo miocárdico relativo – A_N – dos grupos HF e Controle na condição de repouso, nas duas fases do estudo. Os sinais de “+” representam o valor médio.

Durante a infusão de adenosina, o parâmetro A_N mostrou-se mais elevado no grupo HF na avaliação inicial ($p=0,001$) não sendo observada essa diferença na avaliação final: ($p=0,7$), contudo, como pode-se observar na Figura 18, não existiu diferença estatisticamente significativa na comparação evolutiva do grupo HF ($p=0,7$) nem do grupo controle ($p=0,15$). A comparação evolutiva entre os dois grupos mostrou, além disso, que os grupos tiveram comportamentos diferentes ($p = 0,02$).

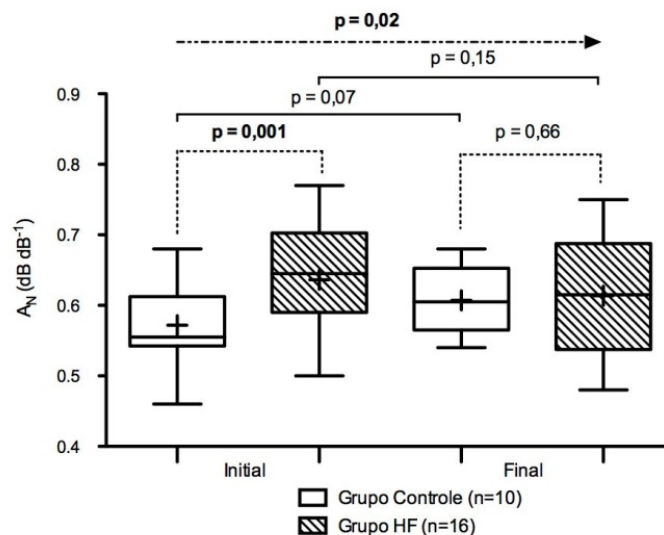


Figura 18. Volume sanguíneo miocárdico relativo – A_N – dos grupos HF e controle na condição de hiperemia (durante a infusão de adenosina), nas duas fases do estudo. Os sinais “+” representam o valor médio.

Velocidade de fluxo sanguíneo no miocárdio (β)

A reserva do parâmetro β , que reflete o aumento da velocidade de fluxo sanguíneo no miocárdio relativamente ao fluxo no repouso,⁹⁷ era reduzida no grupo HF quando comparada ao com a do grupo controle, na avaliação inicial ($p=0,01$), e não foi observada diferença estatística na comparação entre os dois grupos após o tratamento do grupo HF com

atorvastatina ($p=0,34$), conforme demonstrado na Figura 19. Na comparação evolutiva em cada grupo, a reserva de β foi de $2,59\pm 0,61$ e $2,96\pm 0,66$ ($p=0,14$) no grupo HF e de $3,25\pm 0,45$ e $3,24\pm 0,96$ ($p=0,98$) no grupo controle.

Na condição de repouso, a velocidade de reenchimento miocárdico (β) mostrou-se mais elevada no grupo HF que no grupo controle ($p=0,02$), e isso não foi observado após o tratamento ($p=0,71$). Contudo, não se observou significância estatística do efeito do tratamento ($p=0,07$), conforme demonstrado na Figura 20.

Durante a infusão de adenosina, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos HF e controle, quanto ao parâmetro β ($p=0,54$).

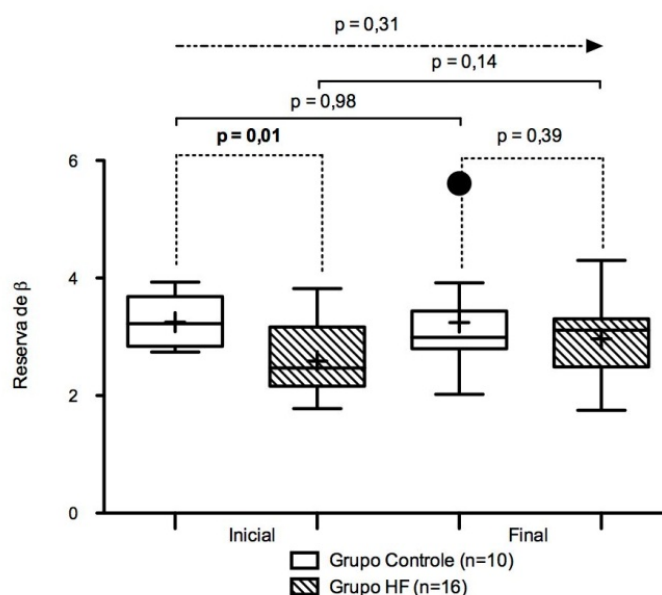


Figura 19. Valor da reserva de β para os grupos HF e controle nas duas etapas do estudo. Os sinais “+” representam o valor médio. O círculo preenchido indica valores extremos.

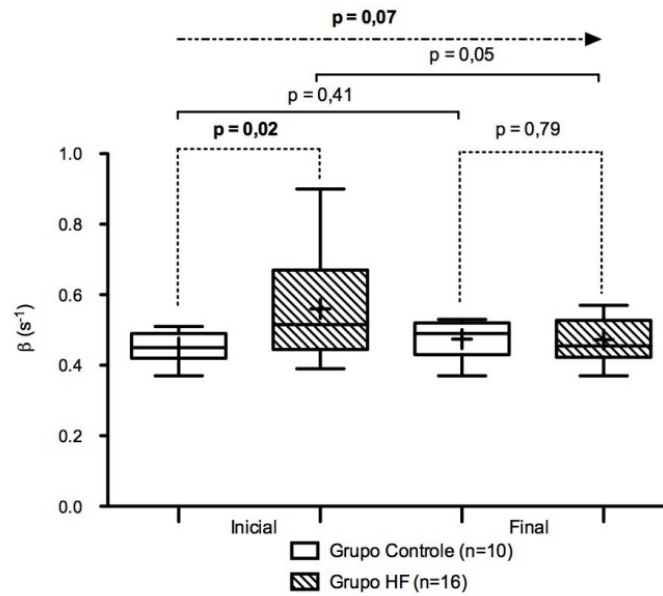


Figura 20. Taxa de preenchimento miocárdico – β – dos grupos HF e controle na condição de repouso, nas duas fases do estudo. Os sinais “+” representam o valor médio.

DISCUSSÃO

Casuística

Dos 26 indivíduos com hipercolesterolemia incluídos no início do estudo, apenas cinco foram excluídos por não se enquadrarem nos critérios de seleção para o estudo e outros cinco não completaram o protocolo de avaliação por abandono de tratamento, restando 16 indivíduos no grupo HF com os quais foi concluído o estudo. Dos 13 indivíduos sem fatores de risco para DAC, que iniciaram o estudo, três foram excluídos, restando 10 indivíduos avaliados até o final do protocolo neste grupo. A taxa de perda de 5 em 21 indivíduos (23%) pode ser considerada alta, porém, considera-se que é compatível com o protocolo de estudo, que inclui realização de exames de estresse cardiovascular com efeitos desconfortáveis,¹¹⁸ como punções de dois acessos venosos em cada etapa em indivíduos assintomáticos, cuja motivação pode ser ainda mais difícil de se manter.

Características clínicas e efeito do tratamento no perfil lipídico

Os dois grupos, pareados por idade e sexo, mantiveram características clínicas e ecocardiográficas bastante semelhantes, conforme pode ser observado na Tabela 1. Embora tenham sido incluídos no grupo HF três indivíduos tabagistas e três em uso de medicações que potencialmente poderiam interferir na avaliação da perfusão miocárdica, todos foram orientados a não usar medicações vasoativas nas 72 horas anteriores ao exame e se abster de tabaco nas 24 horas que antecederam o

exame. A dosagem das medicações também foi mantida constante durante o período do estudo. Embora alguns estudos demonstrem que o tabagismo reduz a reserva coronária,^{139, 140} já foi demonstrado que a abstenção de tabaco, por um período de quatro horas, é suficiente para evitar sua influência sobre a função endotelial coronária em indivíduos jovens e assintomáticos.¹⁴¹

O efeito do tratamento com atorvastatina sobre os níveis séricos do colesterol total, LDL-C e triglicérides dos indivíduos, conforme descrito na Tabela 3, foram comparáveis com aqueles expostos por outros autores.^{122,}

¹⁴²

Efeitos hemodinâmicos da adenosina

Os dois grupos foram comparáveis em cada fase do estudo, em relação à frequência cardíaca, pressão arterial e duplo-produto tanto no repouso quanto durante a infusão de adenosina, em cada um dos estágios do teste, conforme descrito na Tabela 5.

