

Adriana Ferreira Grosso

**Ações anti-inflamatórias de pioglitazona e sinvastatina:  
comparação entre plasma e tecido adiposo epicárdico  
em pacientes com doença arterial coronariana e  
síndrome metabólica**

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Protásio Lemos da Luz

São Paulo

2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Grosso, Adriana Ferreira

Ações anti-inflamatórias de pioglitazona e sinvastatina : comparação entre plasma e tecido adiposo epicárdico em pacientes com doença arterial coronariana e síndrome metabólica / Adriana Ferreira Grosso. -- São Paulo, 2012.

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

Orientador: Protásio Lemos da Luz.

Descritores: 1.Tecido adiposo epicárdico 2.Inflamação 3.Doença das coronárias 4.Síndrome metabólica X 5.Pioglitazona 6.Sinvastatina

USP/FM/DBD-143/12

---

# Dedicatória

Dedico esta tese ao **Gilberto** e à **Giulia**, meus grandes amores, por me oferecerem nesta vida toda a alegria, carinho e orgulho que eu jamais poderia imaginar.

Dedico aos meus pais **Luiz** e **Mafalda** e irmãos **Luiz Alberto**, **Maria Angela** e **Eduardo**, por representarem para mim, cada um a seu modo, exemplos a serem seguidos.

---

# Agradecimientos

Este estudo é resultado da dedicação, trabalho e envolvimento de muitas pessoas as quais serei eternamente grata:

- **Prof. Dr. Protásio Lemos da Luz**, que me deu a oportunidade de continuar a formação acadêmica e que será sempre exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa, de quem tenho imenso orgulho de ter sido aluna.
- **Dr. Sérgio Ferreira de Oliveira** que acompanhou a seleção e o tratamento dos pacientes e que muito me ensinou sobre a prática clínica.
- **Prof. Dr. Francisco R. M. Laurindo**, pesquisador e mestre competente com quem tive a grata satisfação de trocar ideias e ouvir sugestões.
- **Todos os pacientes e voluntários** que depositaram em mim confiança na realização deste trabalho.
- **Dr. Lauro T. Kawabe**, pela gentileza e colaboração em agendar os pacientes participantes do protocolo de pesquisa.
- **Marisa F. da Silva Góes, Karoline Medeiros Dias, Juliana C. P. Rocha** por compartilharem comigo seus conhecimentos da prática de enfermagem e pela dedicação junto aos pacientes.
- **Sílvia M. Furtado, Fabiana N. S. Lima, Simone Souza Santos e Michelle Pereira**, secretárias dedicadas e sempre dispostas a ajudar.
- **Laura I. V. Brandizzi, Vanda M. Yoshida, Leonardo Tanaka, Leonora Loppnow e Vítor Debbas** pela disponibilidade em processar amostras, armazená-las, receber materiais e pelas gentilezas do dia-a-dia.
- **Dr. Desidério Favarato, Dra. Silmara R. Coimbra, Dra. Maria Cecília Solimene, Dr. Fernando H. Cesena e Dr. Antonio Casella Filho**, exemplos de profissionais dedicados com os quais tive o privilégio de conviver e aprender.
- **Dra. Célia M. C. Strunz, Adriana Nogueira e funcionários** pelas orientações laboratoriais e análises clínicas.
- **Cirurgiões e suas respectivas equipes: Prof. Dr. Pablo M. A. Pomerantzeff** da Unidade de Cardiopatia Valvar, **Prof. Dr. Luiz Alberto de O. Dallan** da Unidade de Cardiopatia Coronariana, **Prof. Dr. Fábio Biscegli Jatene** da

Unidade de Cirurgia Torácica, **Prof. Dr. Noedir A. G. Stolf**, da Diretoria da Divisão de Cirurgia Torácica e Cardiovascular pela retirada das biópsias de tecido adiposo epicárdico durante os procedimentos cirúrgicos.

▪ **Prof. Dr. José Eduardo Kriger e sua equipe** pela disponibilização do laboratório para a realização dos experimentos de expressão gênica e, em especial, à **Dra Miriam H. F. Alaniz e Dra. Mariliza Velho**, pela expressiva colaboração nos experimentos de RT-PCR.

▪ **Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi** e as biólogas **Márcia M. Reis, Suely A. P. Palomino e Renata M. Ikegami** pelo compartilhamento de rico conhecimento em patologia e análises de imunohistoquímica.

▪ **Prof. Dr. Whady Armindo Hueb**, responsável pela Unidade Clínica de Aterosclerose, que possibilitou a inserção de parte dos pacientes na pesquisa.

▪ **Funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico** do InCor.

▪ **Dra. Sílvia Morandi El Faro e Dra. Fernanda Gomes de Melo**, exemplos de profissionais competentes, mulheres batalhadoras e seres humanos transparentes, dignos de admiração.

▪ **Colegas professores** que tornam a árdua tarefa de lecionar em fantásticas histórias de vida.

▪ **Ex e atuais alunos** por me instigarem na busca por mais e mais conhecimento.

▪ **Amigos e família** pela paciência de todas as horas.

Apoio:

**FAPESP**: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

---

# Reflexões



...but when the Rabbit actually took a watch out of its waistcoat-pocket, and looked at it, and then hurried on, Alice started to her feet, for it flashed across her mind that she had never before seen a rabbit with either a waistcoat-pocket, or a watch to take out of it, and burning with curiosity, she *ran* across the field after it, and fortunately was just in time to see it pop down a large rabbit-hole under the hedge.

***Alice's Adventures in Wonderland, by Lewis Carroll (1832-1898)***

Há sem dúvida quem ame o infinito,  
Há sem dúvida quem deseje o impossível,  
Há sem dúvida quem não queira nada.  
Três tipos de idealistas, e eu nenhum deles:  
Porque eu amo infinitamente o finito,  
Porque eu desejo impossivelmente o possível,  
Porque eu quero tudo, ou um pouco mais...

***Álvaro de Campos (1890-1935):  
heterônimo de Fernando Pessoa***

A fé ri das impossibilidades.

**Salmos 37**

---

# Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

Página

## **INTRODUÇÃO**

- Tecido adiposo.....2
- Tecido adiposo, adipocinas, citocinas e quimocinas .....5
- Tecido adiposo, inflamação e risco cardiometabólico .....9
- Tecido adiposo epicárdico .....10
- Glitazonas e receptores nucleares.....13
- Estatinas e feitos pleiotrópicos.....15
- Justificativa do estudo e escolha do modelo experimental .....17

## **OBJETIVOS**

- Objetivos ..... 20

## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

- Pacientes estudados e critérios de elegibilidade ..... 22
- Critérios de Inclusão ..... 25
- Critérios de exclusão ..... 25
- Desenho do estudo .....26
- Coleta de amostra de sangue, coleta de fragmentos do Tecido Adiposo Epicárdico e análises laboratoriais..... 31

▪▪ Coleta e análise de amostras sanguíneas .....	31
▪▪ Coleta e análise de biópsias de TAE .....	33
▪▪▪ Imunohistoquímica .....	33

## **TAMANHO AMOSTRAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

▪ Cálculo do tamanho amostral .....	38
▪ Análise estatística .....	38

## **RESULTADOS**

▪ Caracterização dos pacientes valvopatas .....	41
▪ Índices antropométricos, lipídicos e glicêmicos.....	41
▪ Biomarcadores inflamatórios plasmáticos e teciduais.....	46
▪ Caracterização dos pacientes portadores de doença arterial coronariana e síndrome metabólica.....	48
▪ Índices antropométricos, lipídicos e glicêmicos.....	48
▪ Biomarcadores inflamatórios plasmáticos.....	52
▪ Índices lipídicos, glicêmicos e biomarcador inflamatório plasmático antes e após tratamento com Pioglitazona e Pioglitazona + Sinvastatina.....	57
▪ Células e biomarcadores inflamatórios teciduais.....	62
▪ Correlações plasma-tecido.....	69

## **DISCUSSÃO**

▪ Discussão.....	77
▪ Limitações do estudo.....	90

## **CONCLUSÕES**

▪ Conclusões.....	92
-------------------	----

## **ANEXOS**

▪ Anexo: TCLE .....	94
---------------------	----

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

▪ Referências bibliográficas.....	98
-----------------------------------	----

---

# **Lista de Abreviaturas**



**AAS** – ácido acetilsalicílico

**ADMA** – dimetilarginina assimétrica

**AGL** – ácido graxo livre

**ANOVA** – análise de variância

**apoB** – apolipoproteína B

**BNP** - peptídeo natriurético plasmático

**BRA** – fármacos bloqueadores do receptor de angiotensina

**CD** - proteínas

**cDNA** – ácido desoxirribonucléico complementar

**COX** - ciclooxigenase

**CT** – colesterol total

**DAB** - diaminobenzidina

**DAC** – doença arterial coronariana

**DCV** – doenças cardiovasculares

**DM2** – diabetes melito do tipo 2

**Elisa** – ensaio imunoenzimático de absorvância

**eNOS** – sintase do óxido nítrico endotelial

**GLUT** – receptor celular de glicose

**HbA1c** – hemoglobina glicosilada

**HDL-c** – lipoproteína de alta densidade

**HMG-CoA redutase** – hidroximetilglutaril coenzima-A redutase

**ICAM** – molécula de adesão intracelular

**iECA** - inibidor da enzima conversora de angiotensina

**i $\kappa$ B** – inibidor do fator de transcrição NF $\kappa$ B

**IL-6** – interleucina-6

**IL-4** – interleucina-4

**IL-1 $\beta$**  – interleucina 1 beta

**IRS** – substrato do receptor de insulina

**LDL-c** – lipoproteínas de baixa densidade

**LHS** – lipase hormônio sensível

**LLP** – lipase lipoprotéica

**LXR** – receptor X hepático

**MCP-1** – proteína quimiotática de monócitos

**MMP-9** – metaloproteinase-9

**NF $\kappa$ B** – fator nuclear de transcrição

**PAI-I** – inibidor do ativador do plasminogênio

**PBS** – tampão salina fosfato

**PCR-us** – proteína C reativa ultra-sensível

**PI-3K** – fosfatidilinositol 3 quinase

**PPARs** – receptores ativadores do proliferador de peroxissoma

**RI** – resistência à insulina

**RM** – revascularização miocárdica

**RT-PCR** – reação em cadeia da polimerase em tempo real

**SMet** – síndrome metabólica

**SOCS** – supressores de sinalização de citocinas

**TAB** – tecido adiposo branco

**TAE** – tecido adiposo epicárdico

**TAM** – tecido adiposo marrom

**TG** - triglicérides

**TNF- $\alpha$**  – fator de necrose tumoral alfa

**TRIS/EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético

**TRizol®** - solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato

**TZD** - tiazolidinediona

**VCAM** – molécula de adesão celular vascular

---

# **Lista de figuras**

	Página
<b>Figura 1.</b> Diagrama experimental do estudo.	
A) Recrutamento dos pacientes.....	29
B) Composição dos grupos de estudo.....	30
<b>Figura 2.</b> Posição da retirada dos fragmentos de TAE.....	33
<b>Figura 3.</b> Proporção de pacientes valvopatas (n=20) dos sexos masculino (M) e feminino (F) comparada à do grupo com DAC/SMet (n=73).....	41
<b>Figura 4.</b> Distribuição da idade dos pacientes valvopatas (n=20) comparada à do grupo com DAC/SMet (n=73).....	42
<b>Figura 5.</b> Valores de circunferência da cintura dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73).....	42
<b>Figura 6.</b> Valores de pressão arterial sistólica dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) no início da pesquisa.....	42
<b>Figura 7.</b> Valores de pressão arterial diastólica dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) no início da pesquisa.....	43
<b>Figura 8.</b> Valores do peso dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) no início da pesquisa.....	43
<b>Figura 9.</b> Peso dos pacientes valvopatas (n=20) comparado ao do grupo com DAC/SMet (n=73) ao final da pesquisa.....	43
<b>Figura 10.</b> Valores finais de triglicérides plasmáticos dos valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73).....	44
<b>Figura 11.</b> Valores de apolipoproteína B plasmática dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) ao final da pesquisa.....	45

<b>Figura 12.</b> Valores de glicemia de jejum dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) ao final da pesquisa.....	45
<b>Figura 13.</b> Valores de hemoglobina glicada dos pacientes valvopatas (n=20) comparada à do grupo com DAC/SMet (n=73) ao final da pesquisa.....	45
<b>Figura 14.</b> Valores finais de LDL-c dos pacientes do grupo com DAC/SMet (n=73). *p<0,008 em relação ao grupo não tratado.....	51
<b>Figura 15.</b> Valores finais de triglicérides dos pacientes do grupo com DAC/SMet (n=73).....	51
<b>Figura 16.</b> Valores finais de HDL-c dos pacientes do grupo com DAC/SMet (n=73). *p<0,02 em relação ao grupo não tratado.....	51
<b>Figura 17.</b> Valores finais de PCRus plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet.....	54
<b>Figura 18.</b> Valores finais de MCP-1 plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet.....	54
<b>Figura 19.</b> Valores finais de MMP-9 plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet.em relação aos demais grupos.....	54
<b>Figura 20.</b> Valores finais de IL-6 plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet.....	55
<b>Figura 21.</b> Valores finais de TNF-alfa plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet.....	55
<b>Figura 22.</b> Valores finais de resistina plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet.....	56
<b>Figura 23.</b> Valores finais de leptina plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet.....	56

<b>Figura 24.</b> Valores finais de adiponectina plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet.....	56
<b>Figura 25.</b> Variações do LDL-c dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina. (A) LDL-c no início da pesquisa e após tratamento. (B) Variação do LDL-c a partir do basal.....	59
<b>Figura 26.</b> Variações dos triglicérides dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina. (A) Triglicérides no início da pesquisa e após tratamento. (B) Variação dos triglicérides a partir do basal.....	59
<b>Figura 27.</b> Variações do HDL-c dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina. HDL-c no início da pesquisa e após tratamento. (B) Variação do HDL-c a partir do basal.....	60
<b>Figura 28.</b> Variações da glicose plasmática dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina. (A) Glicemia no início da pesquisa e após tratamento. (B) Variação da glicose plasmática a partir do basal.....	60
<b>Figura 29.</b> Variação basal de PCRus plasmática dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina.....	61
<b>Figura 30.</b> Porcentagem de macrófagos em TAE.....	64
<b>Figura 31.</b> Porcentagem de linfócitos B em TAE.....	64
<b>Figura 32.</b> Porcentagem de linfócitos T em TAE.....	64
<b>Figura 33.</b> Porcentagem de IL-6 em TAE.....	66
<b>Figura 34.</b> Porcentagem de TNF- $\alpha$ em TAE.....	66
<b>Figura 35.</b> Porcentagem de leptina em TAE.....	67

<b>Figura 36.</b> Porcentagem de resistina em TAE.....	67
<b>Figura 37.</b> Porcentagem de adiponectina em TAE.....	67
<b>Figura 38.</b> Foto de fragmento de TAE de paciente tratado com Sinvastatina após IMH. Note-se o foco de linfócitos T marcados em contraste com os arredores.....	68
<b>Figura 39.</b> Foto de fragmento de TAE de paciente do grupo não tratado após IMH. Note-se a área de fibrose e a irregularidade nas dimensões e na morfologia dos adipócitos.....	69
<b>Figura 40.</b> Correlação positiva entre a concentração de adiponectina plasmática e a porcentagem de macrófagos em TAE após tratamento com Sinvastatina, Pioglitazona e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona.....	70
<b>Figura 41.</b> Correlação positiva entre a concentração de IL-6 plasmática e a porcentagem de IL-6 em TAE após tratamento com Sinvastatina, Pioglitazona e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona.....	70
<b>Figura 42.</b> Correlação positiva entre a concentração de resistina plasmática e a porcentagem de resistina em TAE após tratamento com Sinvastatina, Pioglitazona e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona.....	71
<b>Figura 43.</b> Correlação positiva entre PCRus plasmático e porcentagem de macrófagos em TAE mediante tratamento com Sinvastatina, Pioglitazona e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona.....	71
<b>Figura 44.</b> Correlação positiva entre a concentração de TNF- $\alpha$ plasmática e a porcentagem de TNF- $\alpha$ em TAE após tratamento com Pioglitazona e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona. Correlação negativa após tratamento com Sinvastatina.....	72



<b>Figura 45.</b> Correlação positiva entre a concentração de leptina plasmática e a porcentagem de leptina em TAE após tratamento com Sinvastatina e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona. Correlação negativa após tratamento com Pioglitazona.....	72
<b>Figura 46.</b> Presença de macrófagos, linfócitos B e T nas amostras de TAE submetidas a IMH de pacientes DAC/SMet após diferentes tratamentos comparadas ao grupo não tratado.....	74
<b>Figura 47.</b> Presença de citocinas em amostras de TAE submetidas a IMH de pacientes DAC/SMet após diferentes tratamentos comparadas ao grupo não tratado.....	75

---

# **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos grupos de estudo segundo características clínicas e medicação .....	24
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros antropométricos de pacientes com DAC/SMet.....	49
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros lipídicos e glicêmicos plasmáticos ao final do tratamento de pacientes com DAC/SMet. ....	50
<b>Tabela 4.</b> Biomarcadores inflamatórios plasmáticos ao final do tratamento de pacientes com DAC/SMet.....	53
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros lipídicos e glicêmicos plasmáticos de pacientes com DAC/SMet antes e após tratamento com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina.....	58
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros lipídicos e glicêmicos plasmáticos de pacientes com DAC/SMet antes e após tratamento com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina.....	61
<b>Tabela 7.</b> Células inflamatórias em TAE de valvopatas e portadores de DAC/SMet.....	62
<b>Tabela 8.</b> Biomarcadores inflamatórios em TAE de valvopatas e portadores de DAC/SMet.....	65

---

# Resumo

Grosso, AF. *Ações anti-inflamatórias de pioglitazona e sinvastatina: comparação entre plasma e tecido adiposo epicárdico em pacientes com doença arterial coronariana e síndrome metabólica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Na Síndrome Metabólica, ações lipotóxicas e glicotóxicas contribuem para a aceleração do processo aterogênico cuja base é a inflamação. O tecido adiposo epicárdico vem sendo reconhecido como metabolicamente ativo e foi relacionado à elevação da produção de citocinas e adipocinas inflamatórias e aumento de DAC. Pioglitazona e Sinvastatina comprovadamente atuam como drogas pleiotrópicas na redução do processo inflamatório sistêmico. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar possíveis correlações entre a presença de citocinas inflamatórias plasmáticas versus teciduais e a resposta de ambas à terapia medicamentosa. Para tanto, foram utilizadas monoterapia com Sinvastatina ou Pioglitazona e terapia combinada Pioglitazona+Sinvastatina e acompanhadas as variáveis lipídicas, glicêmicas e inflamatórias sistêmicas, células e citocinas inflamatórias em TAE, um tipo de tecido adiposo branco visceral instalado nas adjacências de focos ateroscleróticos em artérias coronárias de pacientes portadores de DAC e SMet. O estudo envolveu 73 pacientes com DAC multiarterial, avaliada pela cinecoronariografia e SMet que foram submetidos a revascularização e 20 pacientes submetidos à cirurgia valvar para substituição de valva mitral. Os pacientes com DAC eram incluídos de forma não aleatória a um dos 4 subgrupos: controle (n = 17), Simvastatina (20 mg / dia, n = 20), Pioglitazona (15 mg ou 30 mg / dia, n = 18) e Simvastatina + Pioglitazona (20 mg / dia + 15 mg ou 30 mg / dia, respectivamente, n = 18). Amostras de tecido adiposo epicárdico foram obtidas durante a cirurgia. Infiltração de macrófagos, linfócitos e secreção adipocitocinas foram investigados por coloração imuno-histoquímica e comparados aos biomarcadores inflamatórios plasmáticos. Os resultados mostraram que a infiltração de macrófagos e a presença de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina and resistina foram reduzidas em TAE de pacientes DAC/SMet após monoterapia com Pioglitazona. Os pacientes tratados apenas com Sinvastatina apresentaram os menores valores plasmáticos de leptina, resistina and MCP-1. Pioglitazona+Sinvastatina foram associadas aos menores valores plasmáticos de IL-6, TNF- $\alpha$ , resistina, ADMA, MMP-9 em comparação ao grupo de pacientes não tratados. Além disso, a terapia combinada revelou a mais alta concentração de adiponectina plasmática concomitante ao menor valor de PCRus. Esses achados refletiram não só a condição plasmática como se correlacionaram positivamente à condição tecidual mostrada pela porcentagem média de área ocupada por macrófagos no TAE e a quantidade de PCRus presente no plasma após os tratamentos.

Houve correlação positiva também entre citocinas sistêmicas e teciduais após os tratamentos, exceto para o TNF- $\alpha$  após o tratamento com sinvastatina (  $r = -0,025$ ,  $p = 0,33$ ) e leptina após o tratamento com pioglitazona ( $r = -0,877$ ,  $p < 0,0001$ ). Nos pacientes tratados com Sinvastatina, os fragmentos de TAE apresentaram agregados de linfócitos T, B e macrófagos concentrados na borda e ao redor de vasos sanguíneos.

***Descritores: Tecido Adiposo Epicárdico, Inflamação, Doença das Coronárias, Síndrome X Metabólica, Pioglitazona, Sinvastatina***

---

# Summary

Grosso, AF. *Anti-inflammatory actions of pioglitazone and simvastatin: comparison between plasma and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease and metabolic syndrome* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

In the Metabolic Syndrome, the concentration of free fatty acids and the elevation of glycemia result in lipotoxic and glycotoxic actions, respectively, which contribute to accelerate the atherogenic process. (MS). Inappropriate secretion of adipocytokines plays a critical role in chronic inflammatory states associated with obesity-linked diseases, such as type 2 diabetes and atherosclerosis. The pleiotropic anti-inflammatory action of Simvastatin and/or Pioglitazone may counteract such systemic effects but its influence upon human epicardial adipose tissue is unknown. To assess the anti-inflammatory action of Simvastatin, Pioglitazone or both in epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease (CAD) and metabolic syndrome. The study comprised 73 patients with multivessel CAD, evaluated by cinecoronariography, and MS who underwent bypass grafting and 20 valvar patients who underwent surgery for mitral valve replacement. The 73 who underwent elective bypass grafting were non-randomly allocated to one of 4 subgroups: control (n=17), Simvastatin alone (20 mg/day, n=20), Pioglitazone alone (15 mg or 30 mg/day, n=18), or Simvastatin+Pioglitazone (20 mg/day + 15 mg or 30 mg/day, respectively, n=18). Epicardial adipose tissue sample was obtained during surgery. Infiltration of macrophages, lymphocytes and adipocytokines secretion were investigated by immunohistochemical staining and compared to plasma inflammatory biomarkers. Among CAD/MS patients, treatment with Simvastatin alone, Pioglitazone alone and Simvastatin+Pioglitazone significantly reduced plasma CRP and cytokines compared with control group. Monotherapy with Simvastatin significantly reduced plasma IL-6, leptin, resistin, MCP-1 ( $p < 0.001$  for all), whereas monotherapy with Pioglitazone reduced IL-6, TNF- $\alpha$ , resistin and MMP-9 ( $p < 0.001$  for all) compared with control group. Simvastatin+Pioglitazone treatment reduced more plasmatic variables (IL-6, TNF- $\alpha$ , resistin, ADMA and MMP-9 vs. control group ( $p < 0.001$ )). All treatments increased adiponectin plasma levels ( $p < 0.001$ ). In the combined treatment group, higher concentration in plasma adiponectin and lower hsCRP, were found simultaneously. There was positive correlation between mean percentage macrophages area in EAT and plasma hsCRP; also between systemic and local cytokines after the treatments, except for TNF- $\alpha$  after treatment with simvastatin ( $r = -0.025$ ,  $p = 0.33$ ) and leptin after treatment with pioglitazone ( $r = -0.877$ ,  $p < 0.0001$ ). In fat fragments of patients treated with Simvastatin, T- and B-lymphocytes, and macrophages clusters concentrated near the edge or around blood vessels were observed by first time. In patients with CAD and MS treatment with Pioglitazone, Simvastatin or combination can substantially reduce both epicardial tissue and plasma inflammatory markers. Such tissue effects may contribute to the control of coronary atherosclerosis progression.

**Descriptors:** *Epicardial Adipose tissue, inflammation, Coronary Disease, Metabolic Syndrome X, Pioglitazone, Simvastatin*



---

# Introdução

## TECIDO ADIPOSEO

Durante muito tempo, a ideia predominante sobre o tecido adiposo era a de que representava uma estrutura ligada à capacidade de armazenar grandes quantidades de gordura na forma de triacilgliceróis. Além disso, atribuíam-se ao tecido adiposo apenas duas atividades básicas: a lipogênese e a lipólise, que possibilitavam o acúmulo de reservas energéticas e o consequente suprimento de energia nos momentos de maior demanda ou carência nutricional<sup>1</sup>. Na década de 1950, não se conhecia outro aspecto funcional do tecido adiposo, até que Kennedy<sup>2</sup> propôs uma teoria metabólica para explicar o controle do comportamento alimentar, denominada teoria lipostática, segundo a qual o tecido adiposo participava do controle do peso corpóreo e influenciava o consumo alimentar.

Nos anos 1990, com a identificação da leptina<sup>3</sup>, houve uma releitura da teoria lipostática, e o tecido adiposo começou a ser visto como um órgão endócrino secretor de inúmeras citocinas e hormônios fundamentais nas sinalizações do tecido adiposo com outros órgãos e com o próprio tecido adiposo, e necessário à manutenção da homeostase metabólica<sup>4</sup>.

Estuda-se atualmente a função expansora e invasiva do tecido adiposo em territórios como o interior ou as proximidades de vísceras e músculos. Em parte, essa infiltração adiposa é possível porque o tecido

acompanha o trajeto perivascular. Tal constatação conduz à ideia de que o tecido adiposo não somente envia suas secreções a células distantes do local de produção, mas também, ao se infiltrar em outros territórios, desencadeia múltiplas interações parácrinas<sup>1,5</sup>.

Com base na morfologia, na expressão de genes específicos e no tipo predominante de adipócito, o tecido adiposo é classificado em duas formas principais: tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB). O TAM é multilocular, repleto de mitocôndrias e altamente vascularizado; está presente na região interescapular de recém-nascidos e em posição cervicossupraclavicular nos adultos, e tem como função promover a termogênese. O TAB possui coloração branco-amarelada, contém adipócitos uniloculares e representa até 25% do peso corporal dos adultos humanos. Quanto à localização, o TAB pode ser classificado em subcutâneo – superficial ou profundo – e interno – visceral ou não-visceral. O TAB visceral pode ainda ser subdividido em gordura intratorácica (depósitos intra e extrapericárdicos) e gordura abdominal-pélvica (depósitos intra, extra e retroperitoniais)<sup>6,7</sup>.

No que se refere à inervação, o TAB depende do controle direto do sistema nervoso autônomo por meio de seus componentes simpático e parassimpático. Por um lado, a inervação simpática relaciona-se principalmente com as ações catabólicas, como a lipólise mediada pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos e dependente da atividade da enzima lípase hormoniossensível (LHS). Por outro lado, o sistema nervoso parassimpático

está envolvido na execução de efeitos anabólicos sobre os depósitos adiposos, como a captação de glicose e de ácidos graxos estimulada pela insulina<sup>8</sup>.

A porção de gordura visceral tem correlação mais forte com alterações metabólicas e pressóricas do que a gordura retroperitoneal, predispondo o indivíduo a complicações metabólicas e cardiovasculares<sup>9</sup>. Em ambos os sexos, o tecido adiposo visceral aumenta com a idade e o ganho de peso, possuindo, contudo, adipócitos metabolicamente mais ativos e sensíveis à lipólise e levando a maior redução dos estoques de gordura com a perda de peso.

Por sua maior abrangência corporal, o TAB tem grande influência no organismo como tecido participante da homeostase energética por meio dos processos de lipólise e lipogênese.

Dado que os adipócitos são um componente crítico do controle metabólico sistêmico, por secretarem uma variedade de citocinas, o tecido adiposo influencia inúmeros processos patofisiológicos. Na interface entre o metabolismo energético e a inflamação, o tecido adiposo participa ativamente do desenvolvimento da Síndrome Metabólica<sup>10,11</sup>.

## **TECIDO ADIPOSEO, ADIPOCINAS, CITOCINAS E QUIMOCINAS**

Citocina é o termo genérico empregado para designar extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes<sup>7</sup>. Citocinas podem ser produzidas por células da linhagem hematopoiética, incluindo macrófagos, linfócitos T e B e monócitos, mas igualmente por células não-hematopoiéticas, tais como hepatócitos, células epiteliais e fibroblastos. As quimocinas fazem parte de uma família especializada de citocinas que funcionam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação, pela habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de leucócitos (função quimiotática). Constituem uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, que, além de estimularem a produção de novas citocinas, auxiliam em diferenciações celulares.

