

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IMPACTO DA CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO
MIOCÁRDICA COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA NO
METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE
(HDL): ATIVIDADE DA PARAOXONASE E DA PEROXIDASE
ENDÓGENA**

TARSILA DOS SANTOS ARAÚJO

**Salvador - Bahia
2013**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**IMPACTO DA CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO
MIOCÁRDICA COM CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA NO
METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE
(HDL): ATIVIDADE DA PARAOXONASE E DA PEROXIDASE
ENDÓGENA**

TARSILA DOS SANTOS ARAÚJO

Orientador: Prof. Dr. Ricardo David Couto

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia
2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A662i Araújo, Tarsila dos Santos
Impacto da cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea no metabolismo das lipoproteínas de alta densidade (HDL): atividade da paraoxonase e da peroxidase endógena / Tarsila dos Santos Araújo. - 2013.

109 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo David Couto, Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2013.

1. Revascularização miocárdica. 2. Circulação extracorpórea. 3. Lipoproteínas de alta densidade. 4. Paraoxonase. 5. Peroxidase endógena. I.Título.

CDU 616.12-089

FONTES DE FINANCIAMENTO

FAPESB – Fundação de Apoio a Pesquisa da Bahia

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira (CEP/MCO/UFBA), ofício nº 379, ref. V/Of. nº 02/2005, e, Parecer/Resolução Aditiva nº 075/2011

Aos meus pais, irmãos e a Jorge,

Por toda compreensão, paciência, carinho e pelo eterno amor

Este trabalho eu dedico a vocês, fonte de inspiração nos estudos e na vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho e sempre iluminar minha trajetória de vida!

Ao meu noivo Jorge Coutinho, por ter me apoiado em todas as etapas dos meus estudos, deste trabalho, pelo amor, companheirismo e palavras de motivação e conforto.

Aos meus pais João Alberto e Irandi Gama, pelo amor incondicional, por apoiarem minhas conquistas e pelo incentivo aos estudos.

Aos meus irmãos Omar Hebert, Siomara e João Júnior que fazem parte da minha vida, agradeço pelas lições de paciência e perseverança.

Ao meu orientador, Professor Ricardo David Couto, pelo amadurecimento profissional, pelas oportunidades concedidas e conhecimento adquirido.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFBA.

Ao Laboratório DILDA/LAPIM, em especial ao Prof. Dr. Ajax Atta pela parceria e colaboração.

Aos colegas do grupo de Pesquisa em Dislipidemia, em especial a Ana Paula Caires dos Santos Valverde, pela colaboração nos experimentos realizados.

A equipe do Centro Cirúrgico do Hospital Ana Neri, em especial ao Diretor Médico Dr. Roque Aras, e aos alunos de medicina, Gustavo Maltez, Carolinne Abreu e Carla Funato pela realização da entrevista dos pacientes do estudo.

Aos pacientes que permitiram a realização do estudo.

Aos colegas da Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia - LETI – FIOCRUZ.

Ao Laboratório de Metabolismo de Lípidos – INCOR (São Paulo), em especial ao Professor Dr. Raul Maranhão e a Dra. Débora Deus.

À FAPESB pelo auxílio financeiro.

ARAÚJO, Tarsila dos Santos. Impacto da cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea no metabolismo das lipoproteínas de alta densidade (HDL): atividade da paraoxonase e da peroxidase endógena. 57 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

Introdução: a cirurgia cardíaca é um procedimento agressivo de importante impacto no endotélio vascular. O contato do sangue com o circuito extracorpóreo, a isquemia/lesão de reperfusão e o trauma cirúrgico estão associados com mudança do ambiente de homeostase para estado protrombótico de disfunção endotelial, com alteração da função das HDL e enzimas relacionadas. **Métodos:** foram avaliados 15 pacientes de ambos os sexos, entre 21 e 75 anos, admitidos no Hospital Ana Neri, submetidos à cirurgia de Revascularização Miocárdica (RM) com Circulação Extracorpórea (CEC), selecionados por conveniência. Todas as determinações laboratoriais foram realizadas antes e depois da CEC. **Resultados:** houve diminuição da atividade da paraoxonase e aumento da atividade total da peroxidase endógena após o evento da CEC. As taxas de incorporação do colesterol livre (CL) nas HDL não foram diferentes quando comparadas antes e depois da CEC, enquanto que as concentrações das apolipoproteínas A e B foram maiores antes da CEC. As razões de risco cardiovascular, apoB/apoA e TG/HDL-C, foram respectivamente, maior em relação aos valores de referência e significativamente diferentes ($p = 0,0007$) após a CEC. **Conclusão:** alterações importantes na concentração e composição das HDL evidenciam mudanças nos mecanismos de defesa anti-aterogênicos após a cirurgia de revascularização miocárdica com CEC.