Os efeitos da adenosina sobre a frequência cardíaca, pressão arterial e duplo-produto em ambos os grupos, foram também semelhantes aos efeitos descritos em outros estudos,¹¹⁸ demonstrando que a infusão de adenosina na dose de $140\mu\text{gkg}^{-1}\text{min}^{-1}$ foi efetiva nos indivíduos do presente estudo. Isto sugere que os efeitos da adenosina sobre a circulação coronária também tenham sido semelhantes em ambos os grupos, possibilitando atingir aumento máximo na velocidade de fluxo coronário.¹¹⁵

Avaliação da perfusão miocárdica

A disfunção endotelial ocorre nos estágios iniciais da aterosclerose e está relacionada ao desenvolvimento de doença arterial coronária obstrutiva¹⁴³ e também relacionada com a isquemia miocárdica,^{144, 145} além de ser um dos determinantes na redução da reserva de fluxo coronário e de possuir caráter progressivo, correlacionando-se de forma inversa com o grau de aterosclerose arterial presente, mesmo na ausência de lesões obstrutivas.¹⁴⁶

Já está demonstrado que a hipercolesterolemia induz disfunção endotelial, com redução da reserva de fluxo coronário, mesmo na ausência de lesões obstrutivas⁸⁰ e que o tratamento com inibidores da HMG-CoA redutase pode reverter essa alteração,^{86, 88} tanto nos indivíduos com lesões coronárias obstrutivas,¹⁵ quanto naqueles sem obstrução coronária angiograficamente significativa.^{147, 148}

A redução dos níveis de colesterol (principalmente de LDL-C) com inibidores da HMG-CoA redutase, ao mesmo tempo, é um mecanismo bastante eficaz para a redução dos episódios de isquemia miocárdica, incluindo as síndromes coronárias agudas, morte cardíaca e a isquemia miocárdica silenciosa.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Este fenômeno tem sido, também, imputado à melhora da função endotelial e reserva de fluxo coronário, principalmente nas fases iniciais do tratamento, quando ainda não ocorreram alterações estruturais significativas da placa de ateroma, ou ocorreram apenas alterações mínimas, sem mudanças no grau de obstrução provocado pela

placa aterosclerótica na artéria coronária.^{152, 153} Evidenciam-se, contudo, alterações qualitativas na composição da placa aterosclerótica e mudanças na função endotelial, já nas fases iniciais do tratamento.¹⁵³⁻¹⁵⁵

A reserva de fluxo coronário pode ser influenciada, além da função endotelial, por uma série de fatores: frequência cardíaca e pressão arterial,¹⁵⁶ hipertrofia miocárdica,^{65, 157} características da parede da artéria coronária (como grau de fibrose e calcificação),^{35, 158} viscosidade sanguínea,¹⁵⁹ presença de placas ateroscleróticas obstrutivas,¹⁰⁵ alterações da microcirculação (como a neoangiogênese),^{28, 77} entre outros. Isto pode explicar a heterogeneidade de resultados encontrados na literatura e a dificuldade de estudar a regulação do fluxo sanguíneo coronário *in vivo*,¹⁵⁶ além de eventuais diferenças encontradas nos padrões de fluxo coronário entre diferentes estudos.^{69, 70, 80, 147, 160}

Neste estudo, ao utilizar a EPMTR sob estresse provocado por adenosina, demonstrou-se que, nos indivíduos com hipercolesterolemia grave não tratada, sem lesões coronárias epicárdicas obstrutivas e sem calcificação coronária detectada por tomografia de coronárias com 64 detectores, a reserva coronária está diminuída quando comparada com a reserva coronária dos indivíduos sem fatores de risco para DAC (Figura 14). Esse achado é concordante com diversos estudos publicados, que demonstraram a redução da reserva coronária nos estágios iniciais da aterosclerose, mesmo na ausência de lesões obstrutivas^{35, 80, 161} e também com pesquisas que demonstram redução na reserva coronária de indivíduos com hipercolesterolemia.^{15, 80}

Demonstrou-se também, pela primeira vez em humanos, que o fluxo coronário em repouso é mais elevado no grupo de indivíduos com hipercolesterolemia não tratada, na ausência de lesões coronárias obstrutivas, quando comparado com aquele em indivíduos sem doença coronária obstrutiva estabelecida e sem fatores de risco para o seu desenvolvimento (Figura 15). Esse aumento de fluxo ($A_N \times \beta$) ocorreu tanto graças ao aumento da velocidade de fluxo coronário (conforme ilustrado na Figura 20), caracterizado pelo aumento do valor de β , quanto pelo aumento do volume sanguíneo miocárdico, caracterizado por elevação do parâmetro A_N (Figura 17).

Esses achados estão em concordância com resultados demonstrados previamente apenas em estudos experimentais, como os obtidos por Mannheim e colaboradores²⁶ que encontraram redução da reserva de fluxo miocárdico em animais com hipercolesterolemia induzida por dieta, e um dos grupos também apresentava aumento do fluxo miocárdico em repouso, em comparação com os animais do grupo controle. Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que existe indução de neovascularização miocárdica nos animais com hipercolesterolemia.

Theilmeier e colaboradores,²⁸ também em um modelo animal experimental, demonstraram que existe elevação dos fluxos epimiocárdico e endomiocárdico em repouso, nos animais com hipercolesterolemia induzida por dieta, com redução da reserva de fluxo endomiocárdico nesses animais, em comparação com controles. Esses achados foram associados com a redução da reserva contrátil do ventrículo esquerdo e, após a reversão da

hipercolesterolemia por suspensão da dieta rica em colesterol, as alterações regrediram.

No presente estudo, a relação do aumento do fluxo miocárdico com a hipercolesterolemia é reforçada quando demonstra-se que: após o tratamento por três meses com atorvastatina, ocorreu redução significativa dos níveis séricos de CTF, LDL-C, e triglicérides, assim como do fluxo miocárdico em repouso nos indivíduos com hipercolesterolemia, que se igualou ao do grupo controle (Figura 15), com normalização de todos os parâmetros de fluxo em repouso.

Durante a infusão de adenosina, foi demonstrado, também, que apenas o volume sanguíneo miocárdico (A_N) do grupo com hipercolesterolemia estava mais elevado que no grupo controle, refletindo aumento do sangue na microcirculação tanto na condição de repouso, quanto durante a vasodilatação, o que pode refletir no aumento da densidade de vasos na microcirculação demonstrado previamente em estudos experimentais.^{26, 27}

Outros fatores de risco para DAC também provocam alterações semelhantes na microcirculação coronária, como a hipertensão arterial sistêmica: animais de experimentação com hipertensão arterial sistêmica também desenvolvem neoangiogênese miocárdica¹⁶² e disfunção mitocondrial.¹⁶³ Um estudo clínico também mostrou aumento do fluxo miocárdico em repouso nos indivíduos hipertensos, quando comparados a um grupo controle ou mesmo a um grupo de atletas.¹⁰³

Outros estudos que utilizaram a tomografia por emissão de pósitrons (TEP) para avaliar a perfusão miocárdica em repouso e sob vasodilatação farmacológica demonstraram redução do fluxo miocárdico durante a infusão de adenosina em indivíduos hipercolesterolêmicos⁸⁰ e aumento deste após o tratamento com inibidores da HMG-CoA redutase.¹⁴⁸ Esses resultados, embora contrastem com os achados nesta pesquisa, podem ser explicados pela exclusão de indivíduos com DAC obstrutiva ou calcificação coronária. Desse modo, foram incluídos indivíduos com menor grau de aterosclerose coronária, e portanto com menor grau de comprometimento da capacidade de vasodilatação arterial coronária máxima, por causa da menor alteração estrutural na parede arterial.³⁵ Além disso, a existência de lesões obstrutivas nos indivíduos incluídos nos outros estudos, pode ter afetado a reserva de fluxo miocárdico de territórios irrigados por artérias sem obstrução mediante a presença de colaterais, conforme demonstrado por Pacella e colaboradores.¹⁰⁴