As quimocinas envolvidas em reações inflamatórias são produzidas por leucócitos ou células residentes no local da inflamação em resposta a estímulos externos; já as quimocinas que regulam o tráfego celular através dos tecidos são produzidas por diferentes células nesses tecidos. Adipocinas (ou adipocitocinas) são os mediadores bioativos sintetizados no tecido adiposo<sup>12,13</sup>. Apesar de os adipócitos produzirem a maioria das adipocinas conhecidas, pré-adipócitos, macrófagos e células endoteliais associadas ao tecido adiposo também contribuem para a síntese. Existem, atualmente, mais de 50 diferentes adipocinas que agem segundo efeitos parácrinos, autócrinos e endócrinos e que influenciam o metabolismo

lipídico e a homeostase glicêmica em fatores de risco cardiovasculares, como hipertensão, bem como em alguns processos trombóticos, inflamatórios e ateroscleróticos<sup>7,14</sup>.

As adipocinas incluem o fator de necrose tumoral alfa, interleucinas, inibidor do ativador de plasminogênio, leptina, resistina, adiponectina, dentre outras<sup>15</sup>.

O *fator de necrose tumoral- $\alpha$*  (*TNF- $\alpha$* ) é uma citocina imunomodulatória que age diretamente no adipócito regulando a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios<sup>8</sup>. Seu efeito mais intenso é a inibição da lipogênese, via inibição da expressão da lipase lipoproteica (LLP), receptor de glicose (GLUT-4) e da acetil-CoA-sintetase, e aumento da lipólise. A expressão e a secreção de *TNF- $\alpha$*  aparecem aumentadas em animais e seres humanos obesos, correlacionando-se positivamente com aumento do volume dos adipócitos. Em indivíduos obesos existe uma forte correlação inversa entre *TNF- $\alpha$*  e metabolismo de glicose, devido à supressão da sinalização da insulina pelo *TNF- $\alpha$* , que reduz a fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) e da atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3k), com redução da síntese e da translocação do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana e consequente diminuição na captação de glicose mediada pela insulina<sup>16</sup>. Essa citocina também está envolvida no processo inflamatório indutor de aterogênese, participando da migração de monócitos e sua conversão em macrófagos na

parede arterial por meio da transcrição do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que modula uma série de mudanças inflamatórias na parede vascular<sup>9,16</sup>.

A *resistina* é uma proteína secretada por monócitos e adipócitos. Apesar de expressa e secretada em indivíduos magros, seus níveis são comumente mais elevados na obesidade. Efeitos da administração e neutralização da *resistina* na tolerância à glicose nos tecidos muscular, esquelético e adiposo indicam que a sua ação se dá por meio da modulação negativa de uma ou mais etapas da sinalização insulínica voltadas para o aumento na captação de glicose<sup>17</sup>. Além disso, ela promove resistência à insulina (RI) por meio de aumento da gliconeogênese hepática<sup>18-20</sup>, e está relacionada ao aumento de *TNF- $\alpha$* , *IL-6* e supressores de sinalização de citocinas (SOCS), sugerindo um elo entre RI e inflamação<sup>15</sup>.

As *interleucinas (IL)* agem no metabolismo de carboidratos e lipídios, tanto no tecido adiposo como no músculo. A *IL-6* é uma citocina multifuncional: diminui a secreção de adipocinas, a produção da lipoproteína lipase e a lipogênese; e ainda regula a produção de triglicérides e de proteína C reativa (PCR) pelo fígado e do inibidor do ativador do plasminogênio (*PAI-1*) no tecido adiposo<sup>21</sup>.

A *leptina* é um hormônio de efeito central e periférico que regula o balanço energético e, em virtude do estresse oxidativo, vem sendo relacionada à inflamação e calcificação vascular e à proliferação celular<sup>21</sup>. Os efeitos da *leptina* estendem-se ao metabolismo lipídico com aumento da oxidação lipídica no músculo esquelético, e com redução da síntese de

triglicerídeos no fígado a partir de ácidos graxos monoinsaturados. Além de importante lipostato<sup>8</sup>, parece ser capaz de aumentar a produção de citocinas em macrófagos e de aumentar a adesão e mediar o processo de fagocitose a partir de uma suprarregulação dos receptores de macrófagos ou do aumento da atividade fagocitária<sup>22</sup>. *Leptina* é um hormônio sensibilizador da insulina e sua deficiência favorece o diabetes. Elevações plasmáticas de glicose e insulina estimulam a secreção de *leptina* pelo adipócito. A *leptina* ainda limita a deposição ectópica de gordura em tecidos hepático e muscular, reduzindo a lipotoxicidade e melhorando a RI<sup>23</sup>.

A *adiponectina* modula as ações de *TNF- $\alpha$* , bloqueando a ativação do NF- $\kappa$ B. A ação da *adiponectina* reduz os ácidos graxos livres (AGL) e a glicemia. A elevação das concentrações plasmáticas de *TNF- $\alpha$* , de *resistina* e de *IL* e a redução do nível de *adiponectina* ocorrem na obesidade e se correlacionam com a resistência à insulina. Assim, essa proteína age como um dos fatores protetores para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade insulínica. É expressa exclusivamente em adipócitos diferenciados. Seus efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos são promovidos pela diminuição da expressão de moléculas de adesão (a partir da redução da expressão de *TNF- $\alpha$*  e da atividade da *resistina*) e pela diminuição da quimiotaxia aos macrófagos, com redução da formação de células espumosas e inibição da sinalização inflamatória no endotélio<sup>24</sup>. A correlação negativa entre o grau de obesidade e níveis circulantes de *adiponectina* já foi demonstrada, bem como o aumento em sua concentração, com a redução de peso, e a associação entre baixos níveis



dessa proteína, a resistência à insulina e a hiperinsulinemia. O aumento na sensibilidade à insulina se dá por meio da elevação da oxidação de ácidos graxos, da captação e utilização da glicose no tecido adiposo e no músculo esquelético e da redução da produção hepática de glicose, o que leva a um melhor controle dos níveis séricos de glicose, ácidos graxos livres e de triglicerídeos<sup>25</sup>.

A *MCP-1* é uma quimocina com capacidade de atrair monócitos da circulação<sup>7</sup> para a parede arterial, de modo a se transformarem em macrófagos, que são fontes de citocinas com atividade imunoinflamatórias. Pré-adipócitos e adipócitos produzem *MCP-1* em resposta a estímulos como óxido nítrico, *TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *IL-4* e interferon-gama.

## **TECIDO ADIPOSEO, INFLAMAÇÃO E RISCO CARDIOMETABÓLICO**

A inflamação crônica é uma característica da aterosclerose<sup>26-30</sup>. Estudos demonstraram que pacientes diabéticos apresentaram maior infiltração de macrófagos em placas de ateroma, em tecido coronariano, e subsequente trombose, quando comparados a pacientes não-diabéticos<sup>31</sup>. Valores de PCR e citocinas como a *IL-6* e o *PAI-1* aparecem aumentados no plasma de pacientes portadores de diabetes mellitus do tipo 2 (DM2)<sup>32-36</sup>.

Yudkin *et al.*<sup>34</sup>, trabalhando com uma população de indivíduos saudáveis, encontraram correlação positiva entre as variáveis que compõem

a SMet, incluindo RI, disfunção endotelial e inflamação sistêmica. Há um elo importante entre obesidade, SMet, DM2 e doença cardiovascular (DCV) cuja base é o processo inflamatório<sup>30</sup>. Estudos prévios destacam a importante influência do tecido adiposo na patogênese das DCV ao descreverem a expressão e a secreção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias e protetoras<sup>37</sup>. Nos estados dismetabólicos, o tecido adiposo apresenta aumento no recrutamento de macrófagos, que passam a secretar adipocinas patogênicas, elevando o risco cardiometabólico. A distribuição do tecido adiposo corporal tem impacto significativo sobre o risco da doença – risco que é atribuído às diferenças na expressão das adipocinas<sup>38,39</sup>. Até o momento, poucos estudos investigaram o perfil das adipocinas secretadas pelo tecido adiposo epicárdico.

## **TECIDO ADIPOSEO EPICÁRDICO**

Os acúmulos lipídicos associados ao coração residem em três distintos depósitos: o epicárdico, o pericárdico e o intracelular. Do ponto de vista anatômico, o tecido adiposo epicárdico (TAE) é uma das reservas de TAB de localização visceral intratorácica. A camada visceral ou epicárdica do pericárdio tem origem no mesoderma esplâncnico e evolui como TAM durante a embriogênese. No coração adulto, o TAE torna-se TAB totalmente diferenciado, concentrando-se nos sulcos atrioventriculares e intraventriculares e acompanhando os maiores ramos arteriais coronarianos.

Em menor proporção, o TAE pode ser encontrado ao redor dos átrios, acima da parede livre do ventrículo direito e sobre o ápice do ventrículo esquerdo. O que distingue o TAE do depósito pericárdico é que este último inclui, além dos locais descritos para o TAE, o depósito de gordura mediastinal. A gordura epicárdica é também conhecida como folheto visceral pericárdico ou, ainda, pericárdio seroso<sup>40-42</sup>.

O TAE cobre 80% (56–100%) da área da superfície cardíaca, constitui aproximadamente 15 a 20% do peso de um coração normal e, segundo estudos com autópsias e diferentes métodos radiológicos, a maior quantidade concentra-se na superfície ventricular direita lateral<sup>41</sup>. A gordura epicárdica mantém íntima relação anatômica e funcional com os componentes musculares do coração, pelo fato de ambos compartilharem o mesmo suprimento sanguíneo coronariano e não serem separados por fascia.

Fisiologicamente, várias funções pontuais foram atribuídas ao TAE, embora algumas resultem apenas de dados observacionais e/ou especulações, já que animais experimentais, que poderiam ser utilizados para tais estudos, têm depósitos epicárdicos naturalmente reduzidos<sup>40-42</sup>.

Possíveis funções do TAE<sup>40,42,43</sup> incluem:

- amortecimento das artérias coronárias contra tensões ou torções induzidas pelas ondas de pulso arterial e contrações cardíacas, em razão de as artérias coronárias estarem sempre rodeadas por gordura epicárdica;

- redução da exposição miocárdica aos níveis circulantes excessivamente altos de ácidos graxos (AGL), trazidos pela microcirculação coronária, compartilhada pela gordura epicárdica e o miocárdio. Devido à habilidade de rápida incorporação dos AGL, o TAE evitaria cardiotoxicidade;
- fonte energética local para a musculatura cardíaca, especialmente nas situações de demanda aumentada;
- remodelamento arterial coronariano positivo (alterações estruturais e funcionais para adaptação hemodinâmica, especialmente quando em vigência de aterosclerose e que representa maior instabilidade de uma lesão coronária);
- a gordura epicárdica poderia ser local de concentração de plexos ganglionares e nervos do sistema nervoso cardíaco intrínseco, responsáveis pela transmissão de sinais sensoriais (dor da *angina pectoris* e isquemia miocárdica), originários das áreas atriais e ventriculares, para o sistema nervoso central.
- papel modulador da contratilidade cardíaca proposta para o TAE em corações normais. O excesso de gordura epicárdica poderia resultar em contração miocárdica reduzida, seja pela cardiotoxicidade provocada pelos AGL, seja pela facilidade de se alojar em uma parede miocárdica mais fina.

Mediadores inflamatórios originários de adipócitos em sítios extravasculares promovem lesão coronariana e explicam o aumento de risco cardiovascular em populações de pacientes resistentes à insulina<sup>38,39</sup>,

principalmente em indivíduos obesos<sup>44</sup>. Estudos demonstraram que depósitos de tecido adiposo pericárdico metabolicamente ativos apresentaram maior expressão de mediadores inflamatórios em comparação ao tecido adiposo subcutâneo. Mudanças morfológicas na camada íntima arterial ocorrem induzidas por mediadores inflamatórios originados em adipócitos próximos à artéria coronária<sup>38,39</sup>.

Em vista dessas múltiplas funções, o TAE constitui-se em potencial alvo terapêutico a ser explorado para prevenção de DAC e SMet.

## **GLITAZONAS E RECEPTORES NUCLEARES**

As Tiazolidinedionas (TZDs) ou Glitazonas diminuem a lipotoxicidade e a glicotoxicidade por exercerem ação ativadora seletiva dos receptores PPAR- $\alpha$  e, especialmente, PPAR- $\gamma$ <sup>45</sup>.

Os receptores ativadores do proliferador de peroxissoma (PPARs) pertencem à superfamília de receptores nucleares. São fatores de transcrição ativados por ligantes específicos e formam heterodímeros com outros receptores, além de atuarem como verdadeiros sensores moleculares, promovendo a transativação gênica em resposta aos vários ligantes endógenos. O papel dos PPARs tem sido relacionado à homeostase glicêmica e lipídica, à modulação do tônus vascular<sup>45,46</sup> e à inflamação<sup>47</sup>, por inibir a progressão da aterosclerose.

Meisner *et al.*<sup>48</sup> observaram reduzido grau de inflamação em placas aterogênicas de pacientes tratados com glitazona, em um período de 4 semanas.

A Pioglitazona, um derivado tiazolidinediônico, mostrou potente efeito anti-inflamatório sérico, quando testada em pacientes diabéticos, além de promover aumento do HDL-c e reduzir os níveis de triglicérides<sup>49</sup>. Estudos clínicos sobre seus efeitos antiaterogênicos e anti-inflamatórios, utilizando Rosiglitazona e Pioglitazona, mostraram redução dos níveis de PCR, MMP-9 e MCP-1, e aumento de adiponectina, independentemente do controle glicêmico<sup>50</sup>.

O estudo PROactive<sup>51,52</sup> em diabéticos tratados com Pioglitazona demonstrou, em pacientes com infarto do miocárdio prévio, redução de 28% de novo infarto e de 37% de angina instável em três anos de observação. No estudo PERISCOPE<sup>53</sup>, Pioglitazona e glimepiride foram comparados quanto à habilidade de reduzir a progressão da aterosclerose coronariana em 543 pacientes portadores de DM2 e DAC. O tratamento com pioglitazona resultou em uma taxa significativamente menor da progressão da aterosclerose. No estudo PIOSTAT<sup>54</sup>, os efeitos anti-inflamatórios plasmáticos de Pioglitazona, combinados ou não aos de Sinvastatina, foram demonstrados em pacientes com alto risco de doença cardiovascular e elevados níveis de PCR. Após 12 semanas de tratamento, a monoterapia com Pioglitazona reduziu a PCR, e a terapia combinada mostrou efeitos

aditivos anti-inflamatórios. *PAI-1* e *MMP-9* também foram reduzidos significativamente no grupo tratado com Pioglitazona<sup>55</sup>.

Recentemente, Sacks *et al.*<sup>56</sup> investigaram possíveis mudanças na expressão gênica no TAE associadas com DAC e a influência da terapia com pioglitazona sobre essas mudanças. Em pacientes diabéticos, portadores de SMet e DAC, genes de marcadores pró e anti-inflamatórios foram diferencialmente aumentados em TAE e seletivamente reduzidos com a introdução de pioglitazona no tratamento.

## **ESTATINAS E EFEITOS PLEIOTRÓPICOS**

As estatinas ou inibidores da HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril coenzima-A redutase) são potentes fármacos redutores de colesterol: ao provocarem a redução dos níveis de LDL-c do hepatócito, estimulam a expressão de receptores para esse composto e favorecem a remoção das moléculas do LDL-c da circulação sistêmica<sup>57</sup>.

Além dos efeitos hipolipemiantes propriamente ditos, as estatinas exercem efeitos “pleiotrópicos”. A redução dos níveis de isoprenoides – derivados de compostos intermediários da via de síntese do colesterol, que desempenham papel fundamental nos mecanismos de crescimento e replicação celulares – está associada a efeitos benéficos, tais como: restauração da função endotelial pelo aumento da disponibilidade do

óxido nítrico e inibição da síntese de endotelina; estabilização da placa de ateroma pela modulação da atividade de componentes do sistema imune e pelos efeitos antitrombóticos e antiplaquetários; e supressão da resposta inflamatória sistêmica em diversas doenças<sup>58</sup>. A importância da inflamação no grau de vulnerabilidade da placa é confirmada por diversos estudos que apontam para a relação direta entre os marcadores e mediadores inflamatórios, PCR e citocinas, respectivamente, e a ocorrência de eventos cardiovasculares. As estatinas são potentes agentes na redução de eventos cardiovasculares, tanto na prevenção primária quanto na secundária<sup>58-60</sup>. A terapêutica com estatinas é comprovadamente benéfica no período perioperatório<sup>61</sup>.

O estudo de Rezaie-Majd e colaboradores<sup>62</sup> mostrou que o tratamento com Sinvastatina (20 ou 40mg/d) reduz a expressão de moléculas de adesão em monócitos circulantes em pacientes hipercolesterolêmicos. A inibição da expressão do RNAm de CD54 e CD18/CD11a, moléculas de adesão leucocitária, pela Sinvastatina, contribuiu para um efeito anti-inflamatório. Ao compararem a ação de Pravastatina 40mg, Sinvastatina 20mg e Atorvastatina 10mg, durante 6 semanas, em pacientes hiperlipidêmicos, Jialal e colaboradores<sup>63</sup> observaram efeito redutor semelhante ao das três estatinas nos níveis plasmáticos de PCR.



## **JUSTIFICATIVA DO ESTUDO E ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL**

Dado que alterações simultâneas no metabolismo lipídico e glicêmico são comuns em pacientes com DM2 e SMet, moléculas que regulam a homeostase de lipídeos e da glicose são importantes alvos farmacológicos para o tratamento das doenças metabólicas.

Até o momento, as evidências na literatura têm destacado as ações restauradoras sobre a homeostase lipídica e glicêmica plasmáticas além de efeitos anti-inflamatórios sistêmicos; porém, não se sabe bem se tais efeitos se estendem aos tecidos. Questiona-se, portanto, até que ponto uma alteração plasmática pode refletir mudanças teciduais. Quais influências anti-inflamatórias teciduais poderiam ser verificadas quando da utilização de Sinvastatina ou Pioglitazona, ambas em monoterapia, sobre os tecidos? Qual delas refletiria maior poder anti-inflamatório tecidual? Que influências teria a associação dos medicamentos? Como seria o efeito anti-inflamatório de Pioglitazona e Sinvastatina especificamente sobre o TAE?

Diante dessas questões, o presente estudo tratou de verificar a secreção de adipocinas pelo TAE e analisar possíveis modificações secretórias destas após monoterapia com Sinvastatina e com Pioglitazona comparada ao tratamento combinado.

O TAE foi escolhido como tecido-alvo do estudo por acompanhar os principais ramos arteriais coronarianos e, possivelmente, participar de um intercâmbio inflamatório com a placa aterosclerótica em

crescimento; por representar um órgão endócrino que influencia a DAC e a SMet, cujo elo é o processo inflamatório; e pela facilidade de obter fragmentos de gordura epicárdica durante as cirurgias de revascularização miocárdica realizadas no InCor/HCFMUSP. O paciente portador de DAC/SMet foi o eleito para o estudo pela possibilidade de utilização de ambas as drogas.

Fármacos com ação anti-inflamatória podem trazer benefícios além do controle hipolipemiante e hipoglicemiante. Nas opções para tratamento da DAC, pioglitazona não é ainda sugerida como parte estabelecida do tratamento, mas, uma vez comprovada sua ação pleiotrópica, como ocorreu com Sinvastatina, o presente estudo pode contribuir para o conhecimento das ações anti-inflamatórias sobre o TAE, representando apoio adicional para a recomendação de ambos os fármacos na prevenção da DAC na SMet. Pode contribuir igualmente para a expansão do conhecimento sobre os efeitos biológicos da Pioglitazona e da Sinvastatina o que reforçaria sua indicação na prevenção e na terapêutica da aterosclerose.

---

# Objetivos

## OBJETIVOS

A contribuição do presente estudo diz respeito à relação que hoje se faz entre gordura epicárdica e aumento da produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias e da incidência de aterosclerose coronária. Para comprovar essa relação, estabeleceu-se como meta verificar:

- (1) o perfil inflamatório do TAE em pacientes com DAC/SMet comparados a pacientes valvopatas (sem DAC/sem SMet);
- (2) a expressão inflamatória em TAE de pacientes DAC/SMet correlacionando-a com a inflamação plasmática;
- (3) a ação anti-inflamatória de Pioglitazona e/ou de Sinvastatina sobre o TAE e suas influências local (adipócitos epicárdicos) e sistêmica em pacientes DAC/SMet.

---

# **Casuística e métodos**

## **PACIENTES ESTUDADOS E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE**

Integraram a casuística deste estudo 73 pacientes portadores de doença arterial coronariana (DAC) e síndrome metabólica (SMet), candidatos a cirurgia de revascularização miocárdica (RM) no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor - HCFMUSP). Esses participantes foram comparados a um grupo de 20 pacientes não-portadores de doença arterial coronariana (sem DAC) e sem síndrome metabólica (sem SMet), eleitos para cirurgia valvar (valvopatas). Todos eram atendidos pelo Serviço Único de Saúde (SUS), tendo sido selecionados a partir da fila de espera para cirurgia eletiva.

O diagnóstico de DAC foi confirmado através de cinecoronariografia, indicada pelo médico assistente para fins diagnósticos.

A escolha dos participantes levou em conta a história clínica dos pacientes e o resultado da cinecoronariografia realizada no ano anterior, respeitando os critérios de inclusão e exclusão indicados no estudo. Antes da consulta médica, todos passaram por entrevista e avaliação quanto às medidas antropométricas: peso corporal, pressão sistólica e diastólica, circunferência abdominal. Foram anotados também idade, sexo, procedimentos cirúrgicos prévios, tabagismo, medicações de uso contínuo, aderência ao tratamento e pesquisa por doenças de etiopatogenia inflamatória. Valores recentes de índices plasmáticos (até 6 meses após a

realização do exame) de CT, TG, HDL-c, LDL-c e glicemia de jejum foram obtidos nos prontuários. Havendo valores correspondentes a apoB, PCRus e HbA1c disponíveis, estes foram igualmente anotados ou quantificados na primeira coleta de sangue.

O peso foi obtido em balança digital comercializada por *Welmy* (capacidade máxima de 200kg e precisão de 0,1kg). A coleta dos dados antropométricos foi efetuada com o paciente vestindo roupa leve e sem calçados. A técnica utilizada para aferição da circunferência abdominal (cm) consistiu de detecção do ponto médio entre o último arco costal e a crista ilíaca e posterior aferição, nesse ponto médio, com fita específica de fibra de vidro, flexível, sem elasticidade<sup>64</sup>. Os dados antropométricos foram colhidos sempre pelo mesmo pesquisador.

Os pacientes somente formalizaram sua adesão à pesquisa após a compreensão de seus procedimentos e objetivos e mediante leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética do InCor sob o número SDC 2884/06-129 (Anexo A).

Pacientes de ambos os sexos, na faixa etária entre 40 e 75 anos, compuseram os cinco grupos de estudo. Tratou-se de um estudo aberto, não-randomizado, em que a escolha dos grupos, vinculada ao uso dos medicamentos, foi organizada segundo demonstrado na Tabela 1.

Manteve-se um tratamento à base de AAS (Ácido acetilsalicílico), inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA),

bloqueadores do receptor de angiotensina II (BRA), diuréticos, betabloqueadores e antagonistas dos canais de cálcio.

**Tabela 1** - Distribuição dos grupos de estudo segundo características clínicas e medicação

<i>GRUPOS DE ESTUDO</i>	<i>PACIENTES E CARACTERÍSTICAS</i>
<b>Valvares Sem DAC/sem SMet</b>	20 pacientes sem DAC, não-SMet, portadores de valvopatia
<b>DAC/SMet Não tratado</b>	17 pacientes com DAC e SMet em tratamento convencional, sem estatina ou pioglitazona por, pelo menos, 90 dias antes da cirurgia
<b>DAC/SMet Pioglitazona</b>	18 pacientes com DAC e SMet portadores de DM2; uso de Pioglitazona (ACTOS®) 15 ou 30mg/d por, pelo menos, 90 dias antes da cirurgia
<b>DAC/SMet Sinvastatina</b>	20 pacientes com DAC e SMet; uso de Sinvastatina 20 ou 40mg/d por, pelo menos, 90 dias antes da cirurgia
<b>DAC/SMet Sinvastatina+Pioglitazona</b>	18 pacientes com DAC e SMet portadores de DM2; uso de Sinvastatina 20 ou 40mg/d mais pioglitazona 15 ou 30mg/d por, pelo menos, 90 dias antes da cirurgia



## CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios para diagnóstico de SMet estipulados pelo NCEP-ATP-III, descritos em Grundy *et al.*<sup>65</sup> e modificados em Hanley *et al.*<sup>66</sup>, foram utilizados considerando-se a presença de três ou mais dos seguintes fatores de risco:

- Pressão arterial:  $\geq 130/\geq 85$  mmHg.
- Obesidade abdominal: circunferência da cintura  $> 102$  cm nos homens e  $> 88$  cm nas mulheres.
- Concentração plasmática de triglicerídeos:  $\geq 150$  mg/dL.
- Concentração de glicose sanguínea em jejum  $\geq 110$  mg/dL.
- Concentração plasmática de HDL-c:  $< 40$ mg/dL nos homens e  $< 50$ mg/dL nas mulheres.

Os níveis de colesterol plasmáticos (LDL-c) aceitos para prevenção secundária foram 70 mg/dL para pacientes portadores de doença aterosclerótica<sup>67</sup>, embora tal valor não fosse a meta a ser alcançada neste estudo.

## CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os pacientes que apresentavam ao menos um dos seguintes itens:

- insuficiência renal crônica (dosagem sérica de creatinina superior a 2 mg/dl);

- insuficiência cardíaca (classe funcional III e IV ou fração de ejeção menor ou igual a 40%);
- angina instável;
- insuficiência hepática (Child Pugh score > 7; sorologia positiva para hepatites B e C);
- anemia (hemoglobina em 11mg/dL e hematócrito aproximadamente em 30%);
- doenças crônicas do tecido conectivo;
- doenças metabólicas não incluídas na SMet;
- positividade para neoplasia;
- HIV;
- confirmação de tabagismo nos últimos 12 meses;
- qualquer intercorrência intraoperatória que inviabilizasse a coleta das amostras automaticamente excluía o paciente do projeto.

## **DESENHO DO ESTUDO**

Este foi um estudo clínico prospectivo, controlado, não-randomizado em que os pacientes foram selecionados de forma sequencial segundo os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos. As decisões médicas foram dadas pelos médicos assistentes da Unidade Clínica de Aterosclerose do InCor/HCFMUSP. Os cirurgiões que retiraram a biópsia de gordura epicárdica durante o procedimento cirúrgico faziam parte das

equipes das Unidades Clínicas de Aterosclerose e de Coronariopatia Crônica do InCor.

Aproximadamente 118 mil prontuários médicos foram analisados em um período de 36 meses e, após retirada dos inelegíveis e/ou desistentes, 93 pacientes efetivamente participaram da pesquisa.

Os itens a seguir descrevem a forma como os grupos foram organizados:

- No grupo de pacientes valvares não foram incluídos aqueles com estenose valvar aórtica, por estarem envolvidos mecanismos inflamatórios influenciados por fatores de risco cardiovasculares semelhantes aos observados no desenvolvimento da aterosclerose.
- Os pacientes do grupo com DAC/SMet não tratados foram selecionados a partir da primeira consulta, tinham sido submetidos recentemente a cinecoronariografia ou foram encaminhados via pronto socorro; além disso, não utilizavam drogas hipolipemiantes e tinham indicação cirúrgica. A realização da cirurgia tinha prioridade, e a estatina foi introduzida no período pós-operatório imediato.
- Os pacientes do grupo com DAC/SMet Pioglitazona foram selecionados a partir da fila cirúrgica e, uma vez participantes da pesquisa, realizou-se uma coleta de sangue em jejum previamente ao tratamento com Pioglitazona e outra logo antes de iniciado o procedimento cirúrgico. Pacientes em uso de estatina tiveram a prescrição suspensa até a cirurgia e reintroduzida no período pós-cirúrgico imediato.