Palavras-chave: revascularização miocárdica; circulação extracorpórea; lipoproteínas de alta densidade; paraoxonase; peroxidase endógena.

ARAÚJO, Tarsila dos Santos. Impact of myocardial revascularization with cardiopulmonary bypass on high density lipoprotein (HDL) metabolism: paraoxonase and endogenous peroxidase activity. 57 f. il. Thesis (MA) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

Introduction: Cardiac surgery is an aggressive procedure with important impact on vascular endothelium. The contact of blood with the extracorporeal circuit, ischemia/reperfusion injury and surgical trauma are associated with changes in the homeostatic environment to a prothrombotic state of endothelial dysfunction, by changing the composition and function of HDL and related enzymes. **Methods:** 15 patients of both sexes were evaluated, aged between 21 and 75 years, admitted to the Ana Neri Hospital, underwent surgery Myocardial Revascularization (CABG) with cardiopulmonary bypass (CPB), selected by convenience. All laboratory dosages were conducted before and after the CPB. **Results:** there was paraoxonase decreasing activity and increase of total endogenous peroxidase activity after CPB event. The rates of incorporation of free cholesterol (FC) in HDL were not different when compared before and after CPB, while the concentrations of apolipoprotein A and B were higher before CPB. The cardiovascular risk ratios, apoB/apoA and TG/HDL-C were respectively higher when compared to reference value and significantly different ($p = 0.0007$) after CPB. **Conclusion:** significant changes in the concentration and composition of HDL show changes in antiatherogenic defense mechanisms after CABG with CPB.

Keywords: myocardial revascularization, cardiopulmonary bypass, high density lipoprotein; paraoxonase; endogenous peroxidase.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC-A1	<i>ATP – binding cassette transporter A1</i>
A-I	Angiotensina I
A-II	Angiotensina II
ALT	Alanina aminotransferase
apo	Apolipoproteína
apoA-I	Apolipoproteína A-I
apoA-II	Apolipoproteína A-II
apoE	Apolipoproteína E
AST	Aspartato aminotransferase
AT1	Receptor de angiotensina II
ATP	Adenosina trifosfato
CEC	Circulação Extracorpórea
CETP	Proteína de transferência de fosfolípide
CL	Colesterol livre
CL ³ H	Colesterol livre tritiado
CPM	Contagem por minuto
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Acido etilenodiamina-tetra-acético
GPX	Glutationa peroxidase
HCT	Hipercolesterolemia
HDL	Lipoproteínas de alta densidade

HDL-C	Colesterol das lipoproteínas de alta densidade
HTG	Hipertrigliceridemia
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
sICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1 solúvel
IDL	Lipoproteínas de densidade intermediária
LCAT	Lecitina-colesterol-acil transferase
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LDL-C	Colesterol das lipoproteínas de baixa densidade
oxLDL	Lipoproteínas de baixa densidade modificada
LH	Lipase hepática
MCP-1	Proteína-1 quimioatrativa de monócitos
MPO	Mieloperoxidase
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	do inglês, óxido nítrico
NOS	do inglês, óxido nítrico sintase
NORMO	Normolipidêmico
OMS	Organização mundial da saúde
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípide
PMN	Polimorfonucleares neutrófilos
PON-1	Paraoxonase 1
RM	Revascularização miocárdica
ROS	do inglês, espécies reativas de oxigênio
SD	Desvio padrão
SR-B1	<i>Scavenger receptor B class 1</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Triglicérides

TN	Tetranectina
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
<i>RCT</i>	do inglês, transporte reverso do colesterol
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1
sVCAM-1	Molécula de adesão vascular-1 solúvel
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa
VLDL-C	Colesterol das lipoproteínas de densidade muito baixa
<i>VSMC</i>	do inglês, células vasculares musculares lisas
vWF	Fator de von Willebrand
\bar{x}	Média