Como a aterosclerose é uma doença inflamatória na qual ocorre ativação endotelial e aumento do estresse oxidativo,¹⁶⁴⁻¹⁶⁸ assim como acontece nos demais processos inflamatórios,^{169, 170} o achado aparentemente paradoxal do aumento do fluxo miocárdico encontrado nos indivíduos com hipercolesterolemia e sem DAC obstrutiva no presente estudo, de forma original em humanos é amplamente fundamentada em estudos experimentais, haja vista que já foram descritas associações da hipercolesterolemia com a neovascularização miocárdica,^{26, 27} com o aumento nas concentrações locais de produtos do óxido nítrico,¹⁷¹ e de

espécies reativas de oxigênio^{26, 27, 172} que, embora possam reduzir a biodisponibilidade do óxido nítrico por intermédio da interação direta com esse último, também poderiam funcionar como vasodilatadores, principalmente na microcirculação coronária,¹⁷³ gerando produtos metabólicos que agem como fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, provocando vasodilatação, como é o caso do peróxido de hidrogênio.^{24, 49, 174, 175}

Outros estudos sugerem que os fatores de risco para aterosclerose, como hipercolesterolemia, hiperglicemia, tabagismo e hipertensão, provocam aumento do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, com dano ao DNA da mitocôndria, e que esse seria o fator comum no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas.^{12, 23, 163, 176} Essas alterações poderiam explicar diversos achados de literatura, como o de Skinner e colaboradores¹⁷⁷ que demonstraram redução dos níveis de fosfocreatina, trifosfato de adenosina e aumento nos níveis de lactato no tecido miocárdico, em um modelo experimental de hipercolesterolemia, mesmo na ausência de lesões coronárias obstrutivas, assim como o achado de Talini e colaboradores¹⁷⁸ que demonstraram disfunção sistólica incipiente do ventrículo esquerdo nos indivíduos com hipercolesterolemia não tratada, revertida após o tratamento com rosuvastatina.

A disfunção mitocondrial e conseqüente redução do metabolismo energético altamente efetivo, poderia também ser responsável pelo aumento compensatório do fluxo miocárdico, em virtude da elevação das concentrações de superóxido e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), pois,

conforme sugerido por Saitoh e colaboradores,⁵⁰ a produção de peróxido de hidrogênio, tem um papel primordial no acoplamento entre o metabolismo oxidativo e o fluxo sanguíneo miocárdico.

Conclui-se que, embora o presente estudo não tenha sido dirigido para avaliar as causas do aumento do fluxo coronário em repouso, esse fato foi claramente demonstrado e encontra amplas bases em estudos experimentais para explicá-lo.

Avaliação da vasodilatação arterial mediada pelo fluxo

Como controle do efeito do tratamento com atorvastatina sobre o endotélio vascular para confirmar a efetividade do tratamento nos indivíduos com hipercolesterolemia durante o período do estudo, foi realizada a avaliação da vasodilatação da artéria braquial mediada pelo fluxo (DMF).

A DMF nos indivíduos com hipercolesterolemia foi em média de $0,08 \pm 0,04$ no início do estudo, enquanto a DMF nos indivíduos normais foi de $0,15 \pm 0,02$ ($p < 0,001$). Embora se tenha encontrado valores de DMF superiores aos relatados em outros estudos com indivíduos com hipercolesterolemia familiar,^{125, 179} o fato pode ser explicado por variações no método de avaliação,¹⁸⁰ ou características da população incluída em cada um dos estudos, haja vista que os indivíduos inseridos neste estudo apresentavam níveis iniciais de LDL-C mais baixos¹⁷⁹ e que também tenham sido excluídos, durante a seleção dos grupos os indivíduos que apresentavam graus mais avançados de aterosclerose coronária, com

lesões obstrutivas e calcificação estabelecida. Com essa metodologia, provavelmente os indivíduos com maior comprometimento da função endotelial tenham sido excluídos do presente estudo, pois essa é proporcional ao grau de aterosclerose arterial.¹⁴⁶

Demonstrou-se também que a DMF está reduzida nos indivíduos com hipercolesterolemia e que, após tratamento com atorvastatina, ocorreu aumento significativo da DMF, tornando-a comparável a do grupo controle ($p=0,07$), conforme se pode observar na Figura 11. Também é notório que o diâmetro de repouso da artéria braquial estava aumentado nos indivíduos com hipercolesterolemia e que após tratamento, ocorreu redução significativa desse diâmetro (Figura 12). Este último achado é semelhante ao que foi descrito por Schächinger e colaboradores³⁵ para as artérias coronárias, que apresentam redução do tônus vascular na presença de aterosclerose.

Em última análise, pode-se notar que a avaliação da DMF por meio da ultrassonografia de alta resolução nos indivíduos do presente estudo sugere que a hipercolesterolemia não tratada esteja associada a alterações semelhantes nas circulações periférica e coronária, e que essas mudanças podem ser revertidas por tratamento com atorvastatina.

Limitações

Foi incluído um grupo controle de voluntários assintomáticos e sem fatores de risco para DAC, e esse grupo não foi submetido à tomografia coronária, e existe, portanto, a possibilidade de se ter introduzido no estudo

indivíduos com DAC obstrutiva. Entretanto, deve-se ressaltar que a probabilidade de DAC obstrutiva, nesse grupo de indivíduos, é muito baixa se forem consideradas as características clínicas¹⁸¹ e lembrando que todos haviam realizado teste ergométrico, sem evidências de isquemia miocárdica e ecocardiografia de perfusão miocárdica com adenosina, também sem evidências de alterações segmentares da perfusão, o que torna a probabilidade de DAC obstrutiva nesse grupo ser ainda mais baixa.¹⁰⁵

Mesmo que o estudo apresente resultados estatisticamente adequados, o número de indivíduos em cada grupo foi pequeno, o que pode ter aumentado a probabilidade de ocorrência de erro tipo II. Contudo, salienta-se a dificuldade de incluir indivíduos com elevação isolada do LDL-C, sem outros fatores de risco para DAC e que, no início do estudo, não tenham passado por tratamento específico com inibidores da HMG-CoA redutase e não tenham apresentado lesões coronárias obstrutivas (>50% de obstrução). Além disso, o desenho do estudo ainda exigia que tais indivíduos assintomáticos permanecessem sob tratamento ininterrupto por um período de 12 semanas (3 meses), e ainda se submetessem a uma nova avaliação, que incluía um estresse cardiovascular com adenosina, que traz desconforto considerável,¹¹⁸ e as punções de dois acessos venosos, que pode gerar abandono significativo do protocolo, conforme foi confirmado durante o presente estudo (de 21 indivíduos com hipercolesterolemia incluídos, 16 concluíram a avaliação).

Os indivíduos foram cuidadosamente orientados a não ingerir alimentos, bebidas e medicamentos contendo derivados de metilxantinas

nas 24 horas que antecederam os exames. Entretanto, não foram avaliados os níveis séricos de cafeína e de outros derivados de metilxantinas imediatamente antes da realização dos testes, e era provável a possibilidade de redução do efeito da adenosina em alguns indivíduos. Porém, a resposta hemodinâmica a infusão de adenosina foi semelhante entre os dois grupos e comparável aos outros estudos,¹¹⁸ sugerindo que não tenham existido diferenças significantes nos dois grupos quanto aos efeitos da adenosina no sistema cardiovascular.