- Os pacientes do grupo com DAC/SMet Sinvastatina utilizavam inicialmente Sinvastatina ou Atorvastatina. Para os que utilizaram Sinvastatina 20 ou 40 mg/dia, realizou-se uma única coleta de sangue, momentos antes de iniciada a cirurgia; para os que utilizaram Atorvastatina, houve suspensão da medicação por 30 dias, seguida da introdução de Sinvastatina, com utilização por três meses, e coleta de amostras sanguíneas ao final.
- Os pacientes selecionados para o grupo com DAC/SMet Pioglitazona+Sinvastatina iniciaram o tratamento conforme a seguinte indicação: os que já utilizavam Sinvastatina tiveram a Pioglitazona introduzida, enquanto os que haviam utilizado Atorvastatina aguardaram 30 dias sem a medicação para, só então, introduzir-se Sinvastatina+Pioglitazona. Para este grupo foram realizadas coletas de sangue antes e após o tratamento.

Dentre os pacientes com DAC/SMet não tratados, parte deles nunca tinha utilizado drogas hipolipemiantes, enquanto outros já tinham utilizado algum tipo de estatina e, por razões diversas, descontinuaram a medicação.

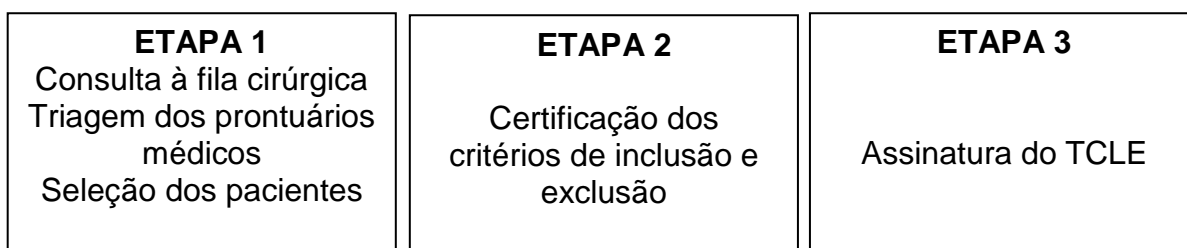
A composição dos demais grupos DAC/SMet exigiu a suspensão da estatina em uso por, pelo menos, 30 dias. Ressalve-se que a interrupção da terapia com estatina por um período curto não leva ao aumento de riscos clinicamente importantes em Síndromes Coronarianas Agudas em pacientes estáveis<sup>67,68</sup>. Os efeitos hipolipemiantes da Sinvastatina podiam ser confirmados nos primeiros 30 dias de uso regular da medicação<sup>69,70</sup>.

Nos pacientes em tratamento com Pioglitazona ou com Pioglitazona+Sinvastatina, colheu-se sangue em jejum a cada 30 dias, para acompanhamento dos índices glicêmicos e lipídicos e realização de ajustes necessários nas doses das medicações.

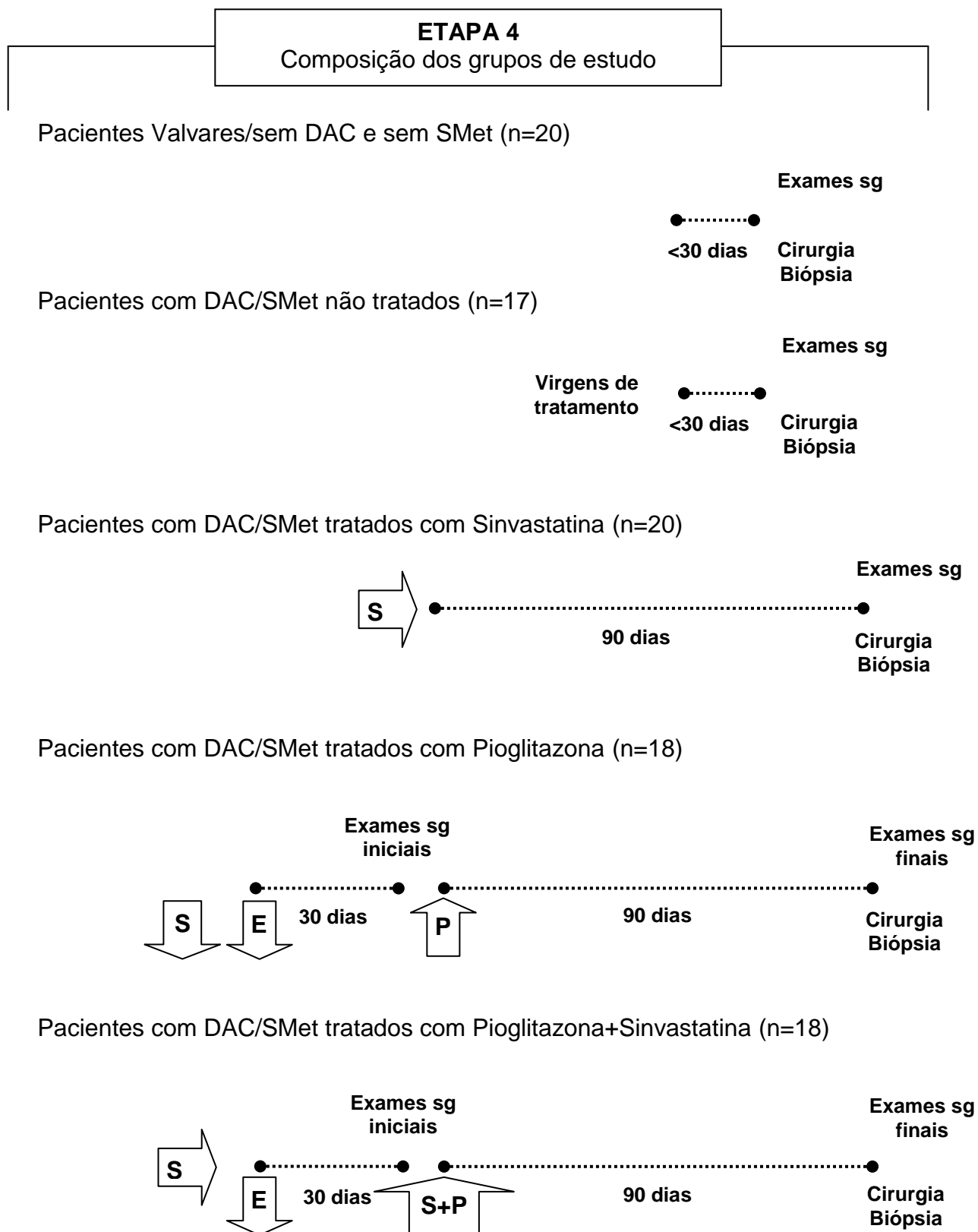
Todos os voluntários que utilizaram Pioglitazona eram diabéticos e alguns deles acabaram utilizando outros hipoglicemiantes (metformina e/ou insulina) por necessidade de melhor controle glicêmico.

O valor de fração de ejeção ventricular esquerda confirmada através de angiografia foi acima de 45% em todos os pacientes com DAC/SMet.

A seguir é apresentado o desenho experimental do protocolo.



**Figura 1.** Diagrama experimental do estudo: A. Recrutamento dos pacientes. Continua...



**Figura 1.** Diagrama experimental do estudo: B. Composição dos grupos de estudo. Símbolos: S:Sinvastatina; E:Outras Estatinas; P:Pioglitazona.

⏏ Suspendir

⏏ Introduzir

⏏ Uso ininterrupto

## **COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE, COLETA DE FRAGMENTOS DO TECIDO ADIPOSEO EPICÁRDICO E ANÁLISES LABORATORIAIS**

### **COLETA E ANÁLISE DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS**

Antes de iniciada a cirurgia (período pré-operatório imediato), amostras de sangue periférico de portadores de DAC e não-DAC foram coletadas por punção venosa em tubos comuns (sem anticoagulante) ou em tubos com heparina ou EDTA, e o soro foi separado das células e processado nos laboratórios de Análises Clínicas e Biologia Vascular, ambos do InCor HCFMUSP.

De uma amostra de plasma sanguíneo de cada paciente, várias alíquotas foram separadas e congeladas para análise posterior.

Avaliaram-se citocinas e outras proteínas séricas: adiponectina, IL-6, TNF- $\alpha$ , insulina e PCR-us, além de glicose, HbA1c, MCP-1, metaloproteinase-9 (MMP-9), dimetilarginina assimétrica (ADMA) e concentração de lipídios plasmáticos, como descrito a seguir. Utilizou-se Kit ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) para quantificar as citocinas adiponectina, leptina e resistina, bem como MCP-1, MMP-9 e ADMA do soro humano, conforme protocolos específicos sugeridos pelo fabricante (R&D Systems). Foram quantificadas, ainda, as citocinas IL-6 e TNF-alfa e a concentração de insulina em soro humano, utilizando ensaio tipo enzimaimunométrico quimioluminescente Immulite 2000. A quantificação

sérica de HbA1c foi realizada por meio do uso de ensaio Tinaquant Hemoglobin A1c II Roche/Hitachi system.

Avaliou-se a concentração de glicose por meio de técnicas espectrofotométricas (Glucose Flex Reagent Cartridge, Dade Behring), com o paciente em jejum por 12 horas.

Avaliaram-se os níveis lipídicos pelos respectivos métodos: (1) colesterol total, pelo método enzimático colorimétrico (CHOD/PAP)<sup>71</sup>; (2) fração HDL colesterol, pela separação da fração HDL colesterol com CIMg e ácido fosfotengstênio e determinação colorimétrica enzimática<sup>72</sup>; (3) fração triglicérides, pelo método colorimétrico enzimático (GPO/PAP) com fosfato de glicerol oxidado e 4-aminoantipirina<sup>73</sup>; (4) fração lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), calculada pela fórmula de Friedwald: LDL colesterol = (colesterol total - HDL colesterol) menos o valor de triglicérides divididos por 5, somente aplicável para valores de triglicérides até 400 mg/dL<sup>74</sup>; (6) apolipoproteínas B (Apo B), pelo método imunoturbidimétrico<sup>75</sup>.

Foi realizada dosagem de peptídeo natriurético tipo B (BNP) no plasma dos pacientes valvopatas a fim de averiguar as condições morfofuncionais miocárdicas e afastar possível presença de insuficiência cardíaca. Os resultados foram obtidos utilizando-se imunoensaio por quimioluminescência.



## COLETA E ANÁLISE DAS BIÓPSIAS DE TAE

### IMUNO-HISTOQUÍMICA (IMH)

Obteve-se, durante a cirurgia, uma biópsia de tecido adiposo epicárdico de aproximadamente 0,5 a 1,0 grama cada, proveniente da proximidade da artéria coronária direita (figura 2).

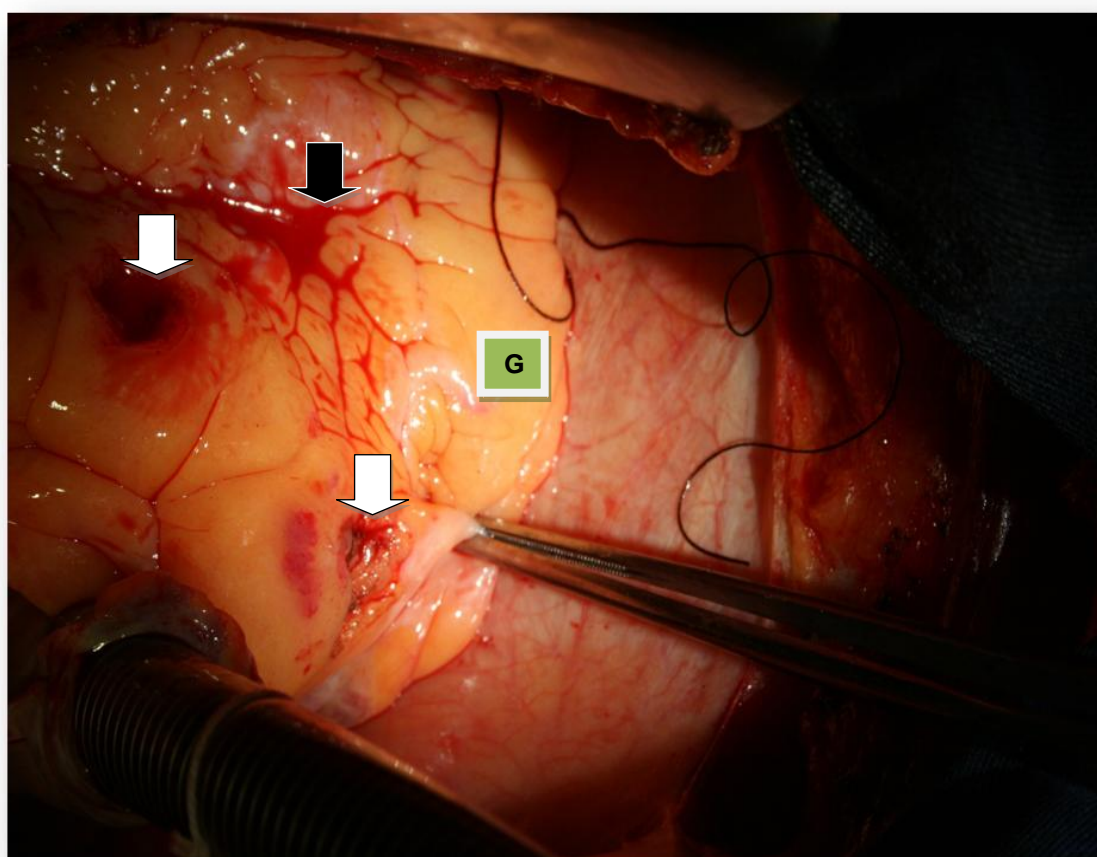


Figura 2. Posição da retirada dos fragmentos de TAE (setas claras) na proximidade da artéria coronária direita (seta escura). G: Gordura pericárdica.

A amostra do tecido foi retirada antes da heparinização e da circulação extracorpórea, e imediatamente fixada em formol a 10% e

submetida a processamento para emblocamento em parafina e análise histológica. Cortes de 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e analisados em microscopia óptica. Cortes histológicos subsequentes foram submetidos à reação de imunoperoxidase, a fim de detectar a positividade para os antígenos humanos relacionados com linfócito B, linfócito T, macrófago, TNF-alfa, IL-6, adiponectina, leptina e resistina.

O processo iniciou-se com a desparafinização à temperatura ambiente, com 3 banhos de xilol (10 min. cada), seguida de hidratação com passagem em alcoóis em concentrações decrescentes (álcool 100°, 95°, 70°, até a lavagem em água). Dependendo do anticorpo, foi realizada a recuperação antigênica, utilizando-se a panela de pressão Pascal (DAKO) em tampão citrato pH 6,0 ou TRIS/EDTA, pH 9,0, por 2 min. sob pressão. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com quatro incubações de 5 minutos cada, à temperatura ambiente, com peróxido de hidrogênio a 3% em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e banhadas em tampão PBS com Tween 20.

As lâminas foram incubadas à 37°C, por 1 hora, com Protein Block, para bloqueio de proteínas inespecíficas; e depois a 4°C, por 18 horas, com 200 $\mu\text{l}$  dos respectivos anticorpos primários nas diluições correspondentes, padronizadas de acordo com as orientações de cada fabricante:

Linfócito B (CD 20 - Clone L26/Dako – diluição 1:1000) Tris

Linfócito T (CD45 RO - Clone UCHL/Dako – diluição 1:50) Tris

Macrófago (CD68 - Clone KP1/Dako – diluição 1:3200) Tris

TNF-alpha (Clone 28401/R&D System – diluição 1:20) Citrato

IL-6 (Clone 1936/R&D System – diluição 1:10) Citrato

Adiponectina (Clone 6D/US Biological – diluição 1:2000) Tris

Leptina (1:10, clone AF 398, R&D System) Tris

Resistina (1:50, clone LSB 2879, Lifespan) Tris

Para amplificação do sinal foi utilizado o kit PicTure MAX (Invitrogen, CA USA, ref 87-8983), conforme as orientações do fabricante. O agente cromógeno utilizado para a revelação dos cortes histológicos foi a solução de 3,3-diaminobenzidina (DAB) no tempo de 1 a 5 min., em temperatura ambiente. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris por 30s, e a lavagem das lâminas seguida de rápido mergulho em água de Scott. Por fim, as lâminas passaram por desidratação em banhos de álcool 70°, 95° e 100° e diafanização com banhos de xilol e montagem com lamínulas e resina sintética Entellan (Merck, Alemanha).

Utilizou-se o sistema de análise de imagem (Leica Cambridge Quantimet Image Analysis System Ltda, Cambridge, Reino Unido) com aumento de 200x para análise de frações de áreas com positividade para os anticorpos em questão.

Para a realização da quantificação das células, citocinas e adipocinas inflamatórias foram avaliados os seguintes campos na amostra de tecido:

- (A) Toda a borda do corte;
- (B) 10 regiões centrais aleatórias
- (C) 5 regiões aleatórias de vasos sanguíneos (arteríolas e capilares)

As quantificações dos campos foram dadas em porcentagem média de área e realizadas por 2 pesquisadores, sendo o segundo, independente e desconhecedor do protocolo de pesquisa.

---

# Análise Estatística

## **Cálculo do tamanho amostral**

Valores comparativos da expressão de diferentes citocinas inflamatórias direcionaram o cálculo da amostra de pacientes<sup>1,2,3</sup>, no entanto, como a expressão da proteína adiponectina no tecido se mostrou significativamente menor em pacientes com DAC comparados aos não portadores de DAC ( $1,42 \pm 0,77$  vs  $2,36 \pm 0,84$ ;  $p=0,02$ , 95% IC 0,64-1,74), seus valores nortearam o cálculo do tamanho amostral. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para o cálculo. A diferença mínima detectável das médias utilizada foi de 1,5 com desvio padrão de 1,0 em relação à média da adiponectina. O valor de alfa, nível de significância para detectar a diferença das médias foi de 0,01. O valor p de beta oferece um poder de 0,80 com perda esperada de 10%. Os dados foram inseridos no programa Primer Biostatistics ANOVA. Dessa forma, em cada grupo temos aproximadamente 20 pacientes. São 5 diferentes grupos de tratamento e, portanto, uma casuística de 90 a 100 pacientes. Estatisticamente, a amostra é suficiente para o objetivo proposto.

## **Análise estatística dos dados**

Os dados obtidos das amostras de sangue e biópsia de gordura epicárdica foram analisados usando os softwares PRIMER OF BIOSTATISTICS versão 5.0 e SPSS for Windows versão 19. Variáveis contínuas estão resumidas como média  $\pm$  desvio padrão. Comparações

entre variáveis independentes foram realizadas através de test-t de Student. A análise de variância ANOVA para medidas repetidas foi utilizado para verificação das diferenças na quantificação dos parâmetros plasmáticos antes e após o tratamento dentro de cada grupo de pacientes DAC/SMet dos grupos Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina. Para a análise de variância foi aplicado ANOVA “one way” seguido por teste de Bonferroni com intuito de comparar valores médios de variáveis contínuas entre grupos de tratamento com análise *post hoc*. Utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson para análise da medida da relação entre as variáveis plasmáticas e teciduais.

Para a análise comparativa entre os grupos DAC/SMet sob diferentes tratamentos, considerou-se o grupo não tratado como controle.

Os valores das médias e proporções foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

Os resultados apresentados em figuras e tabelas correspondem aos valores após tratamento, exceto para aqueles citados como valor inicial (anterior ao tratamento).

---

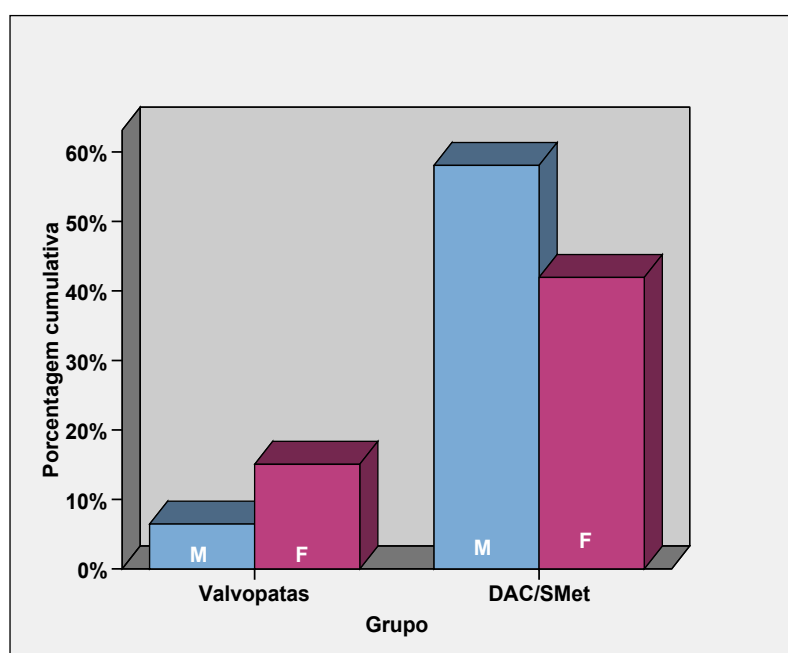
# Resultados



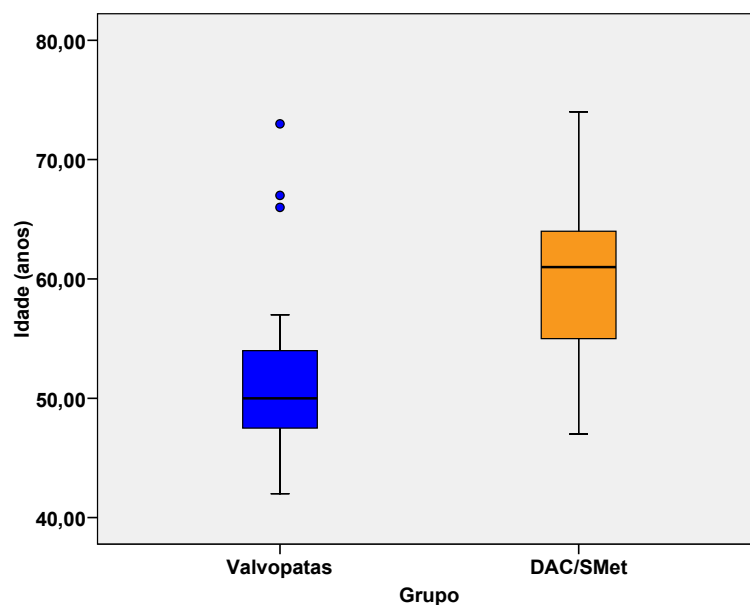
## CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES VALVOPATAS

### ÍNDICES ANTROPOMÉTRICOS, LIPÍDICOS E GLICÊMICOS

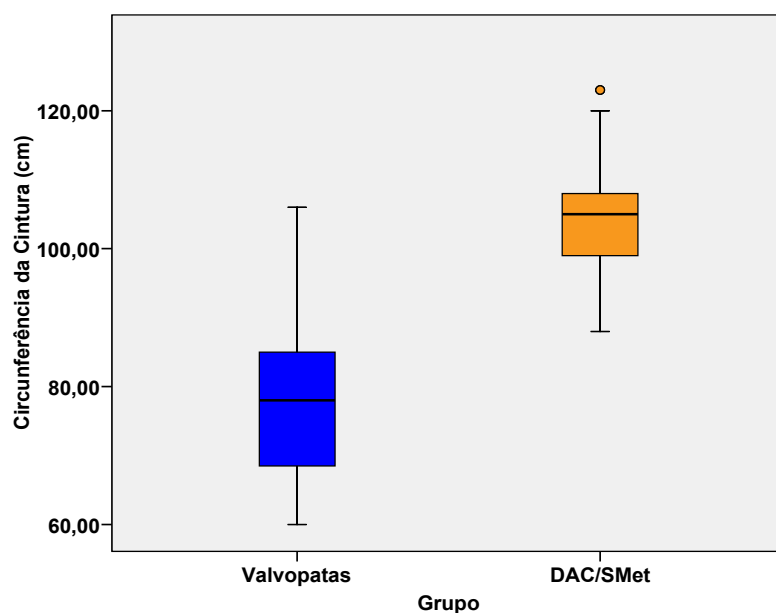
O grupo de valvopatas foi composto por 20 pacientes, a maioria mulheres (70 %;  $p= 0,005$ ), com os menores valores médios de idade ( $52,3\pm 8,0$  anos;  $p<0,001$ , pressão sistólica (PAS) ( $113\pm 10,0$  mmHg;  $p<0,001$ ), pressão diastólica (PAD) ( $72\pm 11,5$  mmHg;  $p=0,006$ ), circunferência da cintura (circcint) ( $78,4\pm 11,9$  cm;  $p<0,001$ ), peso inicial (peso i) ( $58,9\pm 12,4$  Kg;  $p<0,001$ ) e peso final (peso f) ( $57,2\pm 11,9$  Kg;  $p<0,001$ ) em relação aos pacientes portadores de DAC/SMet, com maioria homens (65,8 %), valores médios de idade de  $60,5\pm 6,7$  anos, PAS de  $146,5\pm 19,3$  mmHg, PAD de  $80,6\pm 12,4$  mmHg, circcint de  $104\pm 8,0$  cm, peso i de  $81,6\pm 12,4$  Kg e peso f de  $80,3\pm 12,2$  Kg, conforme detalhado nas figuras 3 a 9.



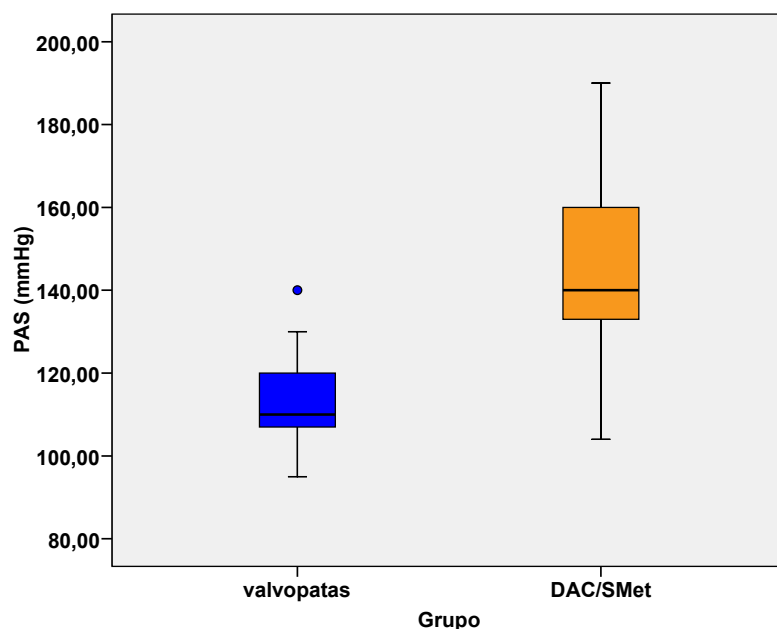
**Figura 3.** Proporção de pacientes valvopatas (n=20) dos sexos masculino (M) e feminino (F) comparada à do grupo com DAC/SMet (n=73).



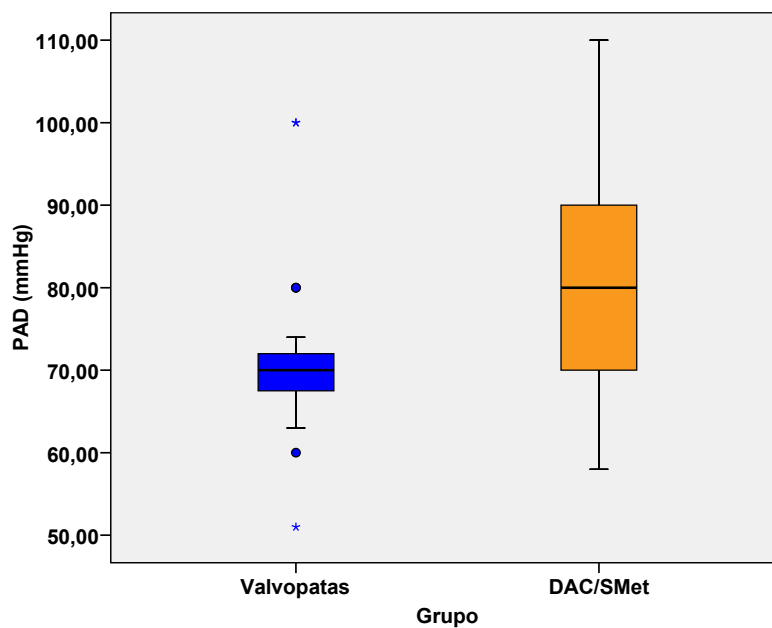
**Figura 4.** Distribuição da idade dos pacientes valvopatas (n=20) comparada à do grupo com DAC/SMet (n=73).