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Principais vias do transporte reverso do colesterol e metabolismo da HDL. Retirado e adaptado de Lima & Couto, 2006.....	27
Figura 2 Participantes do estudo estratificados por faixa etária.....	39
Figura 3 Distribuição dos pacientes participantes do estudo por sexo, estratificados por faixa etária.....	39
Figura 4 Fatores de risco para doenças cardiovasculares, obtidos a partir dos dados dos prontuários dos pacientes.....	39
Figura 5 Distribuição dos pacientes participantes do estudo segundo a classificação das dislipidemias.....	40
Figura 6 Atividade da paraoxonase determinada por método espectrofotométrico nas amostras dos 15 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica (RM).....	42
Figura 7 Atividade da peroxidase endógena determinada por método colorimétrico nas amostras dos 15 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica (RM).....	42
Figura 8 Incorporação do colesterol livre (CL) nas HDL em pacientes submetidos à revascularização miocárdica (RM).....	43
Figura 9 Comparação da razão apoB/apoA Antes e Depois da Circulação Extracorpórea (CEC) em pacientes submetidos a revascularização miocárdica (RM).....	44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Classificação dos participantes do estudo estratificados por sexo e idade.....38
- Tabela 2** Perfil lipídico dos pacientes participantes do estudo submetidos à revascularização miocárdica (RM)..... 40
- Tabela 3** Concentração de apolipoproteínas e razões de risco dos pacientes submetidos à revascularização miocárdica (RM) antes e depois da circulação extracorpórea (CEC)..... 43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	15
1.2	REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA.....	16
1.3	DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....	18
1.4	PEROXIDASE ENDÓGENA.....	21
1.5	HDL – LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE.....	23
1.5.1	Metabolismo das HDL.....	26
1.5.2	Paraoxonase (PON-1).....	28
1.6	RELEVÂNCIA.....	30
1.7	HIPÓTESE.....	31
1.8	OBJETIVOS.....	32
1.8.1	Objetivos gerais.....	32
1.8.2	Objetivos específicos.....	32
2	METODOLOGIA	33
2.1	CASUÍSTICA.....	33
2.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	33
2.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	33
2.4	DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS.....	34
2.4.1	Determinações do Perfil Lipídico.....	34
2.4.2	Determinação da concentração de apoA e apoB.....	34
2.4.3	Incorporação de Colesterol Livre (CL ³ H) nas HDL.....	35
2.4.4	Determinação da Atividade da Paraoxonase.....	35
2.4.5	Determinação da Atividade da Peroxidase Endógena.....	36

2.5	Análises estatísticas.....	36
3	RESULTADOS.....	38
4	DISCUSSÃO.....	45
5	CONCLUSÃO.....	50
	Limitações.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO - Procedimento Cirúrgico.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares são desordens que acometem o coração e vasos sanguíneos. Incluem as cardiopatias coronárias, acidentes cerebrovasculares, hipertensão, vasculopatia periférica, cardiopatias reumáticas, congênitas e insuficiência cardíaca (OMS, 2011). Estão entre as doenças que mais matam no mundo, com aproximadamente 17,1 milhões de mortes ao ano. Este dado representa 29% de todas as mortes registradas, sendo que 7,2 milhões foram cardiopatias coronárias e 5,7 milhões corresponderam a acidentes cerebrovasculares (OMS, 2011).

Atualmente, as doenças cardiovasculares representam 9,5% das internações, as quais equivalem a 17% dos gastos do Sistema Único de Saúde - SUS e, segundo o Ministério da Saúde, são responsáveis por 24% das aposentadorias por invalidez (FARRET, 2005). No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 33% dos óbitos com causas conhecidas. Além disso, essas doenças estão classificadas como a primeira causa de hospitalização no setor público, entre 1996 e 1999, e responderam por 17% das internações de pessoas com idade entre 40 e 59 anos e 29% daquelas com 60 ou mais anos (PASSOS *et al.*, 2006).

Os eventos cardiovasculares afetam homens e mulheres na mesma proporção, sendo que o risco cardiovascular em mulheres é maior após menopausa (OMS, 2011).