A realização e interpretação do exame de ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real requer amplo treinamento na modalidade, o que pode limitar a validade externa do presente estudo. A avaliação quantitativa da perfusão miocárdica requer ainda experiência na técnica e tempo considerável de análise, fatores que podem, contudo, melhorar com aperfeiçoamento dos programas computacionais atuais, ou desenvolvimento de novos programas, mais automatizados. Todavia, mesmo com as limitações atuais, a EPMTR mostrou ser um exame de grande valia na avaliação da perfusão miocárdica, conforme já havia sido demonstrado previamente pelo grupo do Serviço de Ecocardiografia do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, em indivíduos com lesões coronárias obstrutivas.^{105, 182-184}

Cabe ressaltar ainda que, como não foi incluído um grupo controle de indivíduos com hipercolesterolemia aos quais se tenha administrado placebo, ou outra classe de hipolipemiante, as mudanças no fluxo miocárdico no presente estudo podem ter sido decorrentes do efeito da

atorvastatina e não isoladamente da redução dos níveis de CT, LDL-C. Entretanto, a inclusão de um grupo placebo suscitaria questões éticas, pois indivíduos com hipercolesterolemia grave seriam privados de tratamento farmacológico específico durante um período igual ou superior a 12 semanas. Além disso, o tempo para inclusão dos indivíduos no estudo seria maior, alongando consideravelmente o tempo para realização dos exames e os custos do protocolo tornar-se-iam mais elevados.

Relevância

O aumento do fluxo miocárdico em indivíduos com hipercolesterolemia grave não tratada e sem doença coronária obstrutiva, foi demonstrado pela primeira vez em seres humanos. Também de forma inédita, demonstrou-se que o tratamento com atorvastatina, durante 12 semanas, reverteu essas alterações.

Em vista da existência de alterações significativas do fluxo miocárdico de repouso, em indivíduos sem doença coronária obstrutiva e assintomáticos, esses resultados devem ser reavaliados em outros grupos de indivíduos com diferentes graus de hipercolesterolemia, ou mesmo com outros fatores de risco para doença coronária, e também em estudos prospectivos de risco cardiovascular, podendo trazer novas implicações na prevenção e tratamento da doença coronária.

A EPMTR se mostrou de grande valor para a avaliação da perfusão miocárdica, e é capaz de detectar pequenas alterações na regulação do

fluxo miocárdico. Esse estudo consolida a base para novos estudos experimentais *in vivo* que possam ajudar a aumentar os conhecimentos sobre a regulação do fluxo coronário e também para estudos clínicos de prognóstico em pacientes assintomáticos com fatores de risco para DAC, que avaliem a implicação de alterações incipientes da perfusão miocárdica no desenvolvimento de eventos cardiovasculares.

Uma vez que se possa demonstrar o aumento da vascularização microcirculatória com a EPMTR, sua utilização pode ser expandida para o diagnóstico e estudo de outras doenças que apresentem alterações semelhantes, como as neoplasias, por exemplo.

A EPMTR é um exame que se pode tornar amplamente disponível, e no qual não se utiliza radiação ionizante, o que a torna uma substituta promissora para a tomografia por emissão de pósitrons para a avaliação não invasiva do fluxo miocárdico, atual padrão-ouro para tal finalidade.⁹³

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que:

1. A ecocardiografia de perfusão miocárdica em tempo real, associada ao estresse farmacológico por adenosina demonstrou que a hipercolesterolemia grave, não controlada, está associada à redução na reserva de fluxo miocárdico, mesmo na ausência de doença obstrutiva e de calcificações arteriais coronárias.

2. O fluxo coronário microvascular em repouso nos indivíduos com hipercolesterolemia não tratada - avaliado pelo parâmetro $A_N \times \beta$ - está aumentado quando comparado ao fluxo coronário em indivíduos sem doença coronária estabelecida e sem fatores de risco para DAC, tanto por elevação da velocidade de fluxo miocárdico (β), quanto por aumento do volume sanguíneo miocárdico (A_N). Após o tratamento com atorvastatina por 12 semanas, ocorreu normalização do fluxo coronário.

3. A hipercolesterolemia associou-se a redução do tônus arterial em repouso e redução da vasodilatação mediada pelo fluxo na circulação periférica. Essas alterações também foram revertidas com o tratamento com atorvastatina.

REFERÊNCIAS

Referências¹

1. National Institutes of Health - National Heart L. National Heart, Lung and Blood Institute. Morbidity and mortality: 2007 Chart book in cardiovascular, lung and blood diseases. 2007. 2007 [cited 2008 02/04/2009]; Available from: <http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs/07a-chtbk.pdf>.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis -- an update. *N Engl J Med*. 1986 Feb 20;314(8):488-500.
3. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
4. Dawber TR. Risk factors in young adults. The lessons from epidemiologic studies of cardiovascular disease--Framingham, Tecumseh, and Evans County. *J Am Coll Health Assoc*. 1973 Dec;22(2):84-95.
5. Castelli WP, Garrison RJ, Dawber TR, McNamara PM, Feinleib M, Kannel WB. The filter cigarette and coronary heart disease: the Framingham study. *Lancet*. 1981 Jul 18;2(8238):109-13.

¹ * De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

6. Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Arch Intern Med*. 1981 Aug;141(9):1128-31.
7. Kannel WB, Wolf PA, McGee DL, Dawber TR, McNamara P, Castelli WP. Systolic blood pressure, arterial rigidity, and risk of stroke. The Framingham study. *JAMA*. 1981 Mar 27;245(12):1225-9.
8. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. Diabetes, blood lipids, and the role of obesity in coronary heart disease risk for women. The Framingham study. *Ann Intern Med*. 1977 Oct;87(4):393-7.
9. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C13-8.
10. Holvoet P, Theilmeier G, Shivalkar B, Flameng W, Collen D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Mar;18(3):415-22.
11. Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, Fraedrich G, Schaefer HE, Dimmeler S, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Apr 2;105(13):1561-6.

12. Asmis R, Begley JG. Oxidized LDL promotes peroxide-mediated mitochondrial dysfunction and cell death in human macrophages: a caspase-3-independent pathway. *Circ Res*. 2003 Jan 10;92(1):e20-9.
13. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001 Apr 17;103(15):1955-60.
14. Targonski PV, Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Lerman A. Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events. *Circulation*. 2003 Jun 10;107(22):2805-9.
15. Yokoyama I, Yonekura K, Inoue Y, Ohtomo K, Nagai R. Long-term effect of simvastatin on the improvement of impaired myocardial flow reserve in patients with familial hypercholesterolemia without gender variance. *J Nucl Cardiol*. 2001 Jul-Aug;8(4):445-51.
16. Vita JA, Treasure CB, Yeung AC, Vekshtein VI, Fantasia GM, Fish RD, et al. Patients with evidence of coronary endothelial dysfunction as assessed by acetylcholine infusion demonstrate marked increase in sensitivity to constrictor effects of catecholamines. *Circulation*. 1992 Apr;85(4):1390-7.
17. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic

subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol.* 1994 Nov 15;24(6):1468-74.

18. D'Aiuto F, Parkar M, Nibali L, Suvan J, Lessem J, Tonetti MS. Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: results from a randomized controlled clinical trial. *Am Heart J.* 2006 May;151(5):977-84.

19. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med.* 2007 Mar 1;356(9):911-20.

20. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995 Dec;11(4):376-81.

21. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):813-20.

22. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002 Oct;23(5):599-622.

23. Knight-Lozano CA, Young CG, Burow DL, Hu ZY, Uyeminami D, Pinkerton KE, et al. Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues. *Circulation.* 2002 Feb 19;105(7):849-54.

24. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, et al. Important role of endogenous hydrogen peroxide in pacing-induced metabolic coronary vasodilation in dogs in vivo. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Sep 25;50(13):1272-8.
25. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*. 2007 Mar 2;100(4):460-73.
26. Mannheim D, Versari D, Daghini E, Gossel M, Galili O, Chade A, et al. Impaired myocardial perfusion reserve in experimental hypercholesterolemia is independent of myocardial neovascularization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 May;292(5):H2449-58.
27. Zhu XY, Rodriguez-Porcel M, Bentley MD, Chade AR, Sica V, Napoli C, et al. Antioxidant intervention attenuates myocardial neovascularization in hypercholesterolemia. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2109-15.
28. Theilmeyer G, Verhamme P, Dymarkowski S, Beck H, Bernar H, Lox M, et al. Hypercholesterolemia in minipigs impairs left ventricular response to stress: association with decreased coronary flow reserve and reduced capillary density. *Circulation*. 2002 Aug 27;106(9):1140-6.
29. Kassab GS, Fung YC. Topology and dimensions of pig coronary capillary network. *Am J Physiol*. 1994 Jul;267(1 Pt 2):H319-25.
30. Henquell L, Honig CR. Intercapillary distances and capillary reserve in right and left ventricles: significance for control of tissue po₂. *Microvasc Res*. 1976 Jul;12(1):35-41.