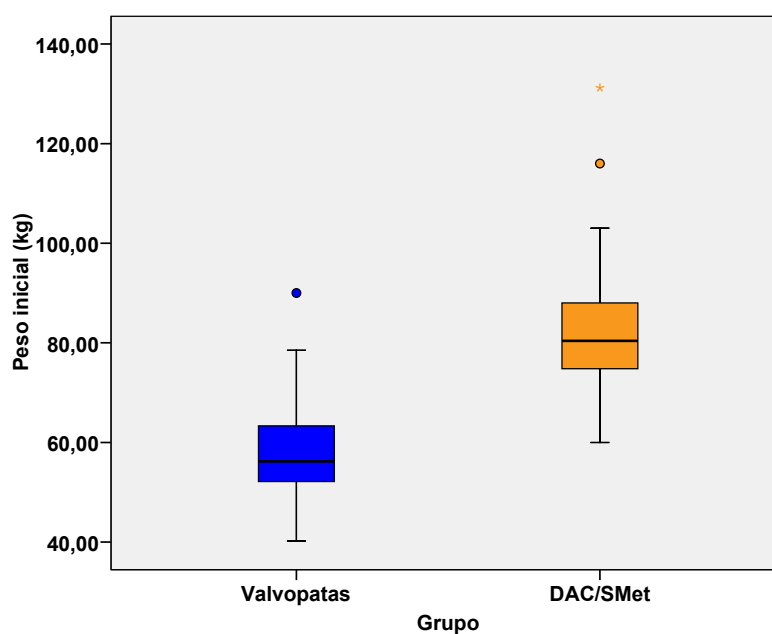
**Figura 5.** Valores de circunferência da cintura dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73).



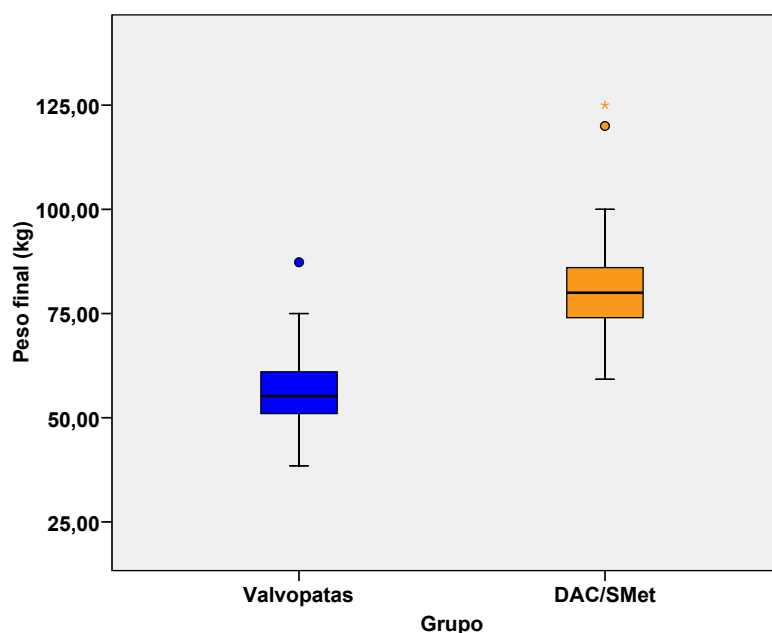
**Figura 6.** Valores de pressão arterial sistólica dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) no início da pesquisa.



**Figura 7.** Valores de pressão arterial diastólica dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) no início da pesquisa.



**Figura 8.** Valores do peso dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) no início da pesquisa.

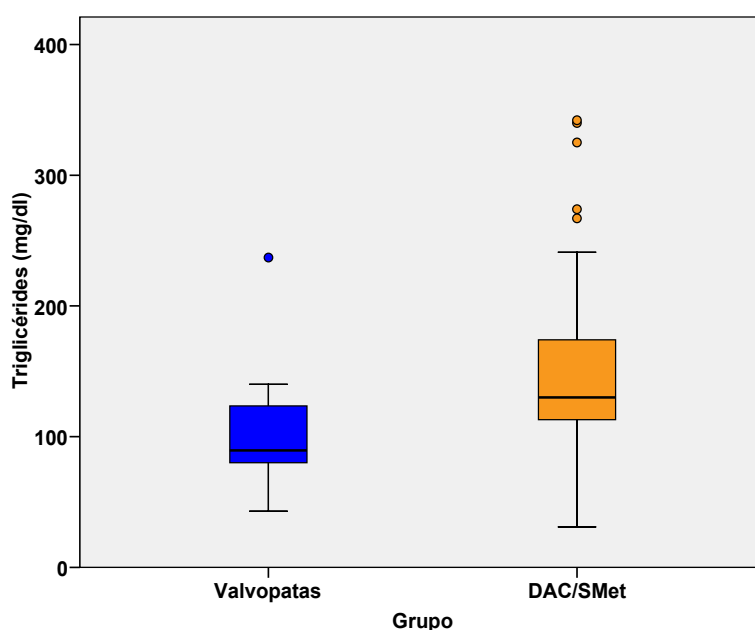


**Figura 9.** Peso dos pacientes valvopatas (n=20) comparado ao do grupo com DAC/SMet (n=73) ao final da pesquisa.

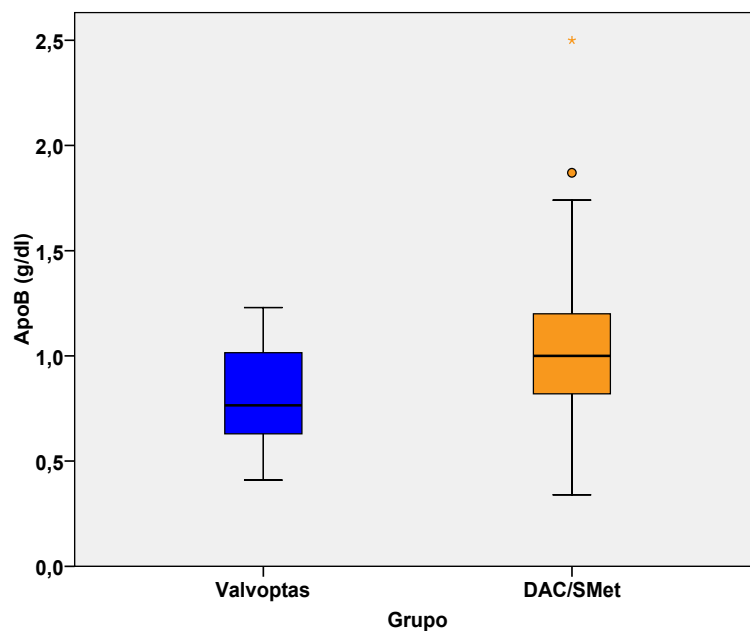
Através da dosagem de peptídeo natriurético plasmático (BNP), cujo valor médio foi de  $16,4 \pm 9,0$  pg/ml, verificou-se que os pacientes valvopatas não apresentavam alterações miocárdicas compatíveis com disfunção ventricular.

Esses pacientes se diferenciaram do grupo DAC/SMet por apresentarem valores plasmáticos finais significativamente mais baixos para triglicérides ( $103,1 \pm 40,5$  mg/dl vs  $148,2 \pm 58,7$  mg/dl;  $p=0,002$ ), apo B ( $0,80 \pm 0,24$  g/dl vs  $1,02 \pm 0,35$  g/dl;  $p=0,008$ ), glicose em jejum ( $82,9 \pm 11,8$  mg/dl vs  $114,4 \pm 29,8$  mg/dl;  $p < 0,001$ ) e HbA1c ( $5,63 \pm 0,41$  % vs  $6,11 \pm 1,1$  %;  $p=0,003$ ) (figuras 10 a 13).

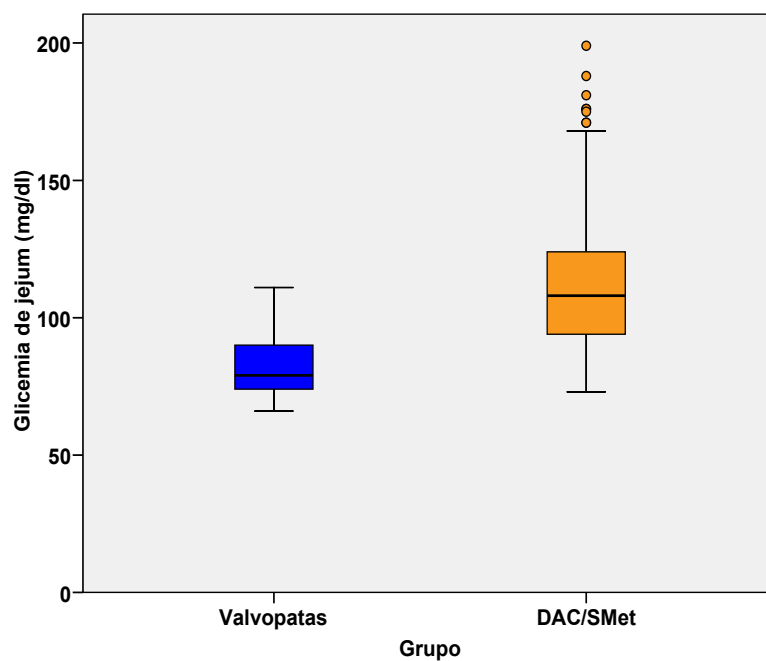
Quanto aos valores finais de colesterol total, não se registrou diferença significativa ( $164,2 \pm 35,5$  mg/dl vs  $176,4 \pm 50,1$  mg/dl;  $p=0,312$ ), LDL-c ( $103,5 \pm 29,7$  mg/dl vs  $111,1 \pm 35,5$  mg/dl;  $p=0,381$ ) e HDL-c ( $44,1 \pm 13,9$  mg/dl vs  $39,6 \pm 7,3$  mg/dl;  $p=0,168$ ) entre paciente valvopatas e DAC/SMet.



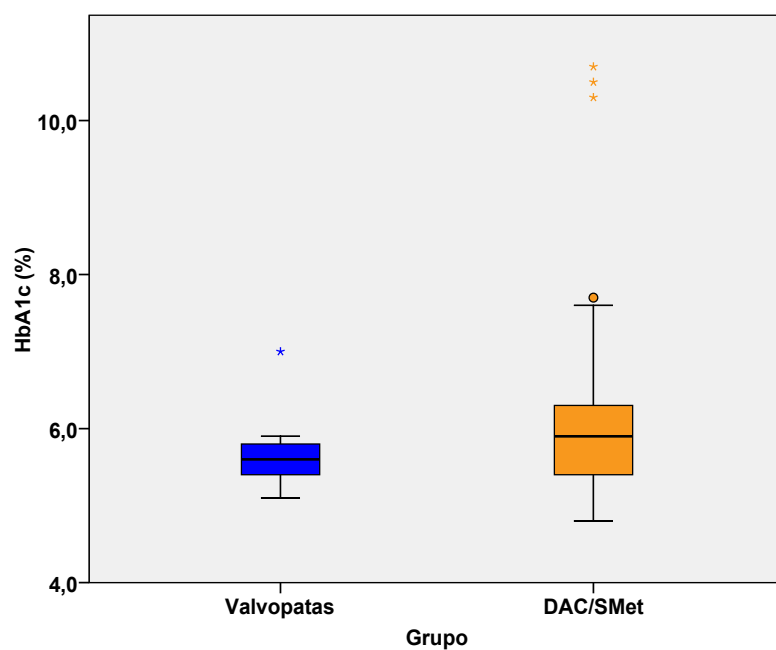
**Figura 10.** Valores finais de triglicérides plasmáticos dos valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73).



**Figura 11.** Valores de apolipoproteína B plasmática dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) ao final da pesquisa.



**Figura 12.** Valores de glicemia de jejum dos pacientes valvopatas (n=20) comparados aos do grupo com DAC/SMet (n=73) ao final da pesquisa.



**Figura 13.** Valores de hemoglobina glicada dos pacientes valvopatas (n=20) comparada à do grupo com DAC/SMet (n=73) ao final da pesquisa.

## BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS

Os pacientes do grupo valvar apresentaram baixos valores plasmáticos finais de MCP-1 ( $73,0 \pm 6,2$  pg/ml vs  $272,3 \pm 140,2$  pg/ml;  $p < 0,001$ ), superiores apenas aos do grupo DAC/SMet após tratamento com Sinvastatina ( $66,5 \pm 11,2$  pg/ml;  $p < 0,05$ ). Os níveis de PCRus ( $3,89 \pm 1,5$  mg/l;  $p = 0,466$ ), ADMA ( $0,47 \pm 0,13$   $\mu$ mol/l;  $p = 0,595$ ) e MMP-9 ( $553,3 \pm 157,4$  ng/ml;  $p = 0,146$ ) daqueles pacientes ao final da pesquisa eram semelhantes aos dos portadores de DAC/SMet, respectivamente,  $3,4 \pm 2,5$  mg/l,  $0,44 \pm 0,20$   $\mu$ mol/l,  $461,5 \pm 266,7$  ng/ml.

Com relação às citocinas pró-inflamatórias séricas, as dosagens finais mais baixas no grupo de pacientes valvares foram encontradas para leptina ( $3,52 \pm 1,9$  pg/ml vs  $19,3 \pm 15,0$  pg/ml) e resistina ( $4,3 \pm 1,1$  ng/ml vs  $7,7 \pm 2,8$  ng/ml) ( $p < 0,001$  para ambas). O valor médio obtido para adiponectina sérica foi o mais elevado ( $15,2 \pm 4,3$   $\mu$ g/ml vs  $4,9 \pm 2,4$   $\mu$ g/ml;  $p < 0,001$ ).

Em TAE dos valvopatas, as células inflamatórias como macrófagos e linfócitos T e B, assim como as citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL6, leptina e resistina raramente foram observadas. Quando presentes, ficavam entre os adipócitos, espalhadas por todo o fragmento de tecido, com leve predominância nas bordas e ao redor dos vasos sanguíneos.

A quantidade média de adiponectina no tecido ( $25,7 \pm 3,3$  % média de área) encontrada naqueles pacientes foi maior que a somatória das médias das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL6, leptina mais resistina

( $14,7 \pm 3,8$  % média de área). Já a quantidade de linfócitos B foi significativamente menor em relação ao TAE dos pacientes DAC/SMet tratados com Sinvastatina ( $0,10 \pm 0,1\%$  vs  $1,6 \pm 1,1\%$ ;  $p < 0,001$ ). A quantificação de IL6 foi igual ( $4,83 \pm 1,05$  %;  $p < 0,001$ ) à encontrada em TAE dos pacientes DAC/SMet após monoterapia com Pioglitazona ( $4,5 \pm 0,9$  %) e terapia combinada ( $4,03 \pm 1,0$  %).

As representações gráficas comparando a quantidade de células inflamatórias e citocinas em TAE de valvopatas com a dos pacientes DAC/SMet podem ser visualizadas nas figuras 30 a 37.

## ***CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E SÍNDROME METABÓLICA***

### **ÍNDICES ANTROPOMÉTRICOS, LIPÍDICOS E GLICÊMICOS**

Todos os voluntários com DAC/SMet eram hipertensos, 10% haviam sofrido infarto agudo do miocárdio prévio, 2 % haviam sido submetidos a angioplastia coronária anteriormente e 2 % estavam sendo submetidos a cirurgia de revascularização pela segunda vez.

Dentre os pacientes com DAC/SMet diabéticos alocados no grupo em uso de Pioglitazona, sete (40 %) dos dezoito integrantes usaram Metformina e quatro (22,2 %) utilizaram Insulina e Metformina concomitantemente a fim de otimizar o controle glicêmico durante a participação no protocolo de pesquisa. Os pacientes de difícil controle glicêmico apresentaram edema de membros inferiores em grau leve a moderado, durante o período de tratamento. Nenhuma outra ocorrência envolvendo efeitos colaterais descritos para Sinvastatina ou Pioglitazona foi observada.

Como mostra a tabela 2, havia predominância de homens dentre os grupos DAC/SMet, embora os valores não apresentassem significância estatística ( $p=0,314$ ). Os voluntários do grupo Pioglitazona se diferenciavam dos demais por apresentarem menor idade (57 anos;  $p=0,02$ ) e maior PAS (162 mmHg;  $p\leq 0,02$ ). Os pacientes do grupo



Pioglitazona+Sinvastatina iniciaram o protocolo com menor valor de PAD (70 mmHg;  $p \leq 0,015$ ) comparativamente aos pacientes não tratados.

Os menores pesos corporais no início (76 Kg) e ao final da pesquisa (74 Kg) foram apresentados pelos pacientes do grupo Sinvastatina, em relação ao grupo não tratado (respectivamente, 85 kg e 82 kg) ( $p < 0,05$ ). Após aplicação do teste post hoc, todos os grupos de pacientes com DAC/SMet se mostraram homogêneos entre si quanto à circint.

**Tabela 2.** Parâmetros antropométricos de pacientes com DAC/SMet.

	PACIENTES DAC/SMET				P
	NÃO TRATADO N=17	PIO N=18	SINVA N=20	PIO+SINVA N=18	
<b>Parâmetros</b>					
<b>Sexo (%)</b>					
<b>M</b>	12(70,6 %)	10 (55,6 %)	16 (80,0 %)	10 (55,6 %)	0,314
<b>F</b>	5 (29,4 %)	8 (44,4 %)	4 (20,0 %)	8 (44,4 %)	
<b>Idade (anos)</b>	64,3±6,01	57,6±5,89	60,1±6,38	60,1±7,08	< 0,001
<b>PAS (mmHg)</b>	145±17,1	162±20,3	134±15,1	145±13,8	< 0,001
<b>PAD (mmHg)</b>	87±11,8	85±12,0	78±10,3	73±11,2	0,006
<b>Circint (cm)</b>	103,6±6,4	103,7±8,09	103,2±8,62	105,2±9,06	< 0,001
<b>Peso i (Kg)</b>	85,8±13,7	80,6±13,7	76,7±10,8	83,9±10,2	< 0,001
<b>Peso f (Kg)</b>	82,5±12,9	81,4±14,6	74,6±10,5	83,3±9,3	< 0,001

M=masculino; F=feminino; PAS=pressão sistólica; PAD=pressão diastólica; circint=circunferência da cintura; peso i=peso inicial; peso f=peso final. Valores: sexo: número (%) e demais parâmetros: média±desvio padrão. p = nível de significância obtido através de ANOVA (exceto para a variável sexo). A comparação entre os tratamentos foi realizada através da aplicação de teste de Bonferroni e é detalhada no texto.

A tabela 3 e as figuras 14 a 16 mostram que, dentre os portadores de DAC/SMet, os que utilizaram Sinvastatina e Pioglitazona+Sinvastatina revelaram, ao final do tratamento, as menores

concentrações plasmáticas para LDL-c ( $p \leq 0,008$ ); os que utilizaram Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina obtiveram aumento na concentração plasmática de HDL-c ( $p < 0,02$ ), enquanto o índice médio de triglicérides dos pacientes com tratamento combinado foi o menor ( $p = 0,03$ ), sempre em comparação ao grupo não tratado.

**Tabela 3.** Parâmetros lipídicos e glicêmicos plasmáticos ao final do tratamento de pacientes com DAC/SMet.

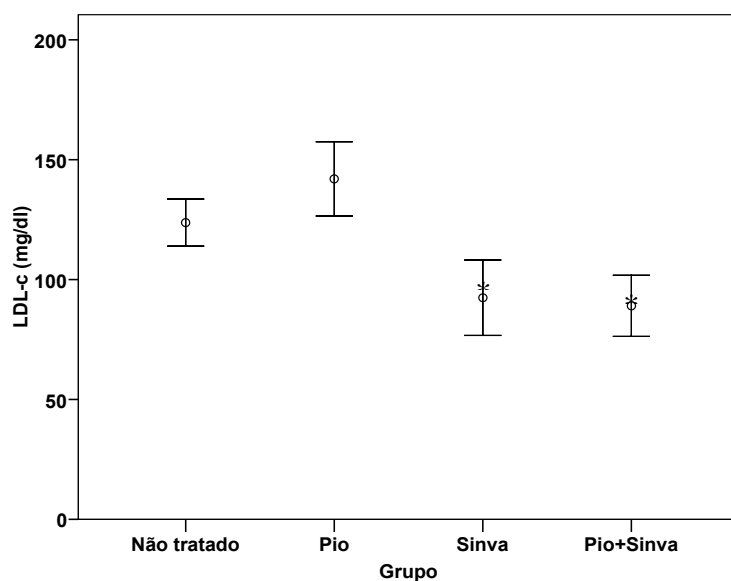
PACIENTES DAC/SMET					
	NÃO TRATADO N=17	PIO N=18	SINVA N=20	PIO+SINVA N=18	P
<b>Parâmetros</b>					
<b>CT (mg/dl)</b>	190,2±26,1	234,6±29,4	156,2±41,02	127,5±21,7	< 0,001
<b>LDL-c (mg/dl)</b>	123,7±19,1	142,0±31,1	92,4±33,6	89,1±25,6	< 0,001
<b>HDL-c (mg/dl)</b>	36,8±4,8	40,5±8,9	40,3±7,5	42,6±6,3	0,006
<b>Trigl (mg/dl)</b>	162,9±55,9	167,9±61,3	152,0±68,6	110,4±22,1	0,011
<b>apoB (g/dl)</b>	1,2±0,12	1,2±0,42	0,9±0,29	0,7±0,16	< 0,001
<b>Glic (mg/dl)</b>	101,2±12,3 <sup>■</sup>	120,4±24 <sup>■</sup>	93,2±17,1 <sup>■</sup>	145,0±31,9 <sup>■</sup>	< 0,001
<b>Insulina (μUI/ml)</b>	10,3±1,3	15,1±5,4	7,9±3,14	8,8±1,2	< 0,001
<b>HbA1c (%)</b>	5,8±0,50 <sup>■</sup>	6,7±1,5 <sup>■</sup>	5,6±0,6 <sup>■</sup>	6,41±1,16 <sup>■</sup>	0,004

CT=colesterol total; LDL-c=lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=lipoproteína de alta densidade; Trigl=triglicérides; apoB=apolipoproteína B; Glic=glicose; HbA1c=hemoglobina glicada.

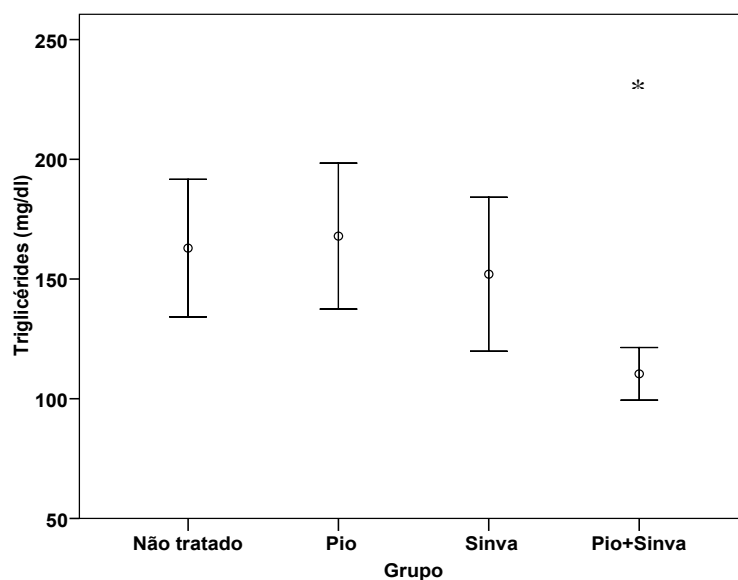
Valores: média±desvio padrão.

p = nível de significância obtido através de ANOVA. A comparação entre os tratamentos foi realizada através da aplicação de teste de Bonferroni e é detalhada no texto.

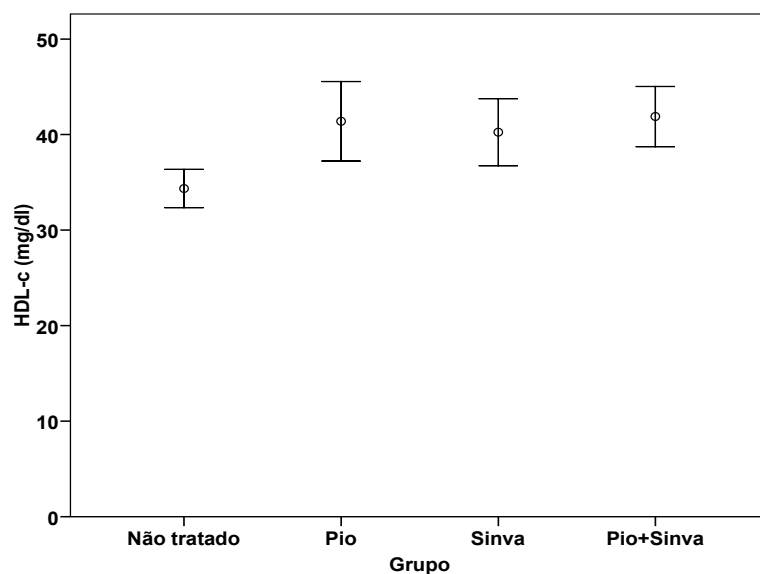
■ Os valores iniciais diferiram entre os grupos; pacientes com DM2 iniciaram pioglitazona a partir de valores glicêmicos mais elevados (detalhes na tabela 9).



**Figura 14.** Valores finais de LDL-c dos pacientes do grupo com DAC/SMet (n=73). \* $p \leq 0,008$  em relação ao grupo não tratado.



**Figura 15.** Valores finais de triglicérides dos pacientes do grupo com DAC/SMet (n=73). \* $p = 0,03$  em relação ao grupo não tratado.



**Figura 16.** Valores finais de HDL-c dos pacientes do grupo com DAC/SMet (n=73). \* $p < 0,02$  em relação ao grupo não tratado.

Os valores iniciais dos parâmetros glicêmicos foram diferentes entre os grupos DAC/SMet, sendo que os pacientes que receberam a Glitazona iniciaram a pesquisa apresentando os índices de glicemia de jejum mais elevados, o que confirma a presença de DM2 franco e, portanto, justifica a indicação do hipoglicemiante (tabela 5).

A glicemia de jejum foi reduzida após a utilização de Pioglitazona em monoterapia ( $p=0,002$  em comparação à Sinvastatina) ou em terapia combinada ( $p<0,001$  em relação ao grupo não tratado). O valor de HbA1c variou, mostrando-se menor com o uso de Pioglitazona em relação ao grupo Sinvastatina ( $p=0,007$ ).

#### **BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS PLASMÁTICOS**

A PCRus apresentou-se elevada nos pacientes do grupo não tratado ( $7,4\pm 1,5$  mg/L). Comparadas a esse grupo, todas as terapias foram efetivas ao reduzir os índices plasmáticos de PCRus ( $p<0,001$ ) (tabela 4, figura 17).

A proteína MCP-1 foi significativamente reduzida no grupo tratado com Sinvastatina ( $p<0,001$ ) (tabela 4, figura 18). Os níveis de ADMA obtidos para cada grupo de tratamento não permitiram a realização de teste *post hoc* devido à ausência de significância quando da aplicação de ANOVA.

Os níveis plasmáticos de MMP-9 foram os mais baixos após monoterapia com Pioglitazona ( $p<0,001$ ) ou após terapia combinada ( $p=0,013$ ) (tabela 4, figura 19).

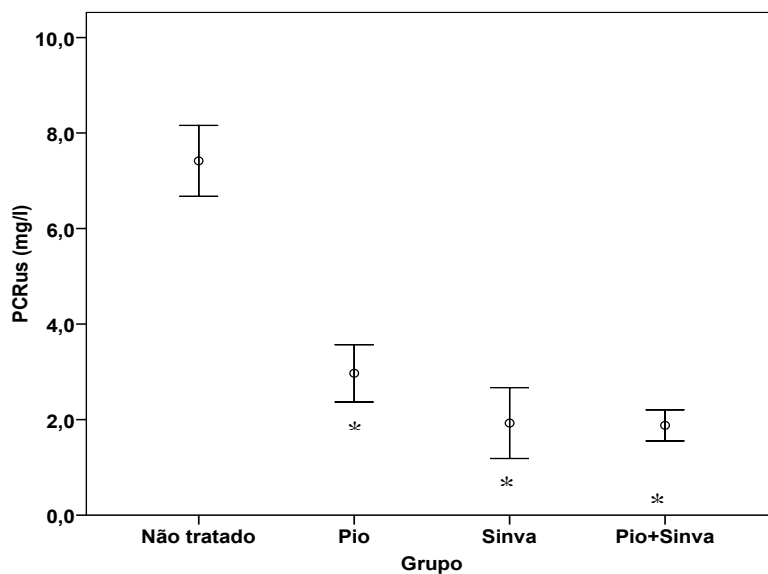
**Tabela 4.** Biomarcadores inflamatórios plasmáticos ao final do tratamento de pacientes com DAC/SMet.