A causa primária de doenças cardiovasculares é a aterosclerose. É uma doença progressiva multifatorial que tem como etapa inicial a formação de lipoproteínas modificadas, devido à presença de um ambiente caracterizado por estresse oxidativo, conseqüente à produção em excesso de radicais livres de oxigênio (ver item 1.4) As lipoproteínas são modificadas por nitratação, glicação, oxidação, acetilação, e são captadas por receptores *scavenger* presentes nas células da parede arterial, induzindo a formação de moléculas

de adesão (VCAM-1; ICAM-1; P-selectinas; E-selectinas) e citocinas quimioatrativas (MCP-1) (PARK; TAEG OH, 2011).

Os monócitos, atraídos pelas moléculas de adesão e citocinas, atravessam a camada íntima por diapedese, diferenciam-se em macrófagos e passam a fagocitar as lipoproteínas modificadas, tornando-se túrgidos de lipídios (células espumosas). As células espumosas secretam mais citocinas e fatores de crescimento, induzindo resposta inflamatória, migração e proliferação de células vasculares musculares lisas (do inglês, VSMC), e por não ser inibida por *feedback*, sua geração promove a formação e progressão da placa aterosclerótica (AFIUNE NETO *et al.*, 2006; ROSENBLAT *et al.*, 2011).

A associação entre fatores e marcadores de risco levam ao quadro crônico da lesão endotelial (vasoconstrição, acúmulo de células inflamatórias, migração de células musculares lisas, aumento da produção de citocinas) e todos esses fatores/marcadores contribuem para a manutenção da placa aterosclerótica, que por *feedback* negativo, leva a lesão endotelial mais profunda com redução da camada muscular da placa, seguido de erosão e ruptura, finalmente culminando em oclusão vascular e fenômenos trombogênicos (FRANCIS; PIERCE, 2011).

As placas são classificadas como vulneráveis quando há acúmulo de lipídios, expansão da íntima, degradação da matriz extracelular, diminuição de proteínas do tecido conectivo e núcleo necrótico (DAVIES, 1993 *apud* PARK; TAEG OH, 2011).

1.2 REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA

A revascularização miocárdica (RM), convencionalmente denominada “ponte de safena”, é um procedimento cirúrgico que tem como objetivo reestabelecer o suprimento de sangue em áreas acometidas por oclusão ou estreitamento dos vasos sanguíneos em função da presença de placa aterosclerótica. A revascularização é realizada com enxertos autólogos,

proveniente da veia safena (mais comumente utilizado, daí a denominação “ponte de safena”), artéria mamária interna (torácica interna), artéria radial, artéria epigástrica inferior ou artéria gastroepiplóica direita.

Apesar da necessidade e indicação da cirurgia de RM como terapia médica, alguns estudos demonstraram que, em média, após dois anos, pode ocorrer a oclusão do enxerto, sendo considerada a razão mais comum para a realização de nova intervenção cirúrgica (CAGIRCI *et al.*, 2009).

Durante o processo, por conta da necessidade de interrupção do fluxo sanguíneo coronário, é necessário preservar a função miocárdica. Em razão do longo período para realização da cirurgia há o desenvolvimento de lesões estruturais e funcionais, principalmente durante a reperfusão arterial que, apesar de limitar o dano isquêmico, proporciona a geração de espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS) e danos teciduais. Logo, é considerado um procedimento agressivo de forte impacto no endotélio vascular (AKILA *et al.*, 2007).

A realização da cirurgia de RM com o uso de circulação extracorpórea (CEC) ainda é bastante predominante. A CEC é responsável pela mudança do estado de equilíbrio endotelial, caracterizado pela alteração das células endoteliais da condição de repouso para a expressão de um estado protrombótico. O trauma decorrente da própria cirurgia, o contato do sangue com o circuito extracorpóreo, a isquemia e a reperfusão do órgão isquêmico são associados com ativação do sistema imune, elevação nos níveis plasmáticos de moléculas de adesão; ativação e elevação dos níveis plasmáticos de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN). Tal cenário é favorável ao desenvolvimento de resposta inflamatória sistêmica e disfunção endotelial (BALCIUNAS *et al.*, 2009).