31. Kaul S, Jayaweera AR. Coronary and myocardial blood volumes: noninvasive tools to assess the coronary microcirculation? *Circulation*. 1997 Aug 5;96(3):719-24.
32. Camici PG, Crea F. Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med*. 2007 Feb 22;356(8):830-40.
33. Wei K, Kaul S. The coronary microcirculation in health and disease. *Cardiology Clinics*. 2004;22(2):221-31.
34. De Bruyne B, Hersbach F, Pijls NH, Bartunek J, Bech JW, Heyndrickx GR, et al. Abnormal epicardial coronary resistance in patients with diffuse atherosclerosis but "Normal" coronary angiography. *Circulation*. 2001 Nov 13;104(20):2401-6.
35. Schachinger V, Zeiher AM. Quantitative assessment of coronary vasoreactivity in humans in vivo. Importance of baseline vasomotor tone in atherosclerosis. *Circulation*. 1995 Oct 15;92(8):2087-94.
36. Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR, Jr., Saito T, Miura M, et al. Flow-Induced Dilation of Human Coronary Arterioles : Important Role of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels. *Circulation*. 2001;103(15):1992-8.
37. Jayaweera AR, Wei K, Coggins M, Bin JP, Goodman C, Kaul S. Role of capillaries in determining CBF reserve: new insights using myocardial contrast echocardiography. *Am J Physiol*. 1999 Dec;277(6 Pt 2):H2363-72.

-
38. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jun 26;49(25):2379-93.
39. Papaioannou TG, Karatzis EN, Vavuranakis M, Lekakis JP, Stefanadis C. Assessment of vascular wall shear stress and implications for atherosclerotic disease. *International Journal of Cardiology*. 2006;113(1):12-8.
40. Le DE, Bin JP, Coggins MP, Wei K, Lindner JR, Kaul S. Relation between myocardial oxygen consumption and myocardial blood volume: a study using myocardial contrast echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002 Sep;15(9):857-63.
41. Jarhult J, Mellander S. Autoregulation of capillary hydrostatic pressure in skeletal muscle during regional arterial hypo- and hypertension. *Acta Physiol Scand*. 1974 May;91(1):32-41.
42. Buus NH, Bottcher M, Hermansen F, Sander M, Nielsen TT, Mulvany MJ. Influence of nitric oxide synthase and adrenergic inhibition on adenosine-induced myocardial hyperemia. *Circulation*. 2001;104(19):2305-10.
43. Cevese A. Coronary circulation: Nitric oxide and hypercapnic acidosis. *Cardiovascular Research*. 2005;66(1):7-8.
44. Chlopicki S, Kozlovski VI, Lorkowska B, Drelicharz L, Gebaska A. Compensation of endothelium-dependent responses in coronary circulation

- of eNOS-deficient mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2005;46(1):115-23.
45. Dick GM, Bratz IN, Borbouse L, Tune JD. Voltage-dependent K⁺ channels mediate coronary vasodilation in response to ischemia and adenosine. *Circulation*. 2007;116:230-.
46. Domenech RJ, Macho P. [Endothelium and coronary circulation]. *Rev Med Chil*. 1991 Feb;119(2):189-96.
47. Duffy SJ, Castle SF, Harper RW, Meredith IT. Contribution of vasodilator prostanoids and nitric oxide to resting flow, metabolic vasodilation, and flow-mediated dilation in human coronary circulation. *Circulation*. 1999 Nov 9;100(19):1951-7.
48. Hein TW, Belardinelli L, Kuo L. Adenosine A_{2A} Receptors Mediate Coronary Microvascular Dilation to Adenosine: Role of Nitric Oxide and ATP-Sensitive Potassium Channels. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 1999;291(2):655-64.
49. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*. 2003 Feb 7;92(2):e31-40.
50. Saitoh S, Zhang C, Tune JD, Potter B, Kiyooka T, Rogers PA, et al. Hydrogen peroxide: a feed-forward dilator that couples myocardial metabolism to coronary blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Dec;26(12):2614-21.

-
51. Yuan Y, Mier RA, Chilian WM, Zawieja DC, Granger HJ. Interaction of neutrophils and endothelium in isolated coronary venules and arterioles. *Am J Physiol.* 1995 Jan;268(1 Pt 2):H490-8.
52. Yasu T, Greener Y, Jablonski E, Killam AL, Fukuda S, Suematsu M, et al. Activated leukocytes and endothelial cells enhance retention of ultrasound contrast microspheres containing perfluoropropane in inflamed venules. *Int J Cardiol.* 2005 Feb 15;98(2):245-52.
53. Gould KL, Lipscomb K, Hamilton GW. Physiologic basis for assessing critical coronary stenosis. Instantaneous flow response and regional distribution during coronary hyperemia as measures of coronary flow reserve. *Am J Cardiol.* 1974 Jan;33(1):87-94.
54. Uren NG, Melin JA, De Bruyne B, Wijns W, Baudhuin T, Camici PG. Relation between myocardial blood flow and the severity of coronary-artery stenosis. *N Engl J Med.* 1994 Jun 23;330(25):1782-8.
55. de Silva R, Camici PG. Role of positron emission tomography in the investigation of human coronary circulatory function. *Cardiovasc Res.* 1994 Nov;28(11):1595-612.
56. Larkin SW, Clarke JG, Keogh BE, Araujo L, Rhodes C, Davies GJ, et al. Intracoronary endothelin induces myocardial ischemia by small vessel constriction in the dog. *Am J Cardiol.* 1989 Oct 15;64(14):956-8.

-
57. Clarke JG, Davies GJ, Kerwin R, Hackett D, Larkin S, Dawbarn D, et al. Coronary artery infusion of neuropeptide Y in patients with angina pectoris. *Lancet*. 1987 May 9;1(8541):1057-9.
58. McFadden EP, Clarke JG, Davies GJ, Kaski JC, Haider AW, Maseri A. Effect of intracoronary serotonin on coronary vessels in patients with stable angina and patients with variant angina. *N Engl J Med*. 1991 Mar 7;324(10):648-54.
59. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Endothelial dysfunction of the coronary microvasculature is associated with coronary blood flow regulation in patients with early atherosclerosis. *Circulation*. 1991 Nov;84(5):1984-92.
60. Chilian WM, Layne SM, Eastham CL, Marcus ML. Heterogeneous microvascular coronary alpha-adrenergic vasoconstriction. *Circ Res*. 1989 Feb;64(2):376-88.
61. Nabel EG, Ganz P, Gordon JB, Alexander RW, Selwyn AP. Dilation of normal and constriction of atherosclerotic coronary arteries caused by the cold pressor test. *Circulation*. 1988 Jan;77(1):43-52.
62. Gwirtz PA, Overn SP, Mass HJ, Jones CE. Alpha 1-adrenergic constriction limits coronary flow and cardiac function in running dogs. *Am J Physiol*. 1986 Jun;250(6 Pt 2):H1117-26.
63. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlaeger H, Saubier B, Just H. Coronary vasomotion in response to sympathetic stimulation in humans: importance of

the functional integrity of the endothelium. *J Am Coll Cardiol.* 1989 Nov 1;14(5):1181-90.

64. Cecchi F, Olivotto I, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Camici PG. Coronary microvascular dysfunction and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2003 Sep 11;349(11):1027-35.

65. Knaapen P, Germans T, Camici PG, Rimoldi OE, ten Cate FJ, ten Berg JM, et al. Determinants of coronary microvascular dysfunction in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Feb;294(2):H986-93.

66. Olivotto I, Cecchi F, Gistri R, Lorenzoni R, Chiriatti G, Girolami F, et al. Relevance of coronary microvascular flow impairment to long-term remodeling and systolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Mar 7;47(5):1043-8.