PACIENTES DAC/SMET					
	NÃO TRATADO	PIO	SINVA	PIO+SINVA	P
	N=17	N=18	N=20	N=18	
Parâmetros					
<b>PCRus (mg/l)</b>	7,4±1,45	2,9±1,21	1,9±1,6	1,9±0,6	<0,001
<b>ADMA (µmol/l)</b>	0,5±0,14	0,4±0,33	0,5±0,12	0,3±0,1	0,056
<b>MCP-1 (pg/ml)</b>	341,9±66,2	381,5±69,3	66,5±11,2	325,9±62,1	<0,001
<b>MMP-9 (ng/ml)</b>	577,1±147,0	216,5±32,6	672,6±340,4	362,7±103,6	<0,001
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	5,3±1,06	3,15±1,15	3,2±1,15	2,68±0,7	<0,001
<b>TNFα (pg/ml)</b>	16,7±2,4	7,92±1,03	18,3±10,9	8,65±2,1	<0,001
<b>Adipon (µg/ml)</b>	1,5±0,43	6,1±1,2	4,6±1,04	7,4±1,2	<0,001
<b>Leptina (pg/ml)</b>	17,0±2,07	42,9±9,01	4,8±1,3	13,9±1,6	<0,001
<b>Resistina (ng/ml)</b>	12,1±1,4	5,41±1,32	6,41±1,0	7,41±1,0	<0,001

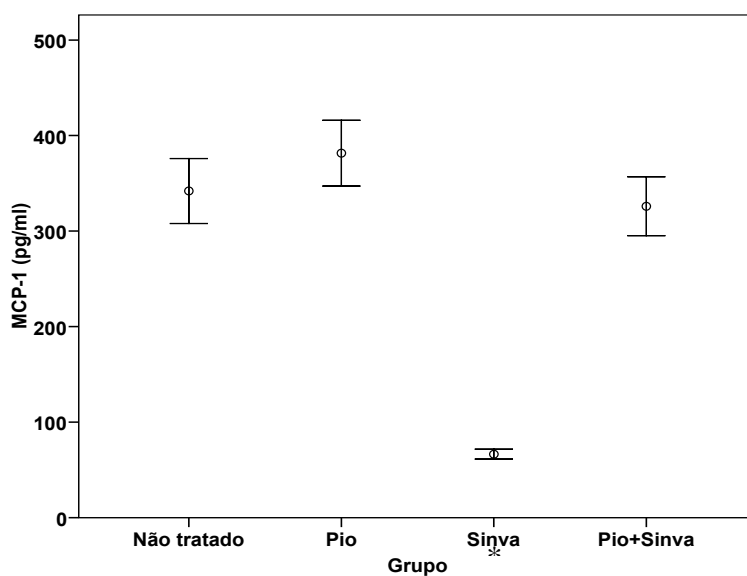
PCRus=proteína C reativa ultrasensível. ADMA = dimetilarginina assimétrica; MCP-1 = proteína atrativa de monócitos; MMP-9 = metaloproteinase 9. IL-6=interleucina-6; TNF-α=fator de necrose tumoral alfa; adipon=adiponectina.

Valores: média±desvio padrão.

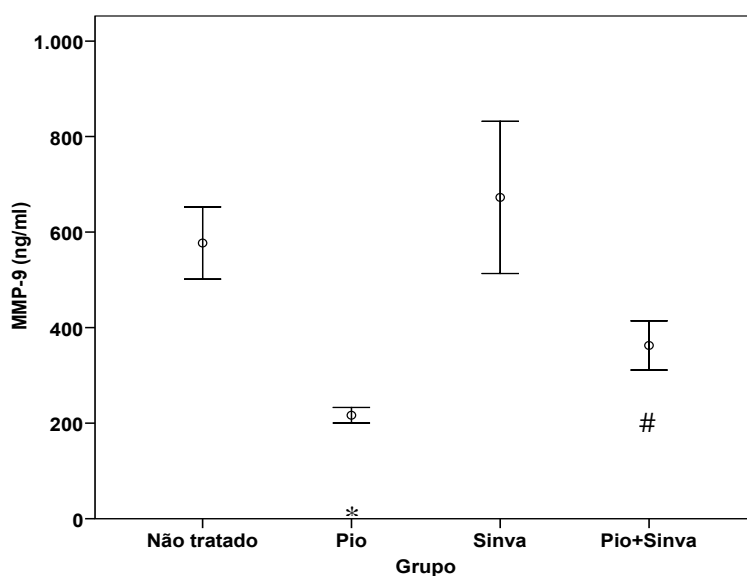
p = nível de significância obtido através de ANOVA. A comparação entre os tratamentos foi realizada através da aplicação de teste de Bonferroni e é detalhada no texto.



**Figura 17.** Valores finais de PCRus plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado.

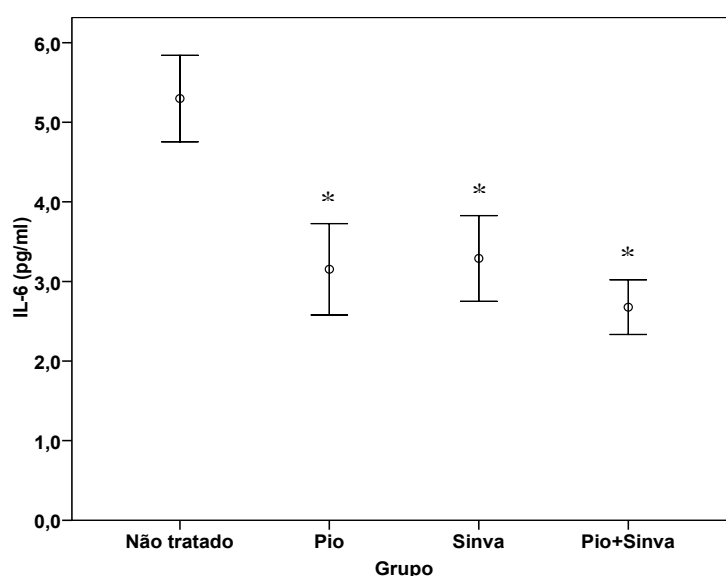


**Figura 18.** Valores finais de MCP-1 plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet. \* $p < 0,001$  em relação aos demais grupos.

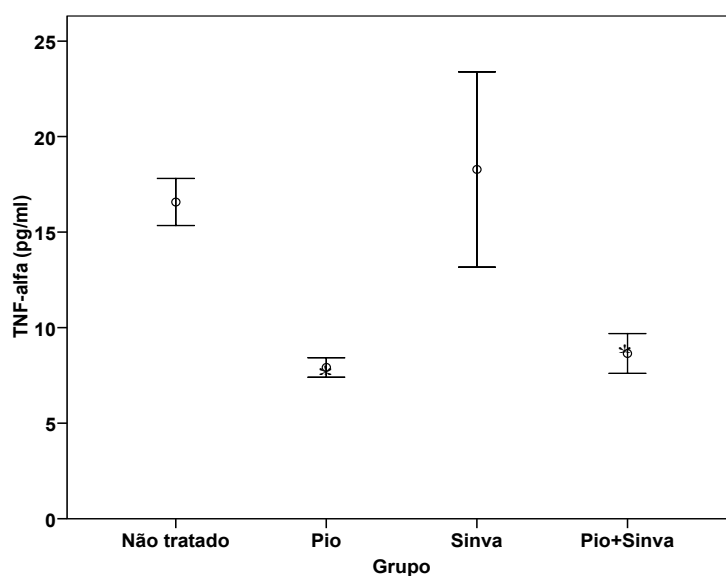


**Figura 19.** Valores finais de MMP-9 plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet. \* $p < 0,001$  e # $p = 0,013$  em relação aos demais grupos.

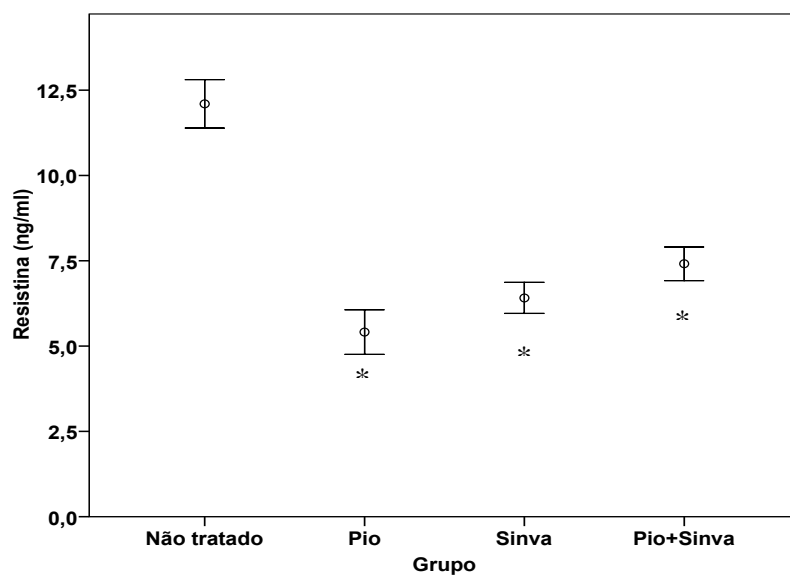
Dentre as citocinas pró-inflamatórias, a IL-6 e a resistina mostraram-se significativamente reduzidas após os tratamentos ( $p < 0,001$  para ambas); TNF- $\alpha$  foi reduzido após o uso de Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina; a leptina foi reduzida com o uso de Sinvastatina e aumentou mesmo após monoterapia com Pioglitazona em comparação ao grupo não tratado. Em geral, o grupo não tratado apresentou as mais altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (exceto para TNF- $\alpha$  e leptina) e a menor quantidade de adiponectina plasmática (tabela 5, figuras 20 a 24).



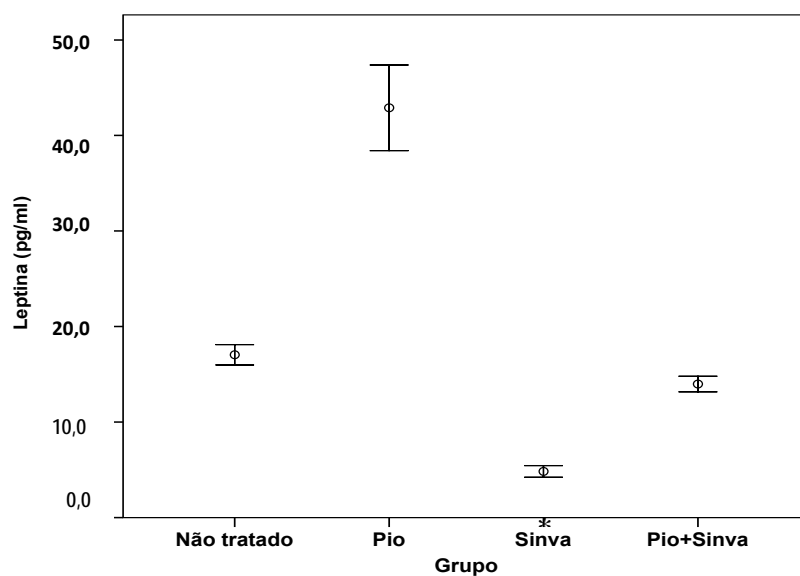
**Figura 20.** Valores finais de IL-6 plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado.



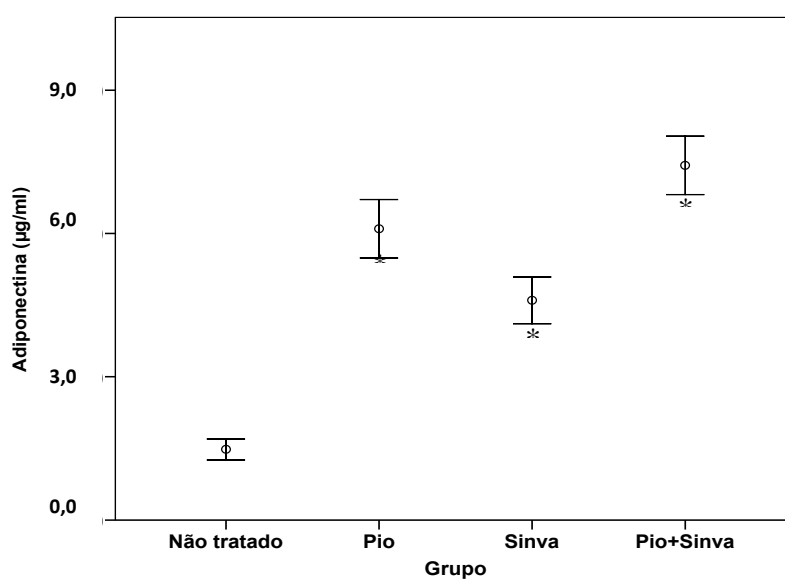
**Figura 21.** Valores finais de TNF-alfa plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado.



**Figura 22.** Valores finais de resistina plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado.



**Figura 23.** Valores finais de leptina plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado.



**Figura 24.** Valores finais de adiponectina plasmática dos pacientes do grupo com DAC/SMet. \* $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado.



A concentração plasmática de adiponectina mostrou-se significativamente menor no grupo portador de DAC/SMet não tratado em comparação aos grupos que receberam tratamento. Ainda no grupo não tratado, os níveis séricos de TNF- $\alpha$ , ADMA, MCP-1 e IL-6 apresentaram-se maiores. Nos pacientes dos grupos com DAC/SMet Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina observou-se aumento significativo na concentração plasmática de adiponectina concomitantemente à redução dos índices de TNF $\alpha$ , resistina, IL-6 e MMP-9 em comparação ao grupo não tratado.

#### **ÍNDICES LIPÍDICOS, GLICÊMICOS E BIOMARCADOR INFLAMATÓRIO PLASMÁTICO ANTES E APÓS TRATAMENTO COM PIOGLITAZONA e PIOGLITAZONA+SINVASTATINA**

Nos pacientes tratados por 90 dias com Pioglitazona, o CT não foi reduzido em relação ao início do tratamento, assim como a apo B e o LDL-c. Os valores para HDL-c aumentaram, embora sem significância estatística; apenas os triglicérides diminuíram, passando de 196 mg/dL para 167 mg/dL ( $p=0,019$ ; tabela 5). Ao verificar-se a distribuição dos mesmos índices lipídicos antes e após tratamento com Pioglitazona+Sinvastatina, confirma-se a redução significativa do LDL-c em 9 % e dos triglicérides em 22 %, simultaneamente ao aumento de HDL-c em 16 % (figuras 25 a 27).

**Tabela 5.** Parâmetros lipídicos e glicêmicos plasmáticos de pacientes com DAC/SMet antes e após tratamento com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina.

	PACIENTES DAC/SMET					
	PIOGLITAZONA			PIOGLITAZONA+SINVASTATINA		
	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>p</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>p<sup>#</sup></i>
<b>CT</b> <b>(mg/dL)</b>	224,7±38,3	234,6±29,4	0,194	161,6±39,13	127,5±21,76	<0,001
<b>Apo B</b> <b>(g/dL)</b>	1,21±0,3	1,26±0,4	0,326	1,03±0,3	0,70±0,16	<0,001
<b>LDL-c</b> <b>(mg/dL)</b>	134,3±34,7	142±31,1	0,115	100,7±37,33	89,1±25,6	0,009
<b>HDL-c</b> <b>(mg/dL)</b>	38,5±5,5	41,4±8,36	0,05	36,7±7,44	41,9±6,3	<0,001
<b>Trigl</b> <b>(mg/dL)</b>	196,2±71,26	167,9±61,3	0,019	140,8±34,4	110,3±22,1	<0,001
<b>Glic</b> <b>(mg/dl)</b>	146,8±47,0	120,4±24	0,001	200,1±60,2	144,4±31,8	<0,001
<b>HbA1c</b> <b>(%)</b>	7,5±1,8	6,7±1,5	0,023	7,9±2,08	6,4±1,16	<0,001

CT=colesterol total; LDL-c=lipoproteína de baixa densidade; HDL-c=lipoproteína de alta densidade; Trigl=triglicérides; apoB=apolipoproteína B; Glic=glicose; HbA1c=hemoglobina glicada.

Valores: média±desvio padrão.

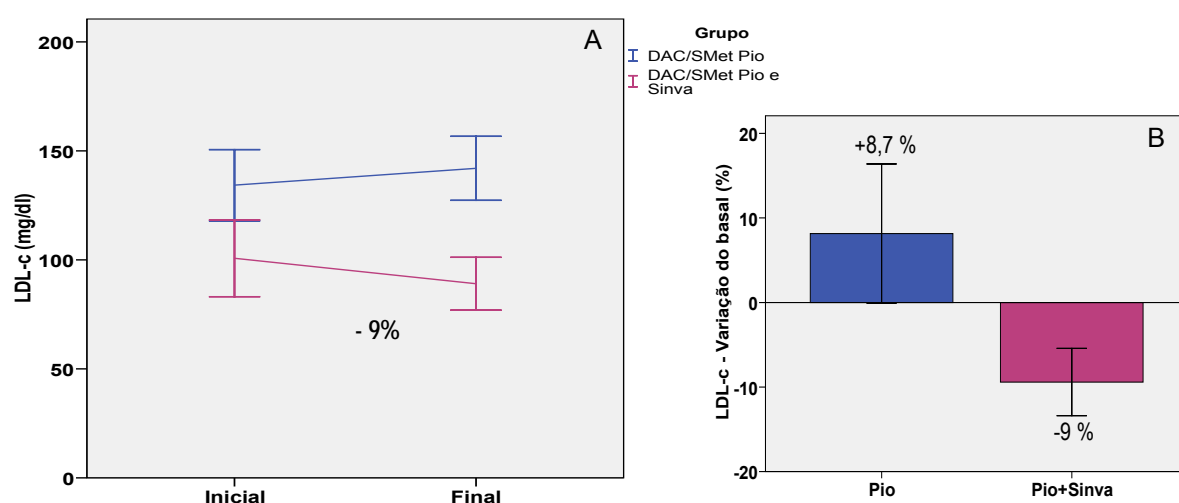
p = nível de significância entre antes e após tratamento com Pioglitazona obtido no teste ANOVA de medidas repetidas;

p<sup>#</sup> = nível de significância entre antes e após tratamento com Pioglitazona+Sinvastatina no teste ANOVA de medidas repetidas.

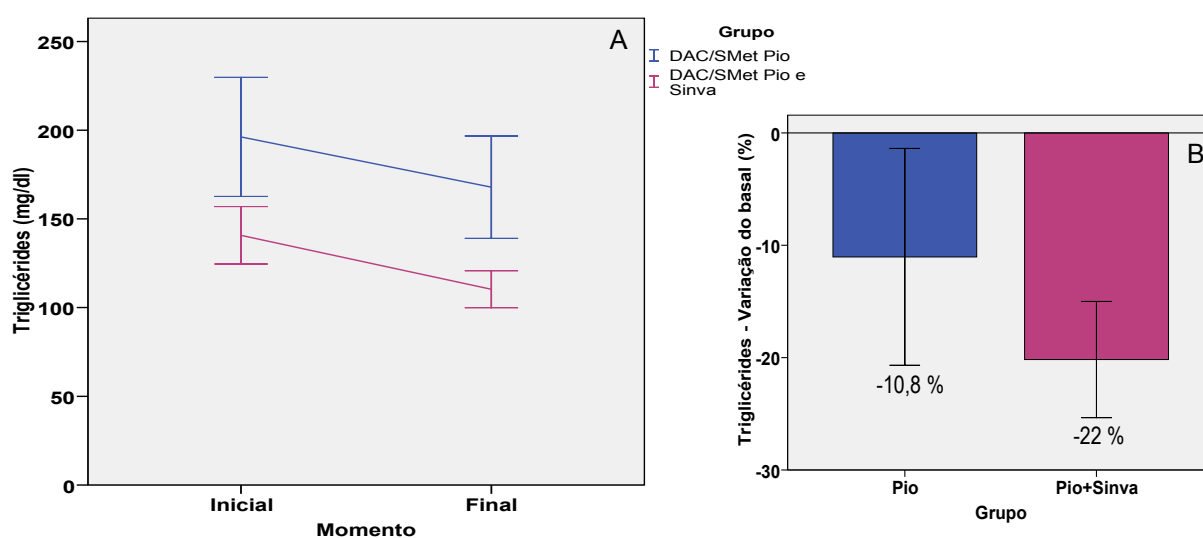
Os pacientes tratados com Pioglitazona, tanto em monoterapia como combinada à Sinvastatina, tiveram os valores de glicose e HbA1c significativamente reduzidos após tratamento, como mostra a tabela 5. Somente com Pioglitazona, a concentração de glicose plasmática foi reduzida em 20 % (figura 28) e a HbA1c em 12,3 %. Ao reunir-se

Sinvastatina+Pioglitazona, a glicose e a HbA1c mostraram redução de 26 % (figura 28) e 21 %, respectivamente.

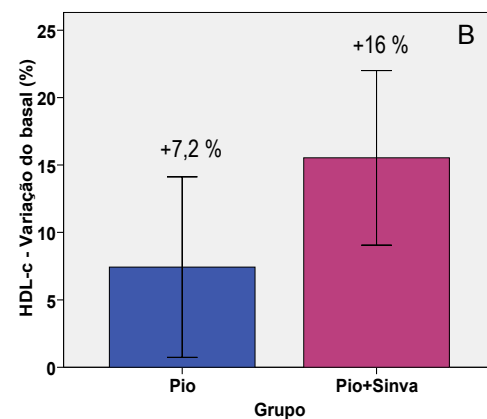
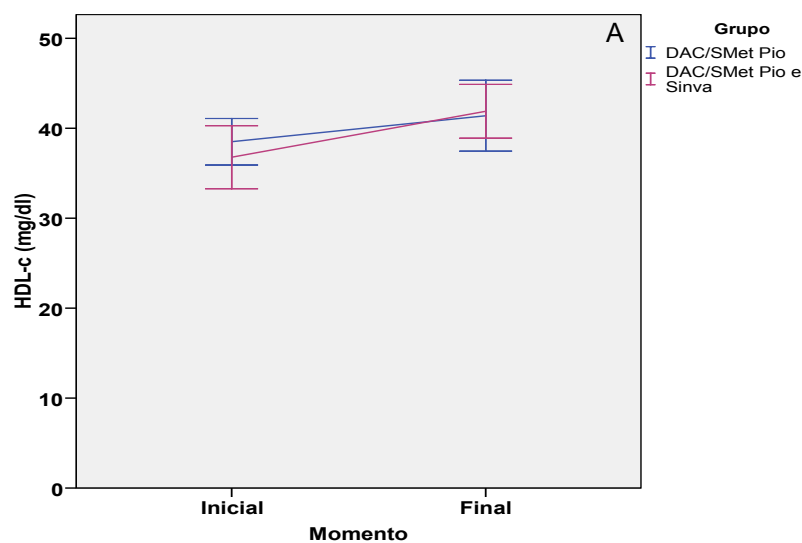
As variações dos índices de LDL-c, HDL-c, triglicérides e glicose de jejum antes e após terapia com Pioglitazona e com Pioglitazona+Sinvastatina são representadas nos gráficos a seguir.



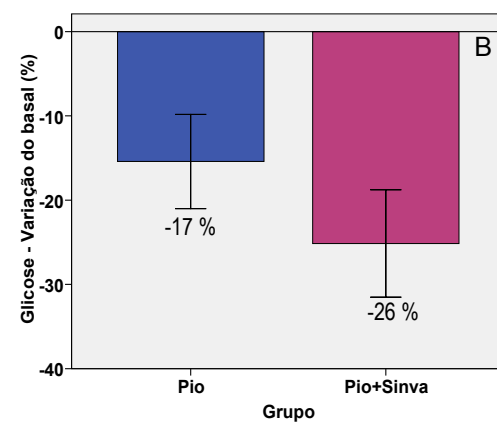
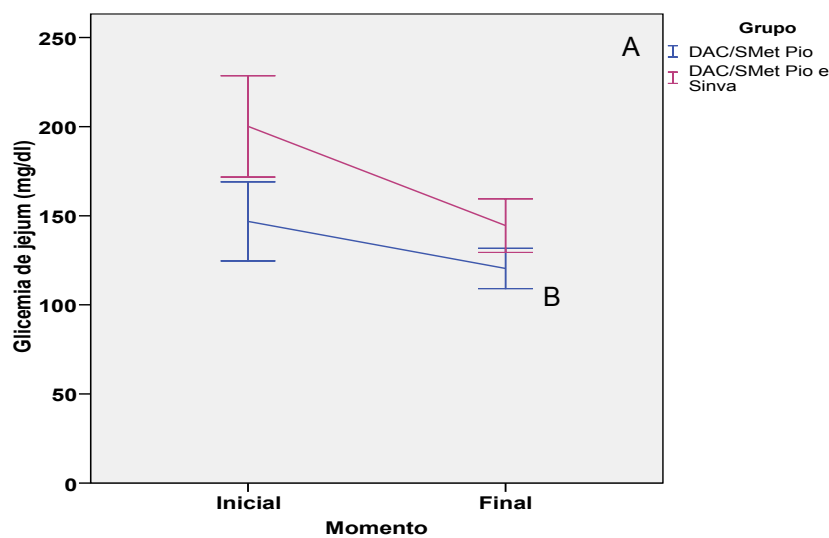
**Figura 25.** Variações do LDL-c dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina. (A) LDL-c no início da pesquisa e após tratamento. (B) Variação do LDL-c a partir do basal.



**Figura 26.** Variações dos triglicérides dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina. (A) Triglicérides no início da pesquisa e após tratamento. (B) Variação dos triglicérides a partir do basal.



**Figura 27.** Variações do HDL-c dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina. (A) HDL-c no início da pesquisa e após tratamento. (B) Variação do HDL-c a partir do basal.



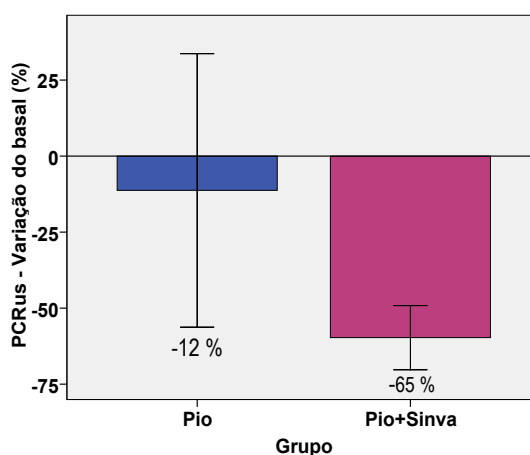
**Figura 28.** Variações da glicose plasmática dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina. (A) Glicemia no início da pesquisa e após tratamento. (B) Variação da glicose plasmática a partir do basal.

Como se pode observar, quanto aos parâmetros lipídicos e glicêmicos plasmáticos, houve redução de glicemia de jejum, HbA1c e triglicérides após tratamento com Pioglitazona por 90 dias. No entanto, pacientes com DAC/SMet tratados com Pioglitazona+Sinvastatina apresentaram não só os parâmetros plasmáticos anteriores reduzidos, mas também CT, LDL-c e apo B, acompanhados pelo aumento do HDL-c (tabela 5).

Considerando um dos índices plasmáticos inflamatórios, a PCRus, a redução desta após o uso de Pioglitazona foi de 12 %, enquanto a redução após tratamento com Pioglitazona+Sinvastatina foi de 65 % em relação ao valor inicial (tabela 6; figura 29).

**Tabela 6.** Parâmetros lipídicos e glicêmicos plasmáticos de pacientes com DAC/SMet antes e após tratamento com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina.

PACIENTES DAC/SMET						
	PIOGLITAZONA			PIOGLITAZONA+SINVASTATINA		
	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>p</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>p</i> <sup>#</sup>
<b>PCRus (mg/l)</b>	5,30±3,5	2,97±1,21	0,008	5,62±2,40	1,9±0,65	<0,001



**Figura 29.** Variação basal de PCRus plasmática dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina.

## CÉLULAS E BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS TECIDUAIS

As porcentagens médias de área positiva para as células e as citocinas quantificadas a partir da técnica de imuno-histoquímica são apresentadas nas próximas figuras. Valores encontrados para o grupo de valvopatas foram incluídos nos gráficos para comparação. Na tabela 7, a seguir, são apresentadas as porcentagens médias de células inflamatórias encontradas nas amostras de TAE dos grupos estudados.

**Tabela 7.** Células inflamatórias em TAE de valvopatas e portadores de DAC/SMet.

	VALVAR N=20	PACIENTES DAC/SMET				P
		NÃO TRATADO N=17	PIO N=18	SINVA N=20	PIO+SINVA N=18	
Parâmetros (% média de área)						
<b>Macrófagos</b>	2,4±0,97	7,5±2,1	1,4±1,01	0,67±0,64	0,04±0,05	<0,001
<b>Linfócitos B</b>	0,10±0,13	0,43±0,29	0,01±0,02	1,56±1,11	0,01±0,02	<0,001
<b>Linfócitos T</b>	4,2±2,2	7,5±2,65	0,35±0,26	9,07±1,75	0,02±0,01	<0,001

Valores: média±desvio padrão.