Balciunas *et al.* (2009), afirmam que durante a cirurgia de RM com CEC são produzidos elevados níveis de moléculas de adesão solúveis, sendo ICAM-1 e VCAM-1 marcadores característicos da ativação celular endotelial. No estudo supracitado, os autores mediram as concentrações de sICAM-1 e sVCAM-1 no soro de 42 pacientes submetidos a cirurgia de RM com CEC. Ao comparar com os valores pré-operatórios, os níveis de ambas as moléculas de adesão aumentaram após a cirurgia, o que os autores julgaram ser resultado

do impacto da cirurgia da artéria coronária com CEC na função endotelial. Neste estudo, as concentrações de sICAM-1 elevaram-se de 201 a 268 ng/mL ($p = 0,022$), e os níveis de sVCAM-1 aumentaram de 1003,5 a 1638,2 ng/mL ($p = 0,023$).

Blume *et al.* (1997 *apud* BALCIUNAS *et al.*, 2009) demonstraram que crianças submetidas a cirurgia cardíaca com longo período de CEC tiveram níveis plasmáticos de moléculas de adesão aumentados. Os níveis plasmáticos das moléculas de adesão, segundo Balciunas *et al.*, 2009, indicam a intensidade da ativação endotelial ou disfunção endotelial durante a reperfusão do miocárdio isquêmico e a administração de anticorpos que bloqueiam a função das moléculas de adesão controlaria o dano tecidual durante a cirurgia com CEC.

Ao estudar as concentrações plasmáticas de biomarcadores da função endotelial, exclusivamente ou parcialmente derivados das células endoteliais, em pacientes submetidos a cirurgia de RM, Panagiotopoulos *et al.*, 2010, observaram que após a CEC, uma resposta inflamatória adicional é desenvolvida, induzindo a ativação de várias vias inflamatórias. Desta forma, moléculas sintetizadas e estocadas em grânulos das células endoteliais e das plaquetas (P-selectina, fator de von Willebrand e tetranectina), podem ser liberadas devido ao contato com o circuito da CEC.

Portanto, a CEC está associada à ativação de PMN e células endoteliais, níveis elevados de moléculas de adesão endotelial; adesão de PMN ao endotélio vascular; oclusão capilar coronária; redução do fluxo coronário; produção e acúmulo de citocinas e radicais livres de oxigênio, provenientes dos PMN; dano às membranas das células miocárdicas, e hipoxemia em vários outros órgãos e tecidos.

1.3 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio é um tecido formado por células achatadas de espessura variável organizadas numa monocamada que reveste o interior dos vasos

sanguíneos e forma uma barreira permeável para a vasculatura, atuando no transporte de água, eletrólitos e moléculas (aminoácidos, glicose, albumina, lipídios) do sangue para os tecidos adjacentes (CARAMORI; ZAGO, 2000). É considerado como a maior e mais importante glândula do corpo humano com peso total maior que o do fígado (HIGASHI *et al.*, 2009).

O endotélio exerce diversas funções para a manutenção da homeostase. Trata-se de uma superfície não trombótica que regula o tônus vascular, através da liberação de substâncias vasoativas e trombo regulatórias, regulando a agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise; inibe o crescimento de células do músculo liso, ao passo que produz fatores de crescimento em resposta ao dano tecidual; regula a angiogênese; participa da síntese e degradação de hormônios, assim como participa também de processos inflamatórios, através da produção de citocinas e moduladores da atividade leucocitária, importantes no equilíbrio homeostase *versus* inflamação (CARAMORI; ZAGO, 2000).

A vasodilatação é estimulada na maioria das vezes pela produção de óxido nítrico (do inglês, NO), um gás presente em praticamente todos os tecidos, de baixo peso molecular e propriedades lipofílicas, o que possibilita sua difusão através das membranas (FORSTERMANN, 2010). O NO reduz a permeabilidade vascular; diminui a síntese de moléculas de adesão de linfócitos e monócitos; reduz agregação plaquetária; oxidação e inflamação tecidual; ativação de fatores trombogênicos; crescimento celular, proliferação e migração; inibe a expressão de citocinas pró-aterogênicas e pró-inflamatórias e favorece a fibrinólise (HIGASHI *et al.*, 2009).

O NO é produzido pela ação da *sintase* óxido nítrico (do inglês, NOS) sobre o aminoácido L-arginina, produzindo NO e L-citrulina, requerendo O₂ e a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) (FORSTERMANN, 2010). Três isoenzimas NOS são conhecidas: duas constitutivas e uma induzível. As constitutivas, NOS-I de tecidos neurológicos e NOS-III de células endoteliais, são de baixa produção. A induzível, NOS-II, é expressa em macrófagos e células endoteliais em resposta ao efeito de citocinas pró-inflamatórias, e pode liberar várias vezes mais NO do que as NOS constitutivas (CARAMORI; ZAGO, 2000).