67. Soliman OI, Knaapen P, Geleijnse ML, Dijkmans PA, Anwar AM, Nemes A, et al. Assessment of intravascular and extravascular mechanisms of myocardial perfusion abnormalities in obstructive hypertrophic cardiomyopathy by myocardial contrast echocardiography. *Heart.* 2007 Oct;93(10):1204-12.

68. Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res.* 1991 Jul;69(1):107-15.

-
69. Kaufmann PA, Gneccchi-Ruscione T, Schafers KP, Luscher TF, Camici PG. Low density lipoprotein cholesterol and coronary microvascular dysfunction in hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Jul;36(1):103-9.
70. Pitkanen OP, Raitakari OT, Niinikoski H, Nuutila P, Iida H, Voipio-Pulkki LM, et al. Coronary flow reserve is impaired in young men with familial hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 1996 Dec;28(7):1705-11.
71. Opherk D, Mall G, Zebe H, Schwarz F, Weihe E, Manthey J, et al. Reduction of coronary reserve: a mechanism for angina pectoris in patients with arterial hypertension and normal coronary arteries. *Circulation.* 1984 Jan;69(1):1-7.
72. Hamasaki S, Al Suwaidi J, Higano ST, Miyauchi K, Holmes DR, Jr., Lerman A. Attenuated coronary flow reserve and vascular remodeling in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 2000 May;35(6):1654-60.
73. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E, Attali JR. Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes.* 1993 Jul;42(7):1017-25.
74. Arora GD, Reeves WC, Movahed A. Alteration of coronary perfusion reserve in hypertensive patients with diabetes. *J Hum Hypertens.* 1994 Jan;8(1):51-7.

-
75. Galderisi M, Capaldo B, Sidiropulos M, D'Errico A, Ferrara L, Turco A, et al. Determinants of reduction of coronary flow reserve in patients with type 2 diabetes mellitus or arterial hypertension without angiographically determined epicardial coronary stenosis. *Am J Hypertens.* 2007 Dec;20(12):1283-90.
76. Cannon RO, 3rd, Quyyumi AA, Schenke WH, Fananapazir L, Tucker EE, Gaughan AM, et al. Abnormal cardiac sensitivity in patients with chest pain and normal coronary arteries. *J Am Coll Cardiol.* 1990 Nov;16(6):1359-66.
77. Panting JR, Gatehouse PD, Yang GZ, Grothues F, Firmin DN, Collins P, et al. Abnormal subendocardial perfusion in cardiac syndrome X detected by cardiovascular magnetic resonance imaging. *N Engl J Med.* 2002 Jun 20;346(25):1948-53.
78. Valdivielso P, Gomez-Doblas JJ, Macias M, Haro-Liger M, Fernandez-Nebro A, Sanchez-Chaparro MA, et al. Lupus-associated endothelial dysfunction, disease activity and arteriosclerosis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008 Sep-Oct;26(5):827-33.
79. Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circulation.* 1990 May;81(5):1586-93.

-
80. Yokoyama I, Ohtake T, Momomura S, Nishikawa J, Sasaki Y, Omata M. Reduced coronary flow reserve in hypercholesterolemic patients without overt coronary stenosis. *Circulation*. 1996 Dec 15;94(12):3232-8.
81. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986 Oct 23;315(17):1046-51.
82. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Maruoka Y, Kai H, et al. Impaired coronary blood flow response to acetylcholine in patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993 Jan;91(1):29-37.
83. Uren NG, Marraccini P, Gistri R, de Silva R, Camici PG. Altered coronary vasodilator reserve and metabolism in myocardium subtended by normal arteries in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Sep;22(3):650-8.
84. Dayanikli F, Grambow D, Muzik O, Mosca L, Rubenfire M, Schwaiger M. Early detection of abnormal coronary flow reserve in asymptomatic men at high risk for coronary artery disease using positron emission tomography. *Circulation*. 1994 Aug;90(2):808-17.
85. Nemes A, Neu K, Forster T, Gruber N, Csanady M. Relationship between hypercholesterolemia, lipid-lowering therapy and coronary flow velocity reserve evaluated by stress transesophageal echocardiography in

patients with a negative coronary angiogram. *Echocardiography*. 2004 Jan;21(1):37-41.

86. Baller D, Notohamiprodjo G, Gleichmann U, Holzinger J, Weise R, Lehmann J. Improvement in coronary flow reserve determined by positron emission tomography after 6 months of cholesterol-lowering therapy in patients with early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999 Jun 8;99(22):2871-5.

87. Caliskan M, Erdogan D, Gullu H, Topcu S, Ciftci O, Yildirim A, et al. Effects of atorvastatin on coronary flow reserve in patients with slow coronary flow. *Clin Cardiol*. 2007 Sep;30(9):475-9.

88. Fujimoto K, Hozumi T, Watanabe H, Shimada K, Takeuchi M, Sakanoue Y, et al. Effect of fluvastatin therapy on coronary flow reserve in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 2004 Jun 1;93(11):1419-21, A10.

89. Mellwig KP, Baller D, Gleichmann U, Moll D, Betker S, Weise R, et al. Improvement of coronary vasodilatation capacity through single LDL apheresis. *Atherosclerosis*. 1998 Jul;139(1):173-8.

90. Chan SY, Brunken RC, Czernin J, Porenta G, Kuhle W, Krivokapich J, et al. Comparison of maximal myocardial blood flow during adenosine infusion with that of intravenous dipyridamole in normal men. *J Am Coll Cardiol*. 1992 Oct;20(4):979-85.

91. Kjaer A, Meyer C, Wachtell K, Olsen MH, Ibsen H, Opie L, et al. Positron emission tomographic evaluation of regulation of myocardial perfusion in physiological (elite athletes) and pathological (systemic hypertension) left ventricular hypertrophy. *American Journal of Cardiology*. 2005;96(12):1692-8.
92. Dijkmans PA, Knaapen P, Sieswerda GT, Aiazian E, Visser CA, Lammertsma AA, et al. Quantification of myocardial perfusion using intravenous myocardial contrast echocardiography in healthy volunteers: comparison with positron emission tomography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2006 Mar;19(3):285-93.
93. Vogel R, Indermuhle A, Reinhardt J, Meier P, Siegrist PT, Namdar M, et al. The quantification of absolute myocardial perfusion in humans by contrast echocardiography: algorithm and validation. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(5):754-62.
94. Lindner JR, Song J, Jayaweera AR, Sklenar J, Kaul S. Microvascular rheology of Definity microbubbles after intra-arterial and intravenous administration. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002 May;15(5):396-403.
95. Keller MW, Segal SS, Kaul S, Duling B. The behavior of sonicated albumin microbubbles within the microcirculation: a basis for their use during myocardial contrast echocardiography. *Circ Res*. 1989 Aug;65(2):458-67.
96. Jayaweera AR, Edwards N, Glasheen WP, Villanueva FS, Abbott RD, Kaul S. In vivo myocardial kinetics of air-filled albumin microbubbles during

myocardial contrast echocardiography. Comparison with radiolabeled red blood cells. *Circ Res.* 1994 Jun;74(6):1157-65.

97. Wei K, Jayaweera AR, Firoozan S, Linka A, Skyba DM, Kaul S. Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion. *Circulation.* 1998 Feb 10;97(5):473-83.

98. Bin JP, Le DE, Jayaweera AR, Coggins MP, Wei K, Kaul S. Direct effects of dobutamine on the coronary microcirculation: comparison with adenosine using myocardial contrast echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2003;16(8):871-9.

99. Raheer MJ, Thibault H, Poh KK, Liu R, Halpern EF, Derumeaux G, et al. In vivo characterization of murine myocardial perfusion with myocardial contrast echocardiography: validation and application in nitric oxide synthase 3 deficient mice. *Circulation.* 2007;116(11):1250-7.

100. Ward RP, Mor-Avi V, Lang RM. Assessment of left ventricular function with contrast echocardiography. *Cardiol Clin.* 2004 May;22(2):211-9.

101. FDA. DEFINITY® - Vial for (Perflutren Lipid Microsphere) Injectable Suspension. 2001; Available from: http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2001/21-064_Definity_prntlbl.pdf.