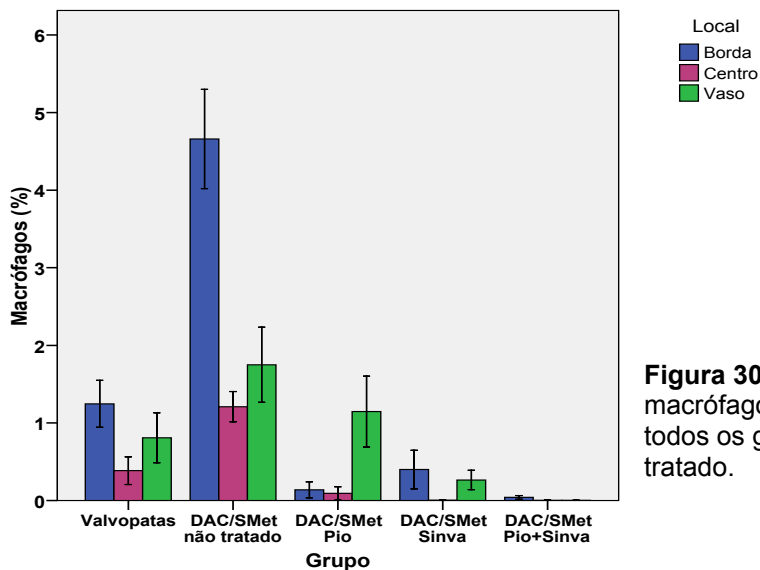
p = nível de significância obtido da comparação entre os pacientes DAC/SMet através de ANOVA. A comparação entre os tratamentos foi realizada através da aplicação de teste de Bonferroni e é detalhada no texto.

A quantidade de macrófagos foi significativamente reduzida no TAE após os tratamentos com Sinvastatina, Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina em relação ao grupo não tratado ( $p < 0,001$ ), especialmente no centro das amostras analisadas (figura 30). A

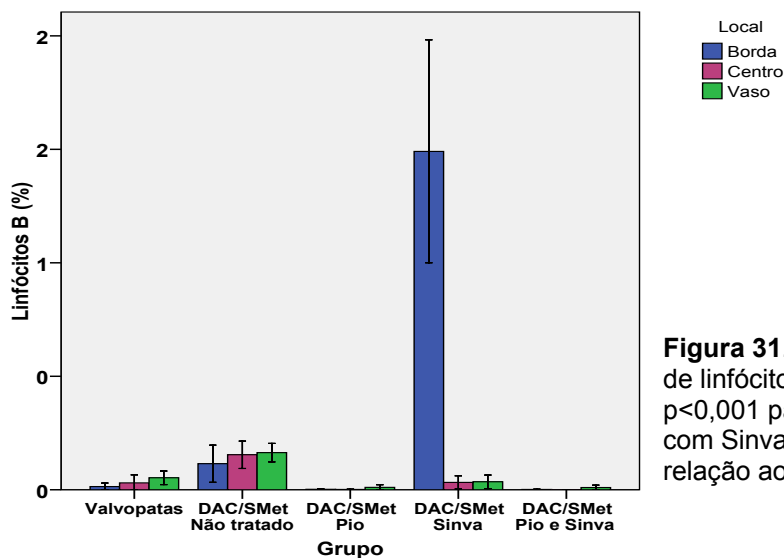
porcentagem de macrófagos em TAE após monoterapia com Pioglitazona foi semelhante aos valores encontrados nos valvares ( $p=0,05$ ).

Os linfócitos B mostraram-se reduzidos nas amostras dos pacientes tratados com Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina, embora nesses grupos não se tenha alcançado significância estatística (figura 31). A quantidade de linfócitos T foi significativamente reduzida no tecido após uso de Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina ( $p<0,001$ ) (figura 32). Nos valvares, a porcentagem de linfócitos B e T em TAE diferenciou-se dos pacientes DAC/SMet, independente do tratamento ( $p<0,001$ ).

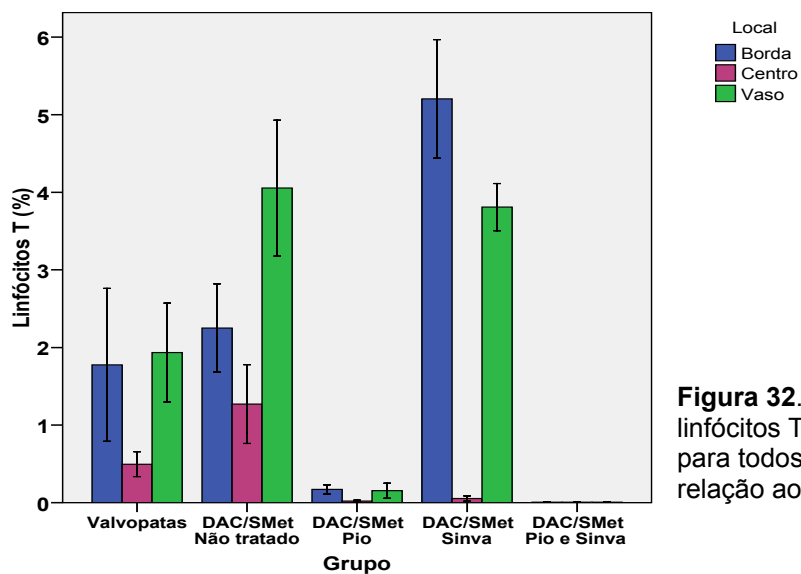
Observa-se redução de linfócitos T ou B no centro das amostras de tecido após tratamento com Sinvastatina e um grande volume dos mesmos linfócitos concentrado nas bordas das amostras, formando verdadeiros aglomerados inflamatórios restritos àquele local (figuras 31, 32 e 38). O tratamento combinado foi o que se mostrou mais efetivo, em relação aos demais, nas reduções das células inflamatórias em TAE.



**Figura 30.** Porcentagem de macrófagos em TAE.  $p < 0,001$  para todos os grupos em relação ao não tratado.



**Figura 31.** Porcentagem de linfócitos B em TAE.  $p < 0,001$  para o tratamento com Sinvastatina em relação ao não tratado.



**Figura 32.** Porcentagem de linfócitos T em TAE.  $p < 0,001$  para todos os grupos em relação ao não tratado.



Na tabela 8, a seguir, são apresentadas as porcentagens médias de biomarcadores inflamatórios encontrados nas amostras de TAE dos grupos estudados.

**Tabela 8.** Biomarcadores inflamatórios em TAE de valvopatas e portadores de DAC/SMet.

Parâmetros (% média de área)	VALVAR N=20	PACIENTES DAC/SMET				P
		NÃO TRATADO N=17	PIO N=18	SINVA N=20	PIO+SINVA N=18	
<b>IL6</b>	4,8±1,05	15,73±2,26	4,56±0,96	13,74±1,65	4,03±1,01	<0,001
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	5,3±0,7	21,57±3,6	3,53±0,7	9,2±1,9	2,6±,57	<0,001
<b>Leptina</b>	2,8±0,8	10,4±1,41	1,73,0±0,7	4,2±1,7	0,3±0,30	<0,001
<b>Resistina</b>	1,64±1,1	8,48±1,9	0,33±0,3	4,2±1,06	1,2±0,87	<0,001
<b>Adiponectina</b>	25,7±3,3	10,89±0,5	16,01±0,45	14,54±0,39	14,37±2,27	<0,001

IL6 = interleucina 6; TNF $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa.

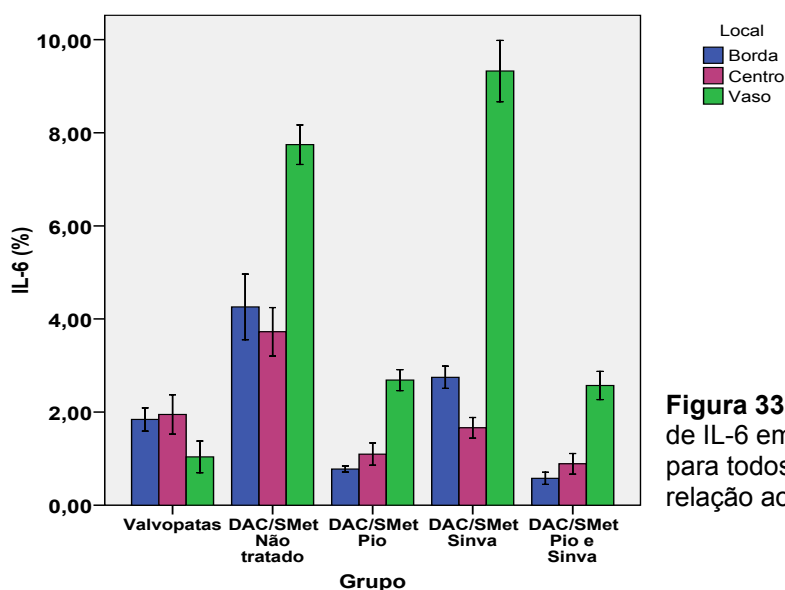
Valores: média±desvio padrão.

p = nível de significância obtido da comparação dos pacientes DAC/SMet através de ANOVA. A comparação entre os tratamentos foi realizada através da aplicação de teste de Bonferroni e é detalhada no texto.

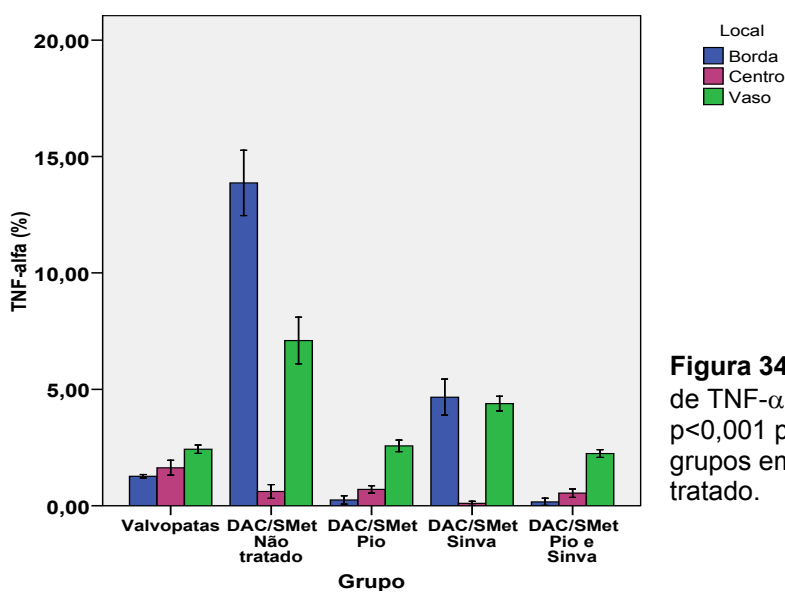
As citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$ , leptina, resistina tiveram seus índices diminuídos no tecido adiposo independente do tratamento (p<0,001), concomitantemente ao aumento da citocina anti-inflamatória adiponectina (p<0,001), em relação ao grupo não tratado.

A porcentagem de IL6 em TAE dos pacientes DAC/SMet não tratados e após o uso de Sinvastatina diferenciou-se daquela encontrada nos pacientes valvares (p<0,001 para ambos); a quantidade de TNF $\alpha$ , leptina e adiponectina em tecido adiposo de todos os pacientes DAC/SMet foi diferente em comparação à dos valvares (respectivamente p<0,04;

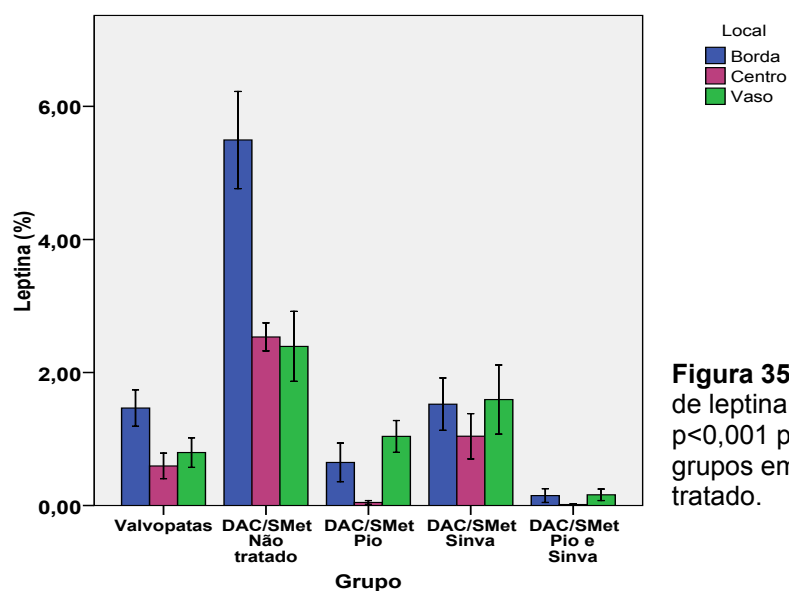
$p < 0,03$  e  $p < 0,001$ ). A porcentagem média de área com resistina nos pacientes com DAC/SMet tratados com terapia combinada se assemelhou aos valores encontrados para os pacientes valvares ( $p = 1,00$ ).



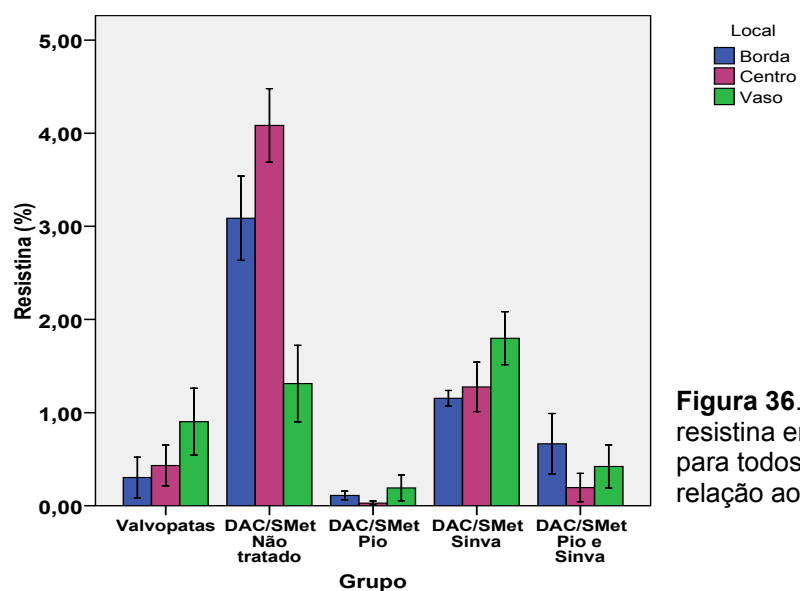
**Figura 33.** Porcentagem de IL-6 em TAE.  $p \leq 0,001$  para todos os grupos em relação ao não tratado.



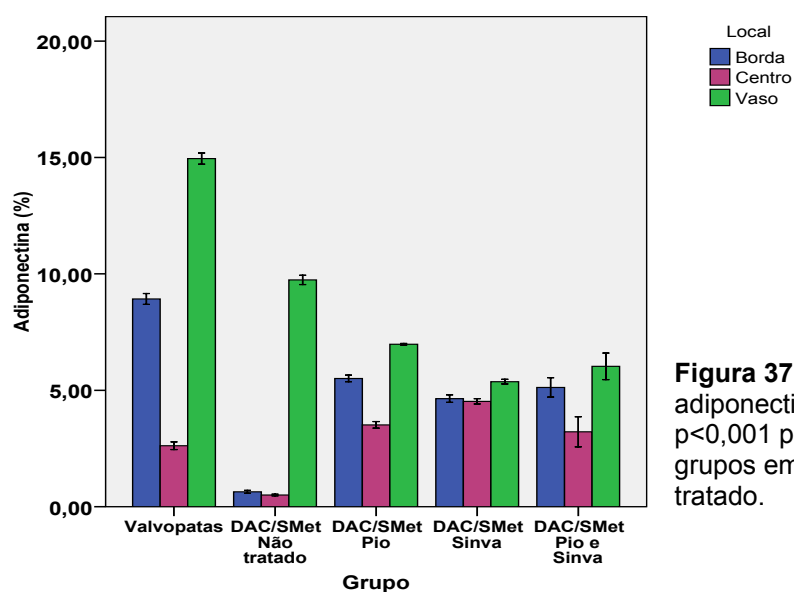
**Figura 34.** Porcentagem de TNF- $\alpha$  em TAE.  $p < 0,001$  para todos os grupos em relação ao não tratado.



**Figura 35.** Porcentagem de leptina em TAE.  $p < 0,001$  para todos os grupos em relação ao não tratado.



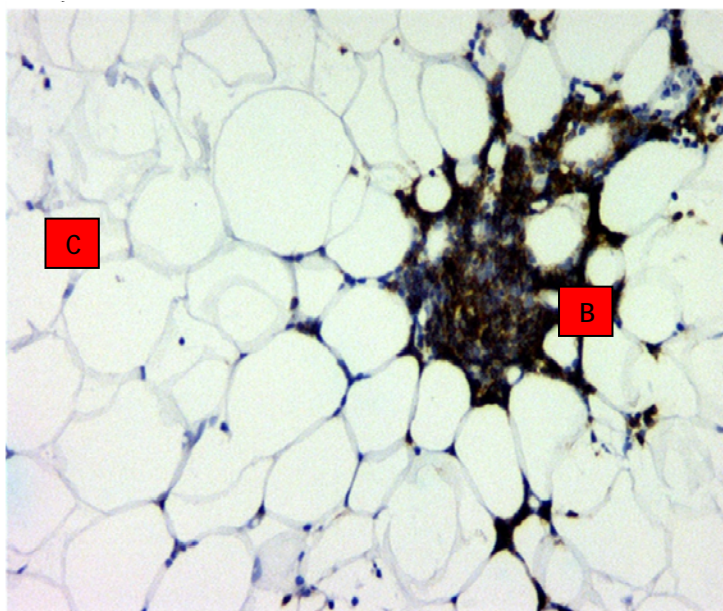
**Figura 36.** Porcentagem de resistina em TAE.  $p < 0,001$  para todos os grupos em relação ao não tratado.



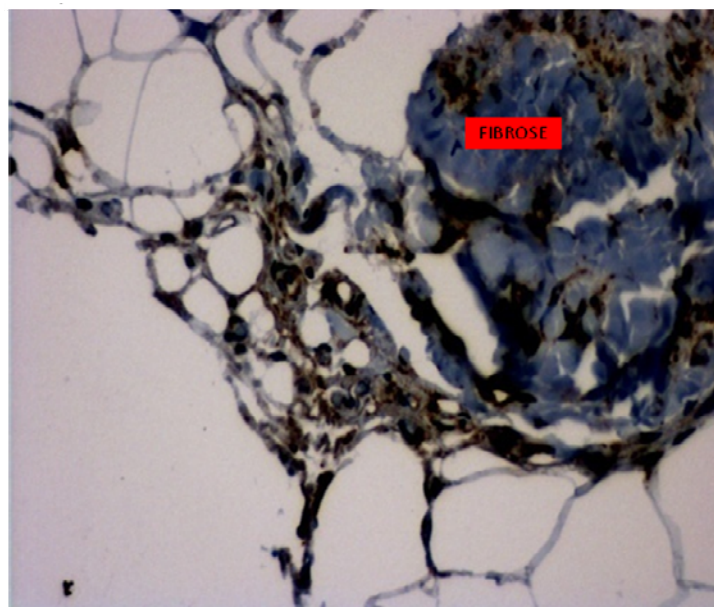
**Figura 37.** Porcentagem de adiponectina em TAE.  $p < 0,001$  para todos os grupos em relação ao não tratado.

O uso de Sinvastatina diminuiu a presença de citocinas no centro das amostras de gordura, tendendo a maior concentração nas proximidades dos vasos sanguíneos (figura 38).

Nas biópsias de TAE de pacientes alocados no grupo não tratado, as células inflamatórias encontraram-se esparsas entre as células adiposas em toda a amostra de tecido, enquanto os adipócitos apresentaram morfologia irregular, tendo sido identificadas áreas positivas para fibrose, como se observa em imagem de imuno-histoquímica (figura 39). Nessas mesmas biópsias, a porcentagem de área marcada com o anticorpo antiadiponectina foi menor. Inversamente, a porcentagem de área com a presença de macrófagos foi mais expressiva nesse grupo.



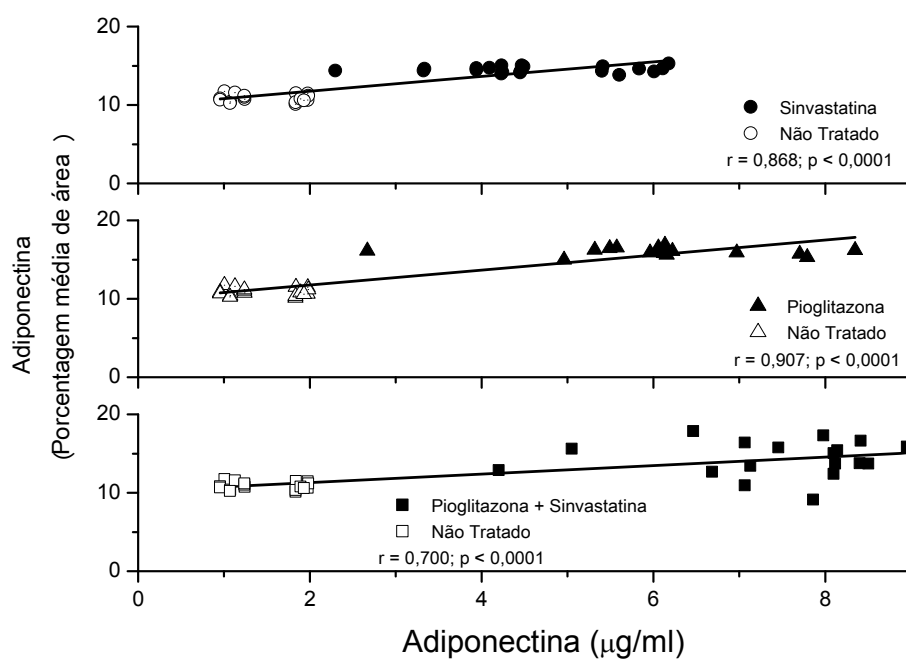
**Figura 38.** Foto de fragmento de TAE de paciente tratado com Sinvastatina após IMH. Note-se o foco de linfócitos T marcados (B=borda do corte) em contraste com os arredores (C=centro do corte) (200X).



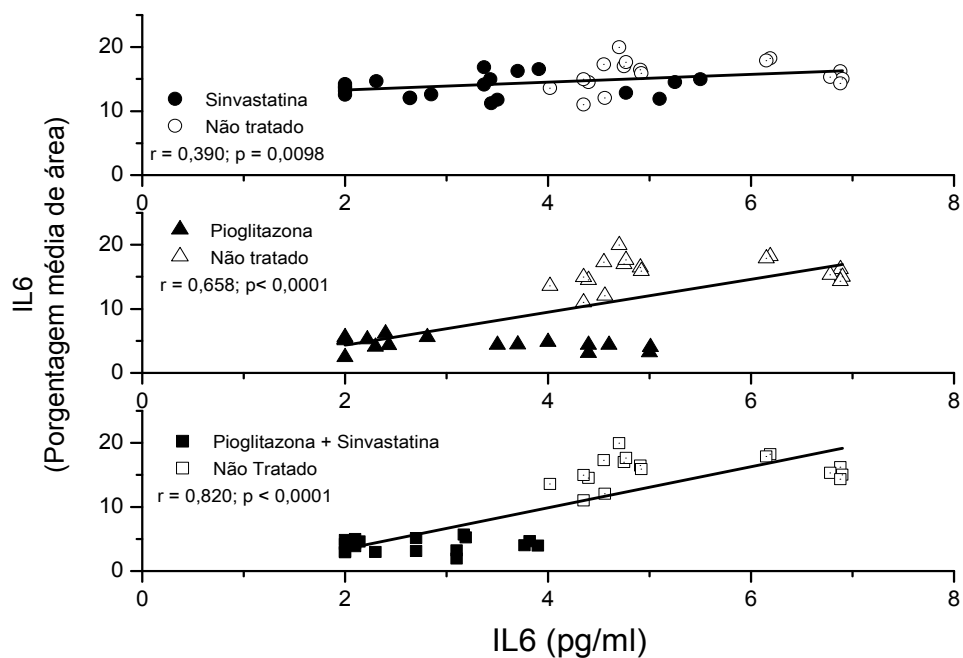
**Figura 39.** Foto de fragmento de TAE de paciente do grupo não tratado após IMH. Note-se a área de fibrose e a irregularidade nas dimensões e na morfologia dos adipócitos (200X).

## CORRELAÇÕES PLASMA-TECIDO

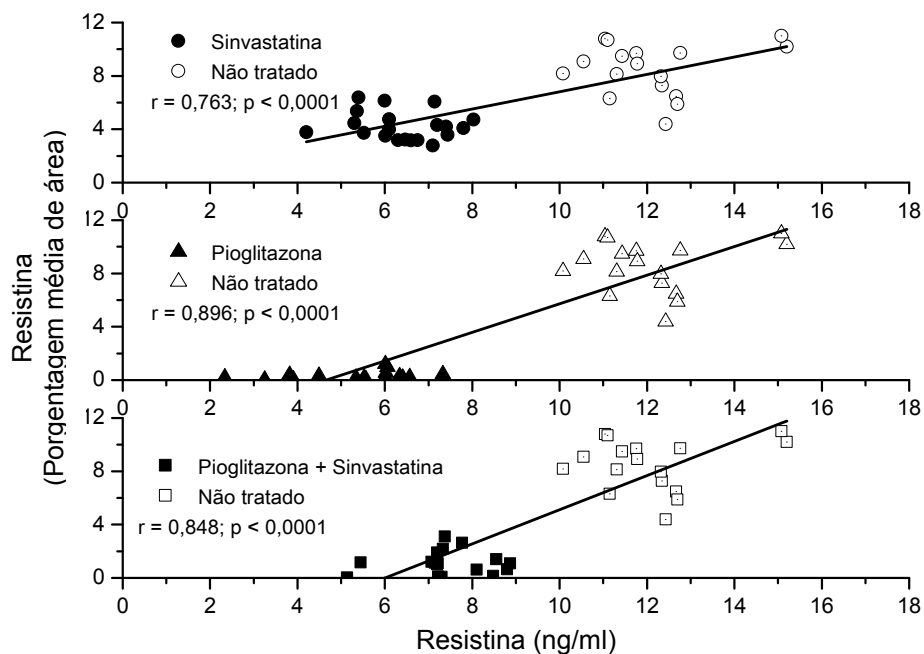
Foram encontradas correlações positivas entre as quantidades das citocinas plasmáticas IL-6, TNF- $\alpha$ , adiponectina, leptina e resistina e suas correspondentes em TAE sob tratamentos, exceto para o TNF- $\alpha$  após tratamento com Sinvastatina ( $r = -0,025$ ;  $p = 0,33$ ) e a leptina após tratamento com Pioglitazona ( $r = -0,877$ ;  $p < 0,0001$ ). Também foi encontrada correlação positiva entre os valores de PCRus plasmáticos e a porcentagem média de área com macrófagos em TAE de pacientes DAC/SMet tratados em relação ao grupo não tratado (figuras 40 a 45).



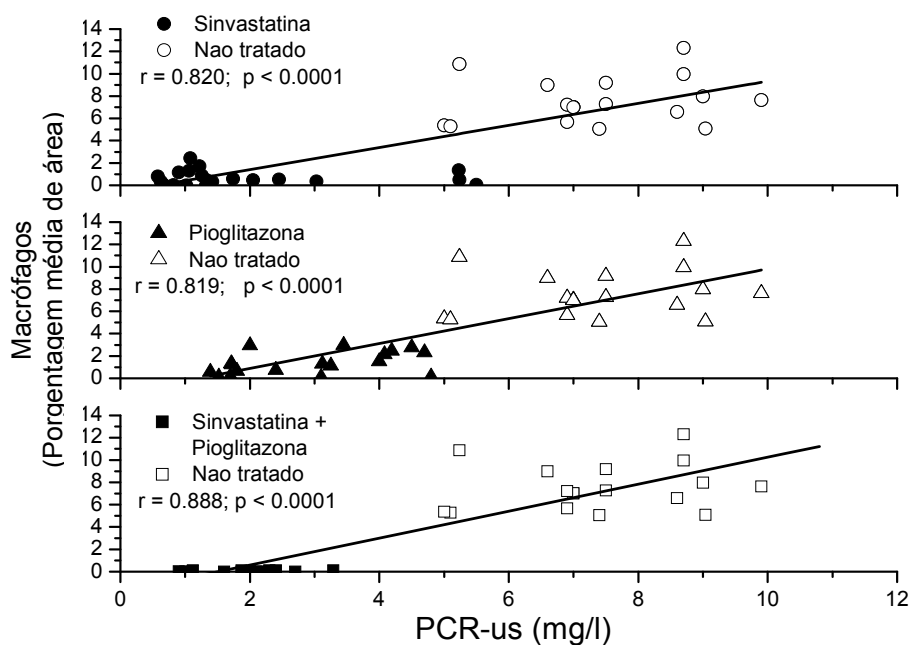
**Figura 40.** Correlação positiva entre a concentração de adiponectina plasmática e a porcentagem de macrófagos em TAE após tratamento com Simvastatina, Pioglitazona e terapia combinada de Simvastatina+Pioglitazona.