As células endoteliais liberam angiotensina-II (A-II) como antagonista ao NO através da hidrólise da angiotensina-I pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A-II também pode estimular a ECA, para degradar a endotelina liberando endotelina-I, suscitando o aumento da vasoconstrição da parede vascular. Ela promove a trombogênese através da expressão de moléculas de adesão, síntese de fatores de crescimento, expressão de citocinas pró-inflamatórias e pró-aterogênicas, efeitos oxidativos e antifibrinolíticos. Esse ambiente permite o desenvolvimento da aterosclerose, sua progressão e agravamento. A depender do equilíbrio entre estas duas substâncias, NO e A-II, o efeito vasodilatador e antiaterosclerótico ou efeito vasoconstrictor e aterogênico irá prevalecer (ESPER *et al.*, 2006).

As células endoteliais são submetidas à contração e relaxamento, e este processo tem como objetivo adaptar a forma das células endoteliais às forças mecânicas do fluxo sanguíneo e distensão da parede (tensão de cisalhamento), reduzindo a possibilidade de lesões celulares. Quando o fluxo aumenta, aumenta a tensão de cisalhamento e as células achatam e alinham-se em direção ao fluxo do sangue; quando o fluxo diminui a tensão de cisalhamento também diminui, as células aumentam seu volume, perdendo seu alinhamento (CARAMORI; ZAGO, 2000; ESPER *et al.*, 2006).

A tensão de cisalhamento estimula a liberação de NO proporcional ao aumento do fluxo sanguíneo e distensão da parede do vaso, gerando vasodilatação endotélio-dependente (CARAMORI; ZAGO, 2000). Tal processo explica a importância do fluxo hemodinâmico na formação, localização e rompimento da placa, pois em áreas de baixa tensão de cisalhamento, a liberação de NO está diminuída, moléculas de adesão estão elevadas, proporcionando ambiente favorável para a formação da placa e progressão da lesão aterosclerótica. Contrariamente, em áreas de alta tensão de cisalhamento, o fluxo sanguíneo elevado pode causar erosão endotelial e adesão plaquetária, ou ruptura e danos à placa (ESPER *et al.*, 2006).

Quando a capacidade de sustentar o equilíbrio homeostático é danificada ou perdida fica caracterizada a disfunção endotelial. A disfunção endotelial e sua permanência favorecem o desenvolvimento de lesão aterosclerótica (ESPER *et al.*, 2006), visto que as alterações funcionais antecedem as lesões anatômicas.

A disfunção endotelial atua no princípio da doença aterosclerótica, promovendo a síntese da placa aterosclerótica, seu crescimento e manutenção, através de alterações hemodinâmicas que evoluem para eventos aterotrombóticos e/ou síndromes isquêmicas. Daí a disfunção endotelial ser considerada pelo autor supracitado um dos principais mecanismos da doença aterosclerótica.

1.4 PEROXIDASE ENDÓGENA

Em resposta ao metabolismo aeróbico (respiração mitocondrial) e outras fontes enzimáticas (via do ácido araquidônico; citocromo p450s; enzimas lipoxigenase e ciclooxigenase; xantina oxidase), são sintetizados produtos oxidantes altamente reativos, tais como anion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH), ácido hipocloroso (HOCl) e radicais lipídicos (CAI; HARRISON, 2000; HIGASHI *et al.*, 2009). Vários estudos fazem referência a estes oxidantes, denominando-os espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS).

Diversos estados patológicos são descritos pela presença de produção excessiva de ROS, caracterizando o estado de “estresse oxidativo”. Níveis elevados de ROS têm efeitos deletérios na função celular e tecidual, através da diminuição da biodisponibilidade de NO, visto que tais espécies reativas de oxigênio podem reagir com o NO, inativando-o. Ademais, as ROS modificam a parede vascular, mediante oxidação lipídica, inflamação, formação de trombos e proliferação de VSMC (FORGIONE; LEOPOLD; LOSCALZO, 2000; CAI; HARRISON, 2000).

As ROS participam da formação da placa aterosclerótica através da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados na partícula de LDL, dando origem ao LDL modificado (oxLDL), processo denominado peroxidação