102. Lafitte S, Masugata H, Peters B, Togni M, Strachan M, Yao B, et al. Accuracy and reproducibility of coronary flow rate assessment by real-time

contrast echocardiography: in vitro and in vivo studies. *J Am Soc Echocardiogr.* 2001;14(10):1010-9.

103. Indermuhle A, Vogel R, Meier P, Wirth S, Stoop R, Mohaupt MG, et al. The relative myocardial blood volume differentiates between hypertensive heart disease and athlete's heart in humans. *Eur Heart J.* 2006;27(13):1571-8.

104. Pacella JJ, Villanueva FS. Effect of coronary stenosis on adjacent bed flow reserve - Assessment of microvascular mechanisms using myocardial contrast echocardiography. *Circulation.* 2006;114(18):1940-7.

105. Kowatsch I, Tsutsui JM, Osorio AF, Uchida AH, Machiori GG, Lopes ML, et al. Head-to-head comparison of dobutamine and adenosine stress real-time myocardial perfusion echocardiography for the detection of coronary artery disease. *J Am Soc Echocardiogr.* 2007 Sep;20(9):1109-17.

106. Tayama S, Okumura K, Matsunaga T, Tsunoda R, Tabuchi T, Iwasa A, et al. Influence of chronic nitric oxide inhibition of coronary blood flow regulation: a study of the role of endogenous adenosine in anesthetized, open-chested dogs. *Jpn Circ J.* 1998 May;62(5):371-8.

107. Nakhostine N, Lamontagne D. Adenosine contributes to hypoxia-induced vasodilation through ATP-sensitive K⁺ channel activation. *Am J Physiol.* 1993 Oct;265(4 Pt 2):H1289-93.

108. Belardinelli L, Linden J, Berne RM. The cardiac effects of adenosine. *Prog Cardiovasc Dis.* 1989 Jul-Aug;32(1):73-97.

109. Rossen JD, Oskarsson H, Minor RL, Jr., Talman CL, Winniford MD. Effect of adenosine antagonism on metabolically mediated coronary vasodilation in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1994 May;23(6):1421-6.
110. Conant AR, Jarvis SM. Nucleoside influx and efflux in guinea-pig ventricular myocytes. Inhibition by analogues of lidoflazine. *Biochem Pharmacol*. 1994 Aug 30;48(5):873-80.
111. Pearson JD, Carleton JS, Gordon JL. Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem J*. 1980 Aug 15;190(2):421-9.
112. Abebe W, Hussain T, Olanrewaju H, Mustafa SJ. Role of nitric oxide in adenosine receptor-mediated relaxation of porcine coronary artery. *Am J Physiol*. 1995 Nov;269(5 Pt 2):H1672-8.
113. Yada T, Hiramatsu O, Tachibana H, Toyota E, Kajiya F. Role of NO and K⁽⁺⁾(ATP) channels in adenosine-induced vasodilation on in vivo canine subendocardial arterioles. *Am J Physiol*. 1999 Nov;277(5 Pt 2):H1931-9.
114. Dhalla AK, Wong MY, Wang WQ, Biaggioni I, Belardinelli L. Tachycardia caused by A_{2A} adenosine receptor agonists is mediated by direct sympathoexcitation in awake rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Feb;316(2):695-702.
115. Wilson RF, Wyche K, Christensen BV, Zimmer S, Laxson DD. Effects of adenosine on human coronary arterial circulation. *Circulation*. 1990 Nov;82(5):1595-606.

116. Verani MS, Mahmarian JJ, Hixson JB, Boyce TM, Staudacher RA. Diagnosis of coronary artery disease by controlled coronary vasodilation with adenosine and thallium-201 scintigraphy in patients unable to exercise. *Circulation*. 1990 Jul;82(1):80-7.
117. Ogilby JD, Iskandrian AS, Untereker WJ, Heo J, Nguyen TN, Mercurio J. Effect of intravenous adenosine infusion on myocardial perfusion and function. Hemodynamic/angiographic and scintigraphic study. *Circulation*. 1992 Sep;86(3):887-95.
118. Mastrocolla LE. Cintilografia do miocárdio com tecnécio 99m-MIBI associada à administração de adenosina em portadores de doença arterial coronária: implicações para a tomada de decisão. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.
119. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992 Nov 7;340(8828):1111-5.
120. Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, Theroux P. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. *Circulation*. 1999 Jun 29;99(25):3227-33.

-
121. Yildirim A, Tokgozoglu SL, Oduncu T, Oto A, Haznedaroglu I, Akinci D, et al. Soy protein diet significantly improves endothelial function and lipid parameters. *Clin Cardiol*. 2001 Nov;24(11):711-6.
122. Perticone F, Ceravolo R, Maio R, Cloro C, Candigliota M, Scozzafava A, et al. Effects of atorvastatin and vitamin C on endothelial function of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*. 2000 Oct;152(2):511-8.
123. Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, et al. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32(1):123-7.
124. Lekakis JP, Papamichael CM, Barbaki P, Papaioannou TG, Stamatelopoulos KS, Dagre AG, et al. Comparison of low-density lipoprotein cholesterol lowering by pravastatin to <100 mg/dl versus >100 mg/dl on brachial artery vasoreactivity in patients with severe hypercholesterolemia and previous atherosclerotic events or diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2002 Apr 1;89(7):857-60.
125. Arcaro G, Zenere BM, Travia D, Zenti MG, Covi G, Lechi A, et al. Non-invasive detection of early endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic subjects. *Atherosclerosis*. 1995 Apr 24;114(2):247-54.
126. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, et al. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia

using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am J Cardiol.* 1993 Jul 15;72(2):171-6.

127. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005 Dec;18(12):1440-63.

128. CDC. Overweight and Obesity. US Department of health and human services - Centers for disease control and prevention; 2009 [cited 2009 07/02/2009]; Available from: <http://www.cdc.gov/nccdphp/dnpa/obesity/defining.htm>.

129. Miller JM, Rochitte CE, Dewey M, Arbab-Zadeh A, Niinuma H, Gottlieb I, et al. Diagnostic performance of coronary angiography by 64-row CT. *N Engl J Med.* 2008 Nov 27;359(22):2324-36.

130. Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, et al. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1998 Jul;32(1):123-7.

-
131. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Correlation of cold pressor and flow-mediated brachial artery diameter responses with the presence of coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1995 Apr 15;75(12):783-7.
132. Mason RE, Likar I. A new system of multiple-lead exercise electrocardiography. *Am Heart J.* 1966 Feb;71(2):196-205.
133. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification. *Eur J Echocardiogr.* 2006 Mar;7(2):79-108.
134. Wei K, Ragosta M, Thorpe J, Coggins M, Moos S, Kaul S. Noninvasive quantification of coronary blood flow reserve in humans using myocardial contrast echocardiography. *Circulation.* 2001 May 29;103(21):2560-5.
135. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, et al. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation.* 2002 Jan 29;105(4):539-42.
136. Nikolaou K, Sagmeister S, Knez A, Klotz E, Wintersperger BJ, Becker CR, et al. Multidetector-row computed tomography of the coronary arteries: predictive value and quantitative assessment of non-calcified vessel-wall changes. *Eur Radiol.* 2003 Nov;13(11):2505-12.

137. Hong C, Bae KT, Pilgram TK. Coronary artery calcium: accuracy and reproducibility of measurements with multi-detector row CT--assessment of effects of different thresholds and quantification methods. *Radiology*. 2003 Jun;227(3):795-801.
138. D'Agostino RB. Tests for Normal Distribution. In: D'Agostino RB, Stepenes, M A, editor. *Goodness-Of-Fit Techniques*: Macel Decker; 1986.
139. Otsuka R, Watanabe H, Hirata K, Tokai K, Muro T, Yoshiyama M, et al. Acute effects of passive smoking on the coronary circulation in healthy young adults. *JAMA*. 2001 Jul 25;286(4):436-41.
140. Zeiher AM, Schachinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1094-100.
141. Park SM, Shim WJ, Song WH, Lim DS, Kim YH, Ro YM. Effects of smoking on coronary blood flow velocity and coronary flow reserve assessed by transthoracic Doppler echocardiography. *Echocardiography*. 2006 Jul;23(6):465-70.
142. Bountiukos M, Rizzello V, Krenning BJ, Bax JJ, Kertai MD, Vourvouri EC, et al. Effect of atorvastatin on myocardial contractile reserve assessed by tissue Doppler imaging in moderately hypercholesterolemic patients without heart disease. *Am J Cardiol*. 2003 Sep 1;92(5):613-6.
143. Bugiardini R, Manfrini O, Pizzi C, Fontana F, Morgagni G. Endothelial function predicts future development of coronary artery disease: a study of

women with chest pain and normal coronary angiograms. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21):2518-23.