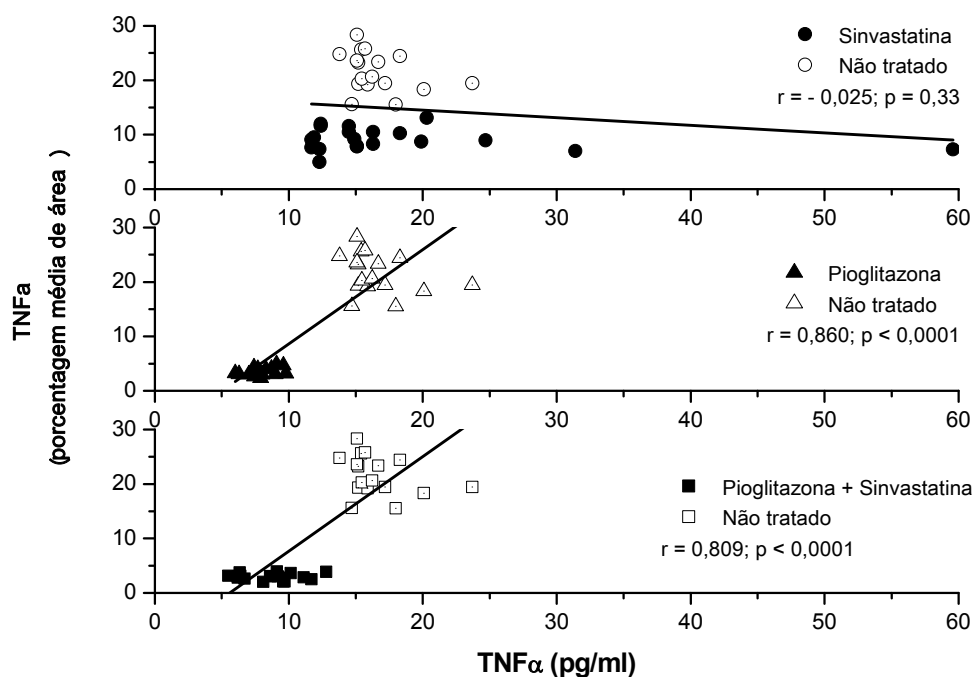
**Figura 41.** Correlação positiva entre a concentração de IL-6 plasmática e a porcentagem de IL-6 em TAE após tratamento com Simvastatina, Pioglitazona e terapia combinada de Simvastatina+Pioglitazona.



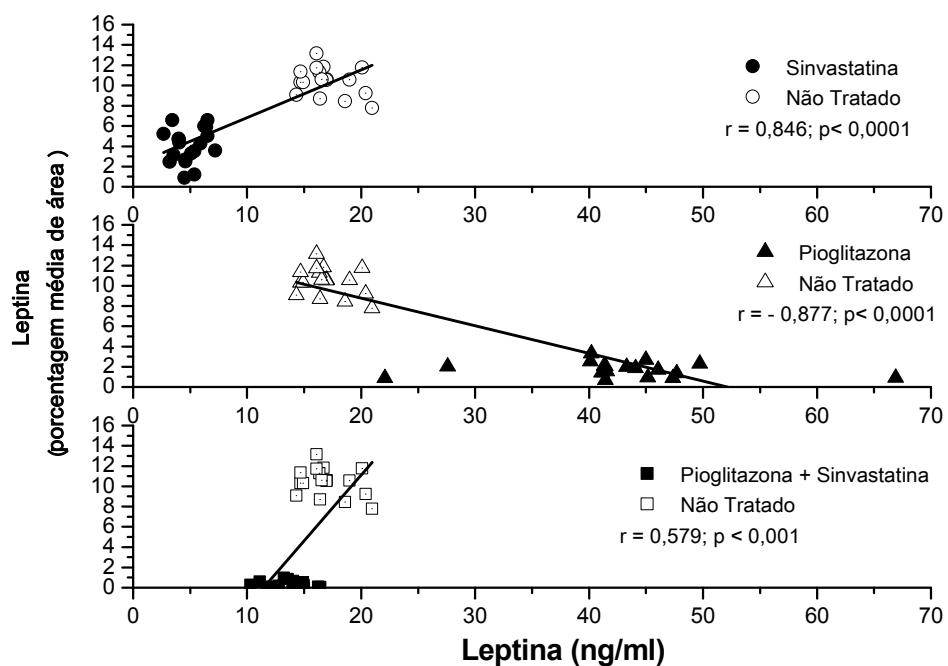
**Figura 42.** Correlação positiva entre a concentração de resistina plasmática e a porcentagem de resistina em TAE após tratamento com Sinvastatina, Pioglitazona e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona.



**Figura 43.** Correlação positiva entre PCRus plasmático e porcentagem de macrófagos em TAE mediante tratamento com Sinvastatina, Pioglitazona e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona.



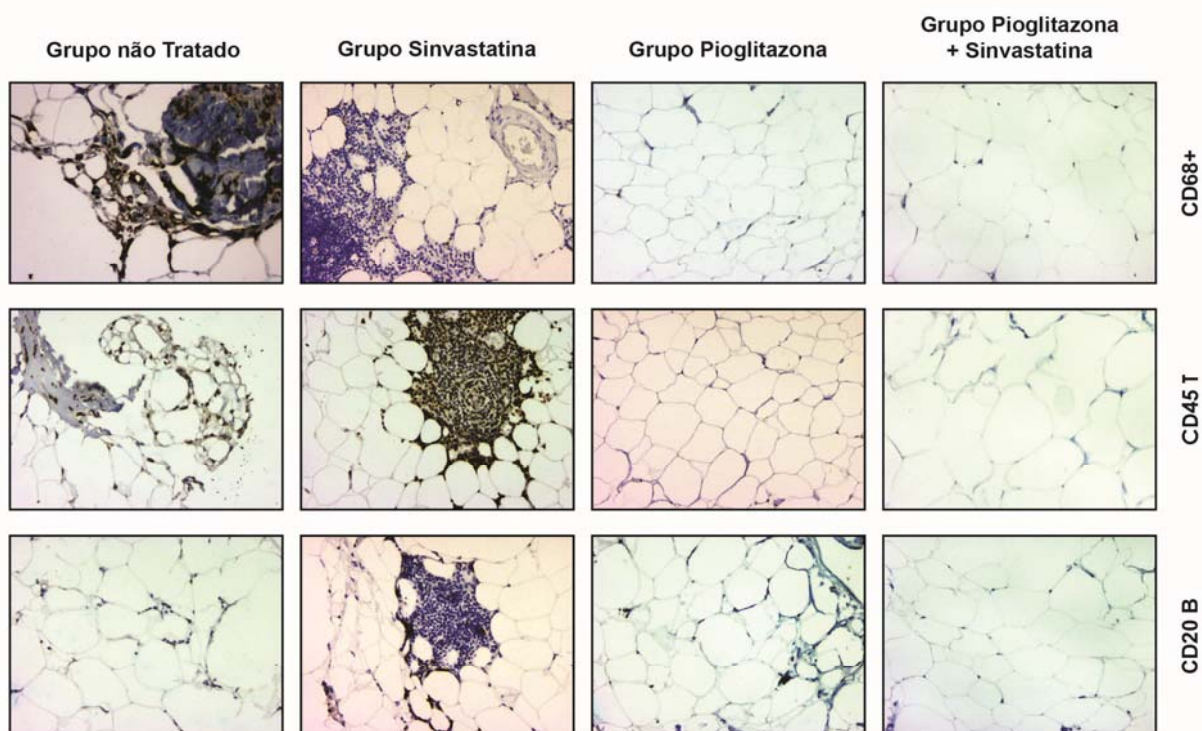
**Figura 44.** Correlação positiva entre a concentração de TNF- $\alpha$  plasmática e a porcentagem de TNF- $\alpha$  em TAE após tratamento com Pioglitazona e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona. Correlação negativa após tratamento com Sinvastatina.



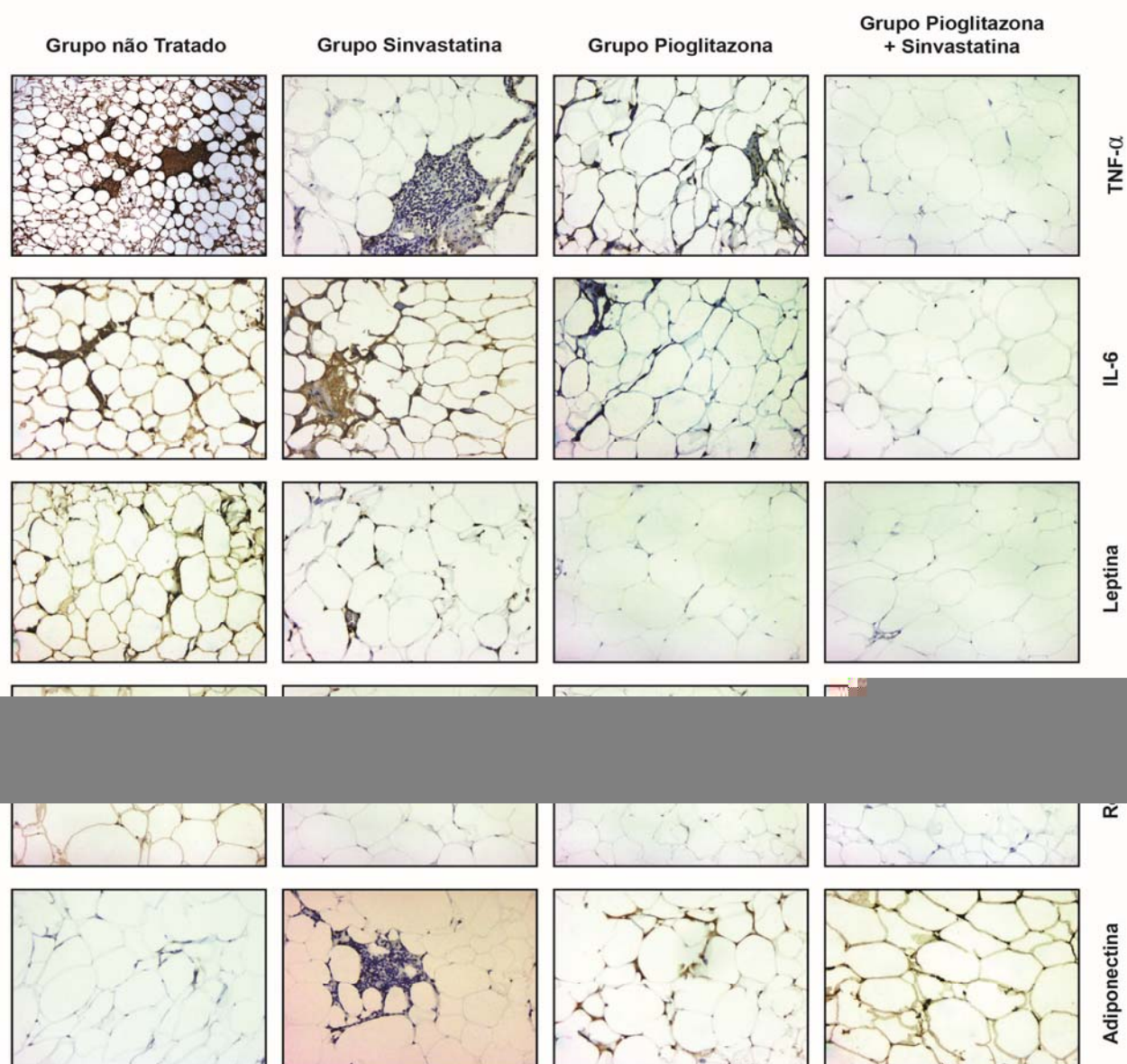
**Figura 45.** Correlação positiva entre a concentração de leptina plasmática e a porcentagem de leptina em TAE após tratamento com Sinvastatina e terapia combinada de Sinvastatina+Pioglitazona. Correlação negativa após tratamento com Pioglitazona.



As figuras 46 e 47 a seguir são fotos das preparações de imuno-histoquímica das células e citocinas inflamatórias nas amostras de TAE em pacientes não tratados e após os tratamentos com Sinvastatina, Pioglitazona e na combinação de ambos.



**Figura 46.** Presença de macrófagos, linfócitos B e T nas mostras de TAE submetidas a IMH de pacientes DAC/SMet após diferentes tratamentos comparadas ao grupo não tratado (200X). CD68+ = macrófagos; CD45 = linfócitos T; CD20 = linfócitos B.



**Figura 47.** Presença de citocinas em amostras de TAE submetidas a IMH de pacientes DAC/SMet após diferentes tratamentos comparadas ao grupo não tratado (200X).

---

# Discussão

## DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar possíveis correlações entre a presença de citocinas inflamatórias plasmáticas *versus* teciduais e a resposta de ambas à terapia medicamentosa. Para tanto, procedeu-se a uma monoterapia com Sinvastatina ou Pioglitazona e a uma terapia combinada Pioglitazona+Sinvastatina, com acompanhamento das variáveis lipídicas, glicêmicas e inflamatórias sistêmicas, células e citocinas inflamatórias em TAE de pacientes portadores de DAC e SMet. Os resultados mostraram que a infiltração de macrófagos e a presença de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina e resistina, foram reduzidas em TAE de pacientes DAC/SMet após monoterapia com Pioglitazona. Os pacientes tratados apenas com Sinvastatina apresentaram os menores valores plasmáticos de leptina, resistina e MCP-1, e aqueles tratados com Pioglitazona+Sinvastatina apresentaram os menores valores plasmáticos de IL-6, TNF- $\alpha$ , resistina, ADMA e MMP-9 em comparação com o grupo de pacientes não tratados. A terapia combinada revelou ainda a mais alta concentração de adiponectina plasmática concomitante ao menor valor de PCRus. Esses achados não só revelaram a condição plasmática como se correlacionaram positivamente com a condição tecidual mostrada pela porcentagem média de área ocupada por macrófagos no TAE e pela quantidade de PCRus presente no plasma após os tratamentos. Nos pacientes tratados com Sinvastatina, os

fragmentos de TAE apresentaram agregados de linfócitos T, B e macrófagos concentrados na borda e ao redor de vasos sanguíneos.

Por se tratar de um desenho não-randomizado, procurou-se obedecer estritamente aos critérios de inclusão e exclusão propostos, o que se refletiu nos resultados obtidos. Ficaram patentes as diferenças entre a amostra de pacientes portadores de DAC e SMet e a de indivíduos valvopatas quanto a sexo, idade, PAS, PAD, circunferência da cintura e peso no início e ao final da participação no protocolo de pesquisa. Com relação às variáveis plasmáticas, observou-se uma diferença significativa entre os dois grupos quando às dosagens médias finais de triglicérides, apo B, glicemia de jejum e HbA1c. Apenas quanto aos valores finais de colesterol total, LDL-c e HDL-c não se encontrou uma diferença relevante. Valores de IL-6 e TNF- $\alpha$  plasmáticos apresentaram-se elevados nos pacientes DAC/SMet não tratados em relação aos valvopatas, mas não chegaram a alcançar significância estatística.

Um resultado importante deste estudo foi a comprovação da presença de maiores quantidades de citocinas plasmáticas pró-inflamatórias, sobretudo resistina e leptina, nos pacientes com DAC/SMet em comparação com os valvopatas. Estudos anteriores<sup>76,77</sup> mostraram que a leptina potencializa a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-2 e -6, aumenta a geração e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e aumenta a expressão de MCP-1 em plasma. Demonstraram ainda que a leptina estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-aterogênicas derivadas de macrófagos que se acumulam em tecido adiposo, e que concentrações fisiológicas de leptina

estimulam a expressão de PCRus nos hepatócitos. Os autores observaram correlação entre os níveis de leptina e PCR plasmáticas. Qatanani e colaboradores<sup>20</sup>, trabalhando com camundongos modificados para geração de resistina a partir de macrófagos (“*humanized resistin mice*”), verificaram que, após dieta rica em gordura, os animais rapidamente desenvolveram alteração de parâmetros metabólicos (níveis alterados de TG, ácidos graxos, glicerol, glicose e insulina), inflamação em tecido adiposo branco (infiltração de macrófagos e expressão aumentada de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1) acompanhada de aumento na secreção de resistina e exacerbação da RI. Resultados semelhantes foram encontrados em TAE e plasma de portadores de Síndrome Coronariana Aguda comparados com pacientes com DAC<sup>79</sup>. A leptina revelou-se um importante modulador da função de células T encontradas em tecido adiposo<sup>79</sup> e placas ateroscleróticas<sup>80</sup> de camundongos obesos com RI.

Os pacientes DAC/SMet, neste estudo, apresentaram quantidades mais elevadas de citocinas plasmáticas pró-inflamatórias, como já citado, acompanhadas de reduzida expressão de adiponectina, uma citocina anti-inflamatória. Para Kumada<sup>81</sup> e Pischon<sup>82</sup>, é clara a associação entre hipoadiponectinemia e DAC. Nesse caso, a adipocina seria um importante preditor de alto risco para a doença, já que, no plasma, ela se acumula em espaço subendotelial de artérias humanas injuriadas e atua como modulador endógeno antiaterosclerótico do remodelamento e reparo vascular<sup>83,84</sup>.

Outro resultado importante deste estudo foi a constatação da presença significativamente aumentada de MCP-1 no plasma, parâmetro diretamente ligado à existência de inflamação nos estágios iniciais do processo aterosclerótico. Os achados para citocinas inflamatórias, além de MCP-1 corroboram os dados encontrados em outras publicações<sup>39,20,85-88</sup>. Quanto aos níveis de PCRus, ADMA e MMP-9, não se verificaram diferenças entre os pacientes com DAC/SMet e os valvopatas.

Ainda neste estudo, quantidades significativamente elevadas de resistina, leptina, TNF- $\alpha$ , IL-6, além da população de macrófagos e linfócitos B e T, foram quantificadas nas amostras de TAE de pacientes portadores de DAC/SMet não tratados.

É de amplo conhecimento que o tecido adiposo é um órgão com múltiplos papéis metabólicos e que os adipócitos deixaram de ser meros agentes da lipogênese e da lipólise. O tecido adiposo é fundamental na manutenção da homeostase metabólica, visto que, na obesidade, os adipócitos hipertróficos e hiperplásicos sofrem alterações moleculares e, com isso, afetam o metabolismo sistêmico<sup>89</sup>. O tecido adiposo em indivíduos obesos revela-se altamente rico em proteínas pró-inflamatórias e facilita a infiltração de macrófagos que, por sua vez, contribuem para a expressão de genes relacionados à inflamação, perpetuando o ambiente protagonista de complicações relacionadas à obesidade: RI, DM2 e outras doenças de risco cardiovascular<sup>90</sup>.

Há uma série de estudos que consideram a influência local através da secreção de citocinas e mediadores inflamatórios do TAE e



células infiltradas a verdadeira influência sobre a aterogênese coronariana, especialmente acompanhada de obesidade visceral<sup>42,56,92-96</sup>. Estudos clínicos têm indicado forte correlação entre o TAE, gordura abdominal central e riscos associados à SMet e DM2<sup>93,42,97</sup>. Segundo Teixeira-Fernandes<sup>98</sup>, pacientes com o menor quartil de expressão de RNAm de adiponectina em TAE e níveis de adiponectina plasmática apresentaram número médio maior de características da SMet. Qatanani<sup>20</sup>, de sua parte, mostrou que a secreção de resistina por macrófagos infiltrados em tecido adiposo humano exacerba a inflamação local e contribui para o fenótipo de RI.

Dois outros importantes estudos chamaram a atenção para a importância da resposta inflamatória em TAE através da expressão de citocinas e de outras proteínas em indivíduos com doença coronariana. Na tentativa de compreender os papéis biológicos do TAE, um estudo realizado por Mazurek e colaboradores<sup>40</sup> comparou a expressão de fatores patogênicos entre o TAE e o tecido adiposo subcutâneo da região da coxa de pacientes com DAC submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica. Esses autores confirmaram a expressão gênica de níveis significativamente altos de IL-1, IL-6, MCP-1 e TNF- $\alpha$  em amostras de TAE, e verificaram que as propriedades pró-inflamatórias teciduais independem de variáveis clínicas como a presença de DM2, índice de massa corpórea, uso crônico de estatinas e anti-hipertensivos ou biomarcadores plasmáticos. Baker e colaboradores<sup>39</sup>, por sua vez, compararam a expressão de adipocinas em TAE de pacientes portadores de DAC com a expressão em

depósitos de tecido adiposo subcutâneo abdominal, omental e da coxa em pacientes sem DAC e sem DM2. Eles constataram que depósitos de gordura epicárdica apresentam alta expressão de RNAm para resistina e intensa infiltração macrofágica. As citocinas IL-6 e adiponectina, nas observações desses autores, tiveram expressão gênica significativamente mais baixa em TAE comparada aos demais locais na população de coronarianos.

Nesta pesquisa, observaram-se tanto macrófagos como linfócitos posicionados ao redor de adipócitos, acompanhados de aumento no volume de matriz extracelular, especialmente na borda dos fragmentos de TAE de pacientes DAC/SMet não tratados. As amostras de TAE caracterizaram-se não apenas pelo grau de infiltração macrofágica como também pela presença de focos com fibrose, já descritos por Sun e Scherer<sup>99</sup>. Um estudo posterior mostrou que o remodelamento é um processo único e contínuo do tecido adiposo no qual se observa resposta inflamatória orquestrada por macrófagos coexistindo com RI acelerada pelo estado obeso<sup>100</sup>. Outros descreveram macrófagos formando agregados celulares ao redor de adipócitos necróticos (*“crown-like structures: CLSs”*) em condição de obesidade<sup>101-105</sup>. Demonstrou-se que estímulos provenientes do microambiente onde se encontram os macrófagos dirigem o fenótipo dessas células a um determinado estado pró- ou anti-inflamatório, fenômeno denominado “polarização de macrófagos”. Mais recentemente, Hirata e colaboradores<sup>106</sup> mostraram que a aterosclerose coronariana está associada à polarização macrofágica em TAE. Os autores correlacionaram a severidade da DAC à existência de macrófagos pró-inflamatórios

(conhecidos como “classicamente ativados”) no TAE perivascular. Esses macrófagos seriam os responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$  e a proteína MCP-1.

Partindo-se assim da constatação de que o elo patofisiológico entre aterosclerose, obesidade e desordens metabólicas relacionadas com a deposição de gordura visceral é o processo inflamatório, intervenções terapêuticas com potencial anti-inflamatório, tanto em plasma como em tecido adiposo, foram investigadas e correlacionadas no presente trabalho.

Verificou-se que os portadores de DAC/SMet que utilizaram Sinvastatina, Pioglitazona ou Pioglitazona+Sinvastatina apresentaram boa tolerância às medicações e, portanto, adesão aos tratamentos. Ao final dos noventa dias de uso, observaram-se não apenas melhoras no perfil lipídico e/ou glicêmico como também mudanças significativas no perfil inflamatório. A magnitude das respostas obtidas revelou a extensão do benefício das medicações, já que não havia interferência de dieta e exercícios. A associação medicamentosa mostrou benefícios além da monoterapia.

Os pacientes que utilizaram Sinvastatina e Pioglitazona+Sinvastatina apresentaram, ao final do tratamento, as menores concentrações plasmáticas para LDL-c e apoB. Já os que utilizaram Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina obtiveram aumento na concentração plasmática de HDL-c e adiponectina, redução de MMP-9 e TNF- $\alpha$ . O menor índice médio de triglicérides foi encontrado nos pacientes com tratamento combinado. Os valores plasmáticos de PCRus, IL-6 e resistina foram reduzidos para qualquer terapia empregada. MCP-1 e leptina

foram reduzidas de forma significativa no grupo que utilizou Sinvastatina. Quanto à redução na concentração de linfócitos B, T e macrófagos em TAE, o tratamento combinado foi o que se mostrou mais efetivo. A quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , resistina, leptina) em TAE foi reduzida independentemente do tratamento, com concomitante aumento de adiponectina, a adipocina anti-inflamatória.

As estatinas ou inibidores da hidroximetil glutaril coenzima A redutase são conhecidas como uma das mais importantes classes de agentes redutores do colesterol. Além de prevenirem as consequências aterogênicas do LDL-c, apresentam efeitos pleiotrópicos amplos independentes da redução da LDL-c, incluídas propriedades imunomodulatórias e anti-inflamatórias<sup>63,107</sup>. Estatinas possivelmente influenciam um padrão anti-inflamatório via regulação de células T helper anti- e pró-aterogênicas<sup>108</sup> envolvendo atenuação da sinalização do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B).

Estudos *in vitro*<sup>109</sup> e *in vivo*<sup>110</sup> mostraram aumento da expressão de receptores e da atividade transcricional de PPAR $\alpha$  na presença de estatina, o que caracteriza efeito anti-inflamatório desta. Em pacientes com hiperlipidemia combinada<sup>111</sup> (LDL e TG elevados), os valores plasmáticos de PCRus foram significativamente reduzidos, em relação aos valores basais após terapia por seis semanas com Sinvastatina (20mg/d).

Os autores citados encontraram correlação significativa entre a redução dos níveis de PCRus e triglicérides plasmáticos, mas não observaram relação entre PCRus e os níveis de LDL-c séricos após a

terapia. Não foi encontrado efeito significativo da estatina sobre os níveis plasmáticos de IL-6. Em um estudo realizado em tecido adiposo de camundongos FVB/selvagem tratados com 40mg de Sinvastatina, níveis de RNAm de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram reduzidos pela terapia<sup>112</sup>.

As Tiazolidinedionas, através da ativação dos receptores PPAR $\gamma$ , regulam genes relacionados à diferenciação dos adipócitos, metabolismo lipídico e captação de glicose, contribuindo para efeitos metabólicos benéficos. No entanto, o conhecimento sobre a ação supressora de inflamação dos agonistas PPAR $\gamma$  em seres humanos é ainda limitada, especialmente em tecidos.

Uma pesquisa constatou que níveis plasmáticos de PCR-us foram reduzidos em pacientes DAC não-diabéticos sob ação de Rosiglitazona<sup>113</sup>. Em outro estudo clínico controlado<sup>114</sup>, pacientes diabéticos utilizando Pioglitazona foram comparados com aqueles em uso de Glimepiride. Marcadores inflamatórios foram quantificados no plasma após um período de 6 meses. No braço Pioglitazona, verificaram-se reduções da PCRus, de MMP-9 e MCP-1 concomitantes ao aumento de adiponectina sérica.

Outros dois trabalhos<sup>115,116</sup> sugeriram que os mecanismos de ação do PPAR $\gamma$  independem de ligações diretas com as regiões responsivas do DNA, e que promovem repressão de NF- $\kappa$ b e consequente redução da transcrição de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, metaloproteinases e outras proteínas envolvidas na patogênese da aterosclerose. No estudo PIOSTAT<sup>54</sup>, 125 pacientes não-diabéticos de alto

risco cardiovascular, com e sem SMet e níveis elevados de PCRus foram randomizados para monoterapia com Sinvastatina ou Pioglitazona e terapia combinada com ambas as drogas. Segundo os autores, Pioglitazona apresentou efeitos anti-inflamatórios aditivos a Sinvastatina ao reduzir significativamente a PCRus. MMP-9 foi reduzida com a monoterapia de Pioglitazona. Resultados do estudo PROactive-14 demonstraram que o tratamento com Pioglitazona também complementa as ações das estatinas no controle dos triglicérides e das HDL-c<sup>117</sup>.

Na presente pesquisa, verificou-se ganho de peso em torno de 1,5 Kg por paciente em três meses após tratamento com Pioglitazona e somente quatro pacientes de difícil controle glicêmico, que utilizaram Metformina e Insulina, apresentaram edema. Nesto e colaboradores<sup>118</sup> confirmam que o edema é mais pronunciado em pacientes que fazem associação medicamentosa para melhor controle glicêmico.