144. Ramires JA, Sposito AC, Mansur AP, Coelho OR, Maranhao M, Cesar LA. Cholesterol lowering with statins reduces exercise-induced myocardial ischemia in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2001 Nov 15;88(10):1134-8.

145. Mostaza JM, Gomez MV, Gallardo F, Salazar ML, Martin-Jadraque R, Plaza-Celemin L, et al. Cholesterol reduction improves myocardial perfusion abnormalities in patients with coronary artery disease and average cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Jan;35(1):76-82.

146. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1991 Feb;83(2):391-401.

147. Pitkanen OP, Nuutila P, Raitakari OT, Porkka K, Iida H, Nuotio I, et al. Coronary flow reserve in young men with familial combined hyperlipidemia. *Circulation*. 1999 Apr 6;99(13):1678-84.

148. Guethlin M, Kasel AM, Coppentrath K, Ziegler S, Delius W, Schwaiger M. Delayed response of myocardial flow reserve to lipid-lowering therapy with fluvastatin. *Circulation*. 1999 Feb 2;99(4):475-81.

149. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, et al. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute

coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. JAMA. 2001 Apr 4;285(13):1711-8.

150. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. N Engl J Med. 1998 Nov 5;339(19):1349-57.

151. LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. N Engl J Med. 2005 Apr 7;352(14):1425-35.

152. Blankenhorn DH, Azen SP, Krams DM, Mack WJ, Cashin-Hemphill L, Hodis HN, et al. Coronary angiographic changes with lovastatin therapy. The Monitored Atherosclerosis Regression Study (MARS). Ann Intern Med. 1993 Nov 15;119(10):969-76.

153. Shiomi M, Yamada S, Ito T. Atheroma stabilizing effects of simvastatin due to depression of macrophages or lipid accumulation in the atheromatous plaques of coronary plaque-prone WHHL rabbits. Atherosclerosis. 2005 Feb;178(2):287-94.

154. Tahara N, Kai H, Ishibashi M, Nakaura H, Kaida H, Baba K, et al. Simvastatin attenuates plaque inflammation: evaluation by fluorodeoxyglucose positron emission tomography. J Am Coll Cardiol. 2006 Nov 7;48(9):1825-31.

155. Brener SJ, Ivanc TB, Hu T. The relation between extent of coronary artery disease measured by quantitative coronary angiography and changes in lipid profile: insights from trials of atherosclerosis regression. *J Invasive Cardiol.* 2008 Jun;20(6):261-5.
156. McGinn AL, White CW, Wilson RF. Interstudy variability of coronary flow reserve. Influence of heart rate, arterial pressure, and ventricular preload. *Circulation.* 1990;81(4):1319-30.
157. Antony I, Nitenberg A. Coronary vascular reserve is similarly reduced in hypertensive patients without any other coronary risk factors and in normotensive smokers and hypercholesterolemic patients with angiographically normal coronary arteries. *Am J Hypertens.* 1997 Feb;10(2):181-8.
158. Saito M, Okayama H, Nishimura K, Ogimoto A, Ohtsuka T, Inoue K, et al. Possible link between large artery stiffness and coronary flow velocity reserve. *Heart.* 2008 Jun;94(6):e20.
159. Rim SJ, Leong-Poi H, Lindner JR, Wei K, Fisher NG, Kaul S. Decrease in coronary blood flow reserve during hyperlipidemia is secondary to an increase in blood viscosity. *Circulation.* 2001 Nov 27;104(22):2704-9.
160. Chareonthaitawee P, Kaufmann PA, Rimoldi O, Camici PG. Heterogeneity of resting and hyperemic myocardial blood flow in healthy humans. *Cardiovasc Res.* 2001;50(1):151-61.

161. Nemes A, Forster T, Csanady M. Impaired coronary flow velocity reserve and aortic distensibility in patients with untreated hypercholesterolemia--an echocardiographic study. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2007 Feb;23(1):15-23.
162. Rodriguez-Porcel M, Zhu XY, Chade AR, Amores-Arriaga B, Caplice NM, Ritman EL, et al. Functional and structural remodeling of the myocardial microvasculature in early experimental hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Mar;290(3):H978-84.
163. Rodriguez-Iturbe B, Sepassi L, Quiroz Y, Ni Z, Wallace DC, Vaziri ND. Association of mitochondrial SOD deficiency with salt-sensitive hypertension and accelerated renal senescence. *J Appl Physiol*. 2007 Jan;102(1):255-60.
164. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb*. 1993 Feb;13(2):197-204.
165. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001 May;107(10):1255-62.
166. Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*. 1984 Jul-Aug;4(4):357-64.

167. Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis*. 1986 Sep-Oct;6(5):505-10.
168. Lamb DJ, Wilkins GM, Leake DS. The oxidative modification of low density lipoprotein by human lymphocytes. *Atherosclerosis*. 1992 Feb;92(2-3):187-92.
169. Camargo EA, Delbin MA, Ferreira T, Landucci EC, Antunes E, Zanesco A. Influence of acute pancreatitis on the in vitro responsiveness of rat mesenteric and pulmonary arteries. *BMC Gastroenterol*. 2008;8:19.
170. Martin WJ, 2nd. Neutrophils kill pulmonary endothelial cells by a hydrogen-peroxide-dependent pathway. An in vitro model of neutrophil-mediated lung injury. *Am Rev Respir Dis*. 1984 Aug;130(2):209-13.
171. Minor RL, Jr., Myers PR, Guerra R, Jr., Bates JN, Harrison DG. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest*. 1990 Dec;86(6):2109-16.
172. Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res*. 1991 Nov;69(5):1293-300.
173. Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 May;292(5):H2023-31.

174. Thengchaisri N, Kuo L. Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Dec;285(6):H2255-63.
175. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(12):1521-30.
176. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):787-90.
177. Skinner FP, Scott RF, Morrison ES, Imai H, Jarmolych J, Lee KT. High energy phosphate compounds and mitochondrial function in ischemic myocardium of swine with advanced coronary atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1973 Dec;5(6):515-26.
178. Talini E, Di Bello V, Bianchi C, Palagi C, Delle Donne MG, Penno G, et al. Early impairment of left ventricular function in hypercholesterolemia and its reversibility after short term treatment with rosuvastatin A preliminary echocardiographic study. *Atherosclerosis*. 2008 Mar;197(1):346-54.
179. Alonso R, Mata P, De Andres R, Villacastin BP, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Sustained long-term improvement of arterial endothelial function

in heterozygous familial hypercholesterolemia patients treated with simvastatin. *Atherosclerosis*. 2001 Aug;157(2):423-9.

180. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Jan 16;39(2):257-65.

181. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Jr., Fuster V. AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Oct;34(4):1348-59.

182. Dourado PM, Tsutsui JM, Chagas AC, Sbrano JC, Aiello VD, Luz PL, et al. Value of adenosine infusion for infarct size determination using real-time myocardial contrast echocardiography. *Cardiovasc Ultrasound*. 2006;4:10.

183. Sbrano JC, Tsutsui JM, Andrade JL, Carlos Nicolau J, Meneghetti JC, Franchini Ramires J, et al. Detection of functional recovery using low-dose dobutamine and myocardial contrast echocardiography after acute myocardial infarction treated with successful thrombolytic therapy. *Echocardiography*. 2005 Jul;22(6):496-502.

184. Rodrigues AC, Bacal F, Medeiros CC, Bocchi E, Sbrana J, Morhy SS, et al. Noninvasive detection of coronary allograft vasculopathy by myocardial contrast echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005 Feb;18(2):116-21.