Ainda é discutível se o aumento do peso em pacientes em uso de Glitazonas se deve ao edema ou ao aumento de tecido adiposo. Efeitos colaterais das Glitazonas incluem ganho de peso, um efeito dose-dependente, com ganho ponderal de 3,5 a 4 Kg após uso de Pioglitazona na dose de 30 a 45 mg/dia e edema verificado geralmente em 3 a 5 % dos casos, devido ao aumento de volume plasmático. Neste estudo não foram verificados outros efeitos colaterais, seja para Sinvastatina ou para Pioglitazona. É possível que as doses utilizadas ou o tempo de uso não tenham sido suficientes para induzir tais efeitos.

Na literatura recente, determinados agentes anti-hipertensivos são citados por atuarem no controle de marcadores inflamatórios em pacientes DAC com e sem SMet<sup>119-123</sup>. Como no atual trabalho os pacientes com DAC/SMet mantiveram terapêutica anti-hipertensiva, convém ressaltar que tais agentes podem ter influenciado os resultados deste protocolo. Contudo, a melhora dos índices inflamatórios plasmáticos quanto teciduais foi obtida nos pacientes com DAC/SMet do grupo sob tratamento com Sinvastatina e/ou Pioglitazona em relação ao grupo que permaneceu apenas com medicação anti-hipertensiva (grupo não-tratado).

Um resultado digno de destaque obtido neste estudo foi a correlação entre biomarcadores inflamatórios plasmáticos e em TAE de pacientes DAC/SMet sob terapias com Sinvastatina, Pioglitazona e Pioglitazona+Sinvastatina comparadas à ausência dos tratamentos. Foram encontradas correlações positivas entre as quantidades das citocinas plasmáticas IL-6, TNF- $\alpha$ , adiponectina, leptina e resistina e as suas correspondentes em TAE sob os três tratamentos. Somente TNF- $\alpha$  após tratamento com Sinvastatina e leptina após tratamento com Pioglitazona não mostraram correlação significativa entre plasma e TAE. A secreção de determinadas citocinas, incluindo a leptina, e suas respostas à ação de Pioglitazona é tecido adiposo dependente. Diferenças nos depósitos de gordura foram observadas, assim como a responsividade dos depósitos ao tratamento com tiazolidinedionas<sup>124,125</sup>. Além disso, há evidências de que as glitazonas induziram alterações traducionais e pós-traducionais que elevaram os níveis proteicos sem aumentar os níveis de RNAm<sup>126</sup>. Dessa

forma, o aumento nos níveis plasmáticos de leptina podem ser explicados pela secreção realizada através de adipócitos do tecido adiposo subcutâneo, como mostrado por Phillips e colaboradores<sup>125</sup>.

Também foi encontrada correlação positiva entre os valores de PCRus plasmáticos e a porcentagem média de área com macrófagos em TAE. Associações entre aumento de PCRus e correspondente elevação de citocinas inflamatórias em plasma e tecido adiposo de indivíduos obesos há muito tempo são sugeridas em estudos como ATTICA<sup>127</sup> e AVENA<sup>128</sup>, porém, sem que correlações tenham sido verificadas após terapêutica.

Aspecto intrigante foi observado nos fragmentos de TAE dos pacientes DAC/SMet tratados com Sinvastatina em que linfócitos B, T e macrófagos se acumularam especialmente na borda e ao redor de vasos sanguíneos, formando verdadeiros agrupamentos ou acúmulos dessas células, enquanto o centro da amostra permanecia livre delas. Verificou-se o oposto na amostra de gordura retirada de pacientes não tratados, na qual foram encontradas células e citocinas inflamatórias espalhadas por toda a área tecidual ao redor dos adipócitos semelhante à descrição “*crown-like structures*”. Sugere-se que tais acúmulos sejam órgãos linfoides terciários e que tenham sido organizados a partir de acúmulos de células linfoides em situação de inflamação crônica. A produção de citocinas inflamatórias e/ou a expressão de quimocinas estimula a neogênese celular linfoide, além dos nódulos linfoides durante a inflamação, a aumentar o fluxo sanguíneo local e a viabilizar a migração de linfócitos T e B. Alguns autores enfatizam que



terapias clínicas podem reverter os agrupamentos de células inflamatórias<sup>129-131</sup>.

A aterosclerose, inicialmente caracterizada como uma doença de retenção lipídica envolve, na verdade, uma resposta inflamatória crônica subclínica. As novas descobertas da ciência básica evidenciaram o papel fundamental da inflamação nas diferentes fases do processo aterosclerótico. Os recentes avanços fornecem importantes elos entre a biologia da inflamação, os mecanismos aterogênicos e os riscos cardiometabólicos relacionados à doença. A elevação dos níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos tem alto valor preditivo para pacientes portadores de Síndromes Coronarianas independentemente dos danos miocárdicos, além de fortalecer a informação prognóstica fornecida por fatores de risco tradicionais. É nesse contexto que determinados tratamentos reduzem o risco coronariano por limitarem a progressão da inflamação<sup>132</sup>.

Assim, os novos conceitos sobre a inflamação na Aterosclerose, especialmente associada à Síndrome Metabólica, não somente ajudam a compreender melhor a patofisiologia da doença, como também têm aplicações práticas clínicas na estratificação de risco e na seleção de terapia para essa doença de importância mundial.

## LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente estudo tem limitações que devem ser enfatizadas:

1. Não foram realizadas coletas de sangue antes do início do tratamento com Sinvastatina, o que impossibilitou a comparação com os valores pós-tratamento dos mesmos pacientes. A grande maioria dos pacientes com DAC em tratamento no InCor HCFMUSP foi selecionada a partir da fila cirúrgica e já utilizava alguma estatina para controle da dislipidemia.
2. Não foi estabelecida uma dosagem única do medicamento utilizado em cada grupo de estudo: para os pacientes que utilizaram Sinvastatina em monoterapia, as dosagens podiam ser de 10 ou 20 mg/d, e para os que utilizaram Pioglitazona, podiam ser de 15 ou 30 mg/d. A composição dos grupos de estudo considerou as necessidades clínicas de cada paciente.
3. Os valores iniciais de glicemia (antes do tratamento) entre os pacientes com DAC/SMet dos diferentes grupos variaram. Os pacientes diabéticos (alocados nos grupos com pioglitazona) iniciaram o estudo com altos níveis glicêmicos, diferentemente dos demais, alocados no grupo controle ou Sinvastatina, que apresentaram RI ou valores normais para a glicose plasmática.

---

# Conclusões

## CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados deste estudo, tomados em conjunto demonstraram que, em pacientes com DAC e SMet, os tratamentos com Sinvastatina, Pioglitazona ou ambos podem reduzir substancialmente os marcadores pró-inflamatórios plasmáticos e teciduais. Em especial, a terapia combinada Pioglitazona + Sinvastatina apresentou efeitos pleiotrópicos mais abrangentes, pois, além de reduzir citocinas pró-inflamatórias, concomitantemente e de forma expressiva em plasma e em tecido adiposo epicárdico, aumentou adiponectina, uma citocina anti-inflamatória. Considerando que o elo patofisiológico entre aterosclerose e as desordens metabólicas relacionadas com a deposição de gordura visceral é o processo inflamatório, intervenções terapêuticas com potencial anti-inflamatório tanto em plasma como em tecido adiposo são capazes de modificar a patogênese da aterosclerose e diminuir o risco cardiovascular.

---

# Anexos

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M  F

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

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : .....SEXO: M  F

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

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

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

---

**DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

**“Ação de pioglitazona e sinvastatina no controle da inflamação em tecido adiposo epicárdico”**

PESQUISADOR: **Dr. Protásio Lemos da Luz**

CARGO/FUNÇÃO: **Diretor da Unidade Clínica de Aterosclerose – INCOR HCFMUSP**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL **Nº 12811**

UNIDADE DO HCFMUSP: **INCOR**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **3 anos**

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

Com esta pesquisa temos a intenção de ver se a gordura instalada ao redor do coração produz inflamação e se dois remédios (Sinvastatina e Pioglitazona) ajudam a aliviar esta inflamação, diminuindo as consequências das doenças coronariana e cardíaca. A participação será tanto de homens como de mulheres. Os pacientes convidados para participarem da pesquisa são os que apresentam doença das válvulas cardíacas ou doença das artérias coronárias e que terão avaliados também pressão sanguínea, medida da cintura, análise de gorduras sanguíneas (colesterol e triglicérides) e quantidade de açúcar no sangue (glicemia). Os grupos de pacientes serão medicados (com Sinvastatina, Pioglitazona ou fazer tratamento convencional para a doença cardíaca) 90 dias antes da cirurgia.

Antes do início da cirurgia para a colocação de ponte de safena ou colocação de válvula cardíaca, amostras de sangue serão coletadas por punção venosa para análise. Durante a cirurgia, quando o coração estiver exposto, serão retirados dois pequenos pedaços (juntos pesam 1 grama) de gordura localizada em volta do coração, ao lado da artéria coronária. As amostras serão levadas para o laboratório e analisadas se apresentam ou não inflamação.

Não há desconforto e/ou risco adicional para o paciente. Os resultados desta pesquisa contribuirão para um maior conhecimento do mecanismo inflamatório das Doenças das Artérias Coronárias.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr **Protásio Lemos da Luz**, que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 – Cerqueira César – São Paulo (SP) Telefone(s): 3069.5447 ou 3069.5241. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br)

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

O participante tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

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

O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo *“Ação de pioglitazona e sinvastatina no controle da inflamação em tecido adiposo epicárdico”*

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

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

-----  
Assinatura do paciente/representante legal

Data    /   /   

-----  
Assinatura da testemunha

Data    /   /   

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

*(Somente para o responsável do projeto)*

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

-----  
Assinatura do responsável pelo estudo

Data    /   /



---

# **Referências Bibliográficas**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lima, FB. Tecido adiposo: uma breve perspectiva histórica e o momento atual. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2008; 52(6): 927-28.
2. Kennedy GC. Hypothalamic obesity. *Proc Royal Soc Med.*, 1966;153:1276-7.
3. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-31.
4. Ahima RS. Central actions of adipocyte hormones. *TEM*. 2005;16:307-13.
5. Gusik TJ, Marvar PJ, Czesnikiewicz-Guzik M, Korbut R. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58:591-610.
6. Gesta S; Tseng YH; Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, 2007; 131:242-256.
7. Fonseca-Alaniz MH; Takada J; Alonso-Vale MIC; Bessa Lima F. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2006;50/2:216-229.
8. Cook A and Cowan C. Adipose Tissue (March 31, 2009) StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/103824/stembook 1401. <http://www.stembook.org>
9. Thalmann S and Meir CA. Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovascular Research*, 2007; 75: 690–701.

10. Volp AC, Alfenas RC, Costa NMB, et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008, vol.52, n.3, 537-549.
11. Kershaw EE and Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004; 89: 2548 - 2556.
12. Scherer PE. From Lipid Storage Compartment to Endocrine Organ. *Diabetes*, 2006; 55: 1537-1545.
13. Feldmann M and Oppenheim JJ. Introduction to the role of cytokines in innate host defense and adaptive immunity; *Citokyne*, 2001:3–20.
14. Gerszten RE, Mach F, Sauty A, Rosenzweig A, Luster AD. Chemokines, leukocytes, and atherosclerosis. *J Lab Clin Med*, 2000;136:87–92.
15. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 461S-465S.
16. Rexford SA, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy. *Balance Molecular Endocrinology*, 2008; 22: 1023-1031.
17. DeLuca C, Jerrold M. Inflammation and insulin resistance. Olefsky *FEBS Letters*, 2008; 582: 97-105.
18. Rajala MW, Qi Y, Patel HR et al. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes*, 2004; 53: 1671-1679.
19. Sheng CH, Di J, Jin Y et al. Resistin is expressed in human hepatocytes and induces insulin resistance. *Endocrine*, 2008; 135-143.

20. Qatanani M, Szwegold NR, Greaves DR, et al. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009; 119: 531-539.
21. Hajer GR, Timon W, Haeflén V et al. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes and vascular diseases. *European J. Heart J.*, 2008; 29: 2959-2971.
22. Seth S, Martin BS, Atif Qasim MD et al. Leptin resistance – A possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related Cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2008; 52(15):7-20.
23. Frubeck G. Intracellular signaling pathways activated by leptin. *Biochem J*, 2006; 393:7-20.
24. Greenberg AS and Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83: 461S-465S.
25. Hug C and Lodish H. The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005; 5: 129-134.
26. Whitehead JP, Richards AA, Hickman IJ, et al. Adiponectin – a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 2006; 8(3): 264-280.
27. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.

28. Araújo RG, Casella Filho A, Galvão TFG, et al. Dislipidemia, Inflamação e Aterosclerose. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2005; 6:470-476
29. Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory Markers and the Metabolic Syndrome – Insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1978-1985.
30. Hoogeveen RC, Ballantyne CM. C-reactive protein and atherosclerosis. *Lipid Disorders Updates*. 2003;3:1-8.
31. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105: 1135-1143.
32. Moreno PR, Murcia AM, Palacios IF, et al. Coronary Composition and Macrophage Infiltration in Atherectomy Specimens From Patients With Diabetes Mellitus. *Circulation*. 2000; 102:2180-2184.
33. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, et al. C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. *N Engl J Med*. 2000; 342: 836-843.
34. Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, et al. C-Reactive Protein in healthy subjects: Associations with obesity, insulin resistance and endothelial dysfunction – a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* .1999;19:972-978.
35. Haffner SM. The Metabolic Syndrome: Inflammation, Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol*. 2006; 97:3A-11A.

36. Santos WB, Mesquita ET, Vieira RMR, et al. Proteína-C Reativa e Doença Cardiovascular: as bases da evidência científica. *Arq Bras Cardiol.* 2003; 80(4): 452-456.
37. Sjöholm A, Nystrom T. Endothelial Inflammation in Insulin Resistance. Rapid Review. *The Lancet.* 2005;365: 610-612.
38. Granger DN, Vowinkel T, Petnehazy T. Modulation of the inflammatory response in cardiovascular disease. *Hypertension.* 2004; 43:924-931.
39. Baker AR, Silva NF, Quinn DW, et al. Human epicardial adipose tissue express a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol.* 2006, 5:1-7.
40. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation.* 2003;108:r122-r128.
41. Sacks HS and Fain JN. Human epicardial adipose tissue: a review. *Am Heart J.* 2007; 153: 907-917.
42. Iacobellis G, Corradi D and Sharma AM. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nature.* 2005; 2: 536-543.
43. Rabkin SW. Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. *Obesity reviews.* 2007; 8: 253-261.
44. Permana PA, Menge C, Reaven PD. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 341: 507-514.

45. Law RE, et al. Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2000;101(11):1311-1318.
46. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol*. 2001;169(3):453-459.
47. Da Luz PL, Uint L. Endotélio na Aterosclerose: Interações Celulares e Vasomotricidade. In: Da Luz PL, Laurindo FRM e Chagas ACP eds. *Endotélio & Doenças Cardiovasculares*. São Paulo; Atheneu, 2005. 412pp.
48. Meisner F, Walcher D, Gizard F, et al. Effect of Rosiglitazone treatment on plaque inflammation and collagen content in nondiabetic patients – Data from a randomized placebo-controlled trial. *Arterios Thromb Vasc Biol*. 2006;26:845-850.
49. Tenenbaum A, Fisman E, Motro M. Metabolic Syndrome and type 2 diabetes mellitus: focus on peroxisome proliferator activated receptors (PPAR). *Cardiovasc Diabetol*. 2003; 2: 1-7.
50. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990; 347(6294):645-650.
51. Rizza R, Henry R, Kahn R. Commentary on the results and clinical implications of the PROactive study. *Diabetes Care*. 2005;28:2965-2967.

52. Dormandy JA, Charbonnel B, Echland DJ, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In MacroVascular Events): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2005;366:1279-1289.
53. Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, et al. PERISCOPE Investigators. Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial. *JAMA*. 2008 Apr 2;299(13):1561-1573.
54. Hanefeld M, Marx N, Pfutzner A, Baurecht, W, et al. Anti-Inflammatory Effects of Pioglitazone and/or Simvastatin in High Cardiovascular Risk Patients With Elevated High Sensitivity C-Reactive Protein: The PIOSTAT Study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 290-297.
55. Shu H, Wong B, Zhou G, et al. Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267(1):345-349.
56. Sacks HS, Fain JN, Cheema P, Bahouth SW et al. Inflammatory genes in epicardial fat contiguous with coronary atherosclerosis in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: changes associated with pioglitazone. *Diabetes Care*. 2011; 34(3): 730-733.
57. Lennernas H and Gunnar F. Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of the HMG-CoA Reductase Inhibitors: Similarities and Differences. *Clin Pharmacokinet*. 1997. May;32(5):403-425.



58. Dummer CD. Efeito agudo da sinvastatina em marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo em pacientes com doença renal crônica. Dissertação de mestrado. Porto Alegre, 2007. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
59. Endres M. Statins: Potential new indications in inflammatory conditions. *Atheroscler Suppl.* 2006; 7: 31-35.
60. Serrano Jr CV, Yoshida VM, Venturinelli ML, et al. Effect of Simvastatin on Monocyte Adhesion Molecule Expression in Patients with Hypercholesterolaemia. *Atheros.* 2001;157:505-512.
61. Da Luz PL, Bertini PJ, Favarato D. Noninvasive Detection of Coronary Artery Disease – Challenges for Prevention of Disease and Clinical Events. *Clinics.* 2005; 60(5):415-428.
62. Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, et al. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 1;23(3):397-403.
63. Jialal I, Stein D, Balis D, et al. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation.* 2001 Apr 17;103(15):1933-1935.
64. Gibson RS. *Principles of Nutritional Assessment.* New York 1990, Oxford University Press. 691p.
65. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation.* 2004. 110: 227-239.

66. Hanley AJG, Karter AJ, Willians K, et al. Prediction of Type 2 Diabetes Mellitus with Alternative Definitions of the Metabolic Syndrome. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation*. 2005; 112: 3713-3721.
67. McGowan MP. There Is No Evidence for an Increase in Acute Coronary Syndromes After Short-Term Abrupt Discontinuation of Statins in Stable Cardiac Patients – for the Treating to New Target (TNT) Study Group. *Circulation*, 2004; 110:2333-2335.
68. Endres M and Laufs U. Discontinuation of Statin Treatment in Stroke Patients. *Stroke*. 2006;37:2640-2643.
69. Mansur AP, Serrano Jr CV, Nicolau JC, et al. Effect of cholesterol lowering treatment on positive exercise tests in patients with hypercholesterolaemia and normal coronary angiograms. *Heart*, 1999;82:689-693.
70. Ramires JAF, Sposito AC, Mansur AP, Coelho OR et al. Cholesterol lowering with statins reduces exercise-induced myocardial ischemia in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2001; 88: 1134-1138.
71. Allain CC, Ponn LS, Chan CSG, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.*, 1974; v. 20: 470-475.
72. Assmann G, Schriewer H, Schmitz G. Quantification of high-density lipoprotein cholesterol by precipitin with phosphotungstic acid/MgCl<sub>2</sub>. *Clin Chem.*, 1983; v.29: 2026-2030.

73. McGowan NM, Artiss JD, Strandbergh DR, et al. A peroxide-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerids. *Clin Chem*, 1983; v.29: 538-542.
74. Friedwald WT, Levy RJ, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultra centrifuge. 1972; *Clin Chem.*, v.18, p.499-502.
75. Siedel J, Schiefer S, Rosseneu M, et al. Immunoturbidimetric method for routine determinations of apolipoproteins A-1, A-II and B in normo- and hiperlipemic serum compared with imunonephelometry. *Clin Chem.*, 1988; v.34, p.1821-1825.
76. Koh KK, Park SM and Quon MJ. Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine: Leptin and Cardiovascular Disease: Response to Therapeutic Interventions. *Circulation*; 2008;117:3238-3249.
77. Ke C, Fanghong L, Ji L, et al. Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nat Med*. 2006;12:425– 432.
78. Langheim S, Dreas L, Veschini L, et al. Increased expression and secretion of resistin in epicardial adipose tissue of patients with acute coronary syndrome *Am J Physiol Heart Circ Physiol* March 2010 298:(3) H746-H753.
79. Wu H, Ghosh S, Perrard XD, et al. Molecular Cardiology: T-Cell Accumulation and Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secretes Upregulation in Adipose Tissue in Obesity. *Circulation*. 2007;115:1029-1038.

80. Melian A, Geng YJ, Sukhova GK, et al. CD1 expression in human atherosclerosis: a potential mechanism for T cell activation by foam cells. *Am J Pathol.* 1999;155:775–786.
81. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Atherosclerosis and Lipoproteins: Association of Hypoadiponectinemia With Coronary Artery Disease in Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:85-89.
82. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, et al. Plasma Adiponectin Levels and Risk of Myocardial Infarction in Men. *JAMA.* 2004;291(14):1730-1737.
83. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adipocyte-Derived Plasma Protein, Adiponectin, Suppresses Lipid Accumulation and Class A Scavenger Receptor Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Circulation.* 2001;103:1057-1063.
84. Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, et al. An Adipocyte-Derived Plasma Protein, Adiponectin, Adheres to Injured Vascular Walls. *Horm Metab Res;* 2000; 32(2): 47-50.
85. Cheng KH, Chu CS, Lee KT, et al. Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease. *International Journal of Obesity.* 2008; 32, 268–274.
86. Batra A, Pietsch J, Fedke I, et al. Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. *Am J Pathol.* 2007; 170, 1931-1941.

87. Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, et al. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation*. 2001;104:3052–3056.
88. Mazzone T. Adipose tissue and the vessel wall. *Curr Drug Targets*. 2007 Nov;8(11):1190-1195.
89. Taube A, Schlich R, Sell H. Inflammation and Metabolic Dysfunction: Links to Cardiovascular Disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; 23. [Epub ahead of print].
90. Xu H, Barnes GT, Yang Q et al. Chronic Inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003; 112:1821-1830.
91. Iacobellis G, Ribaldo MC, Zappaterreno A, et al. Relation between epicardial adipose tissue and left ventricular mass. *Am J Cardiol*. 2004; 15;94(8):1084-1087.
92. Eiras S, Teijeira-Fernandez E, Salgado-Somoza A, et al. Relationship between epicardial adipose tissue adipocyte size and MCP-1 expression. *Cytokine*. 2010; 51(2):207-212.
93. Iacobellis G, Assael F, Ribaldo MC, et al. Epicardial fat from echo cardiography: a new method for visceral adipose tissue prediction. *Obes Res*. 2003; 11:304-310.
94. Achike FI, To NH, Wang H, et al. Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38(1):1-10.

95. Fisher FM, McTernan PG, Valsamakis G, et al. Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res.* 2002; 34: 650-654.
96. McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, et al. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:2407.
97. Fluchter S, Haghi D, Dinter D, et al. Volumetric assessment of epicardial adipose tissue with cardiovascular magnetic resonance imaging. *Obesity.* 2007; 15: 870-878.
98. Teijeira-Fernandez E, Eiras S, Grigorian Shamagian L, et al. Lower epicardial adipose tissue adiponectin in patients with metabolic syndrome. *Cytokine.* 2011; 54(2):185-190.
99. Sun K and Scherer PE. Adipose Tissue Dysfunction: A Multistep Process. 2010: 67-75. In *Novel Insights into Adipose Cell Functions. Research and Perspectives in Endocrine Interactions.* K. Clément, BM Spiegelman and Y. Christen Eds. Springer-Verlag. 170pp.
100. Sun K, Kusminski CM and Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2094–2101.
101. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res.* 2005; 46: 2347-2355.
102. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M et al. Adipogenesis in Obesity Requires Close Interplay Between Differentiating Adipocytes, Stromal Cells, and Blood Vessels. *Diabetes.* 2007; 56:1517-1526.

103. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M et al., 2008; In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest.* 2008; 118(2): 710–721.
104. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H et al. Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes.* 2007; 56(12): 2910-2918.
105. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007; 117(1):175-184.
106. Hirata Y, Kurobe H, Akaike M. Enhanced Inflammation in Epicardial Fat in Patients With Coronary Artery Disease. *Int Heart J.* 2011; 52: 139-142.
107. Arnaud C, Braunersreuther V, Mach F. Toward immunomodulatory and anti-inflammatory properties of statins. *Trends Cardiovasc Med.* 2005; 15(6):202-206.
108. Jasińska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. *Pharmacol Rep.* 2007;59(5):483-499.
109. Inoue I, Goto S, Mizotani K et al. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of mRNA levels for IL-1 $\beta$ , IL-6, COX-2, and p22phox by regulation of PPAR $\alpha$  in primary endothelial cells. *Life Sci.* 2000; 67: 863-876.

110. Roglans N, Sanguino E, Peris C, et al. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(1):232-239.
111. Jialal I, Stein D, Balis D, et al. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation.* 2001; 17;103(15):1933-1935.
112. Khan T, Hamilton MP, Mundy DI et al. Impact of simvastatin on adipose tissue: pleiotropic effects in vivo. *Endocrinology.* 2009; 150(12):5262-5272.
113. Sidhu JS, Cowan D, Kaski J. The effects of rosiglitazone, a PPAR $\gamma$  agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42 (10): 1757-1763.
114. Pfutzner A, Marx N, Lubben G, et al. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the PIONEER STUDY. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45 (12): 1925-1931.
115. Zhang X, Young HA. PPAR and immune system – what do we know. *Int Immunopharmacol.* 2002; 2: 1029-1044.
116. Ogawa S. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell.* 2005; 122: 707-721.
117. Spanheimer R, Betteridge DJ, Tan MH, et al. Long-Term Lipid Effects of Pioglitazone by Baseline Anti-Hyperglycemia Medication Therapy and Statin Use from the PROactive Experience (PROactive 14). *Am J Cardiol;* 2009; 104:234-239.



118. Nesto RW, Bell D, Bonow RO, et al. Thiazolidine use, fluid retention and congestive heart failure: a consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 27:256–263, 2004.
119. Madej A, Buldak L, Basiak M The effects of 1 month antihypertensive treatment with perindopril, bisoprolol or both on the ex vivo ability of monocytes to secrete inflammatory cytokines. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47(11):686-694.
120. Yang YP, Dong QL, Zhang XH, et al. Combination of fluvastatin and losartan relieves atherosclerosis and macrophage infiltration in atherosclerotic plaques in rabbits. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(10):1259-1265.
121. Yilmaz MI, Sonmez A, Caglar K, et al. Effect of antihypertensive agents on plasma adiponectin levels in hypertensive patients with metabolic syndrome. *Nephrology (Carlton)*. 2007;12(2):147-153.
122. Derosa G, Maffioli P, Ferrari I et al. Different actions of losartan and ramipril on adipose tissue activity and vascular remodeling biomarkers in hypertensive patients. *Hypertens Res*. 2011;34(1):145-151.
123. Pavlatou MG, Mastorakos G, Margeli A, et al. Angiotensin blockade in diabetic patients decreases insulin resistance-associated low-grade inflammation. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(6):652-658.

124. Fain JN, Sacks HS, Bahouth SW et al. Human epicardial adipokine mRNAs: comparisons with their expression in substernal, subcutaneous and omental fat. *Metabolism*. 2010; 59: 1379-1386.
125. Phillips SA, Ciaraldi TP, Oh DK, et al. Adiponectin secretion and response to pioglitazone is depot dependent in cultured human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295(4): E842-E850.
126. Rasouli N, Yao-Borengasser A, Miles LM, et al. Increased plasma adiponectin in response to pioglitazone does not result from increased gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290: E42-E46.
127. Panagiotakos DB, Tzima N, Pitsavos C, et al. The relationship between dietary habits, blood glucose and insulin levels among people without cardiovascular disease and type 2 diabetes; the ATTICA study. *Rev Diabet Stud*. 2005; 2(4):208-215.
128. Warnberg J, Nova E, Moreno LA, et al. Inflammatory proteins are related to total and abdominal adiposity in a healthy adolescent population: the AVENA Study. *Am J Clin Nutr*. 2006 Sep;84(3):505-512.
129. Meir D, 2007; Bornmann C, Chappaz S, et al. Ectopic Lymphoid-Organ Development Occurs through Interleukin 7-Mediated Enhanced Survival of Lymphoid-Tissue-Inducer Cells. 2007. *Immunity*; 26, 643–654.
130. Lotzer K, Dopping S, Connert S, et al. Mouse aorta smooth muscle cells differentiate into lymphoid tissue organizer-like cells on combined tumor necrosis factor receptor-1/lymphotoxin beta-receptor NF-kappaB signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(3):395-402.

131. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH et al. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunology*. 2006; 7(4): 344-353.
132. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54: 2129-2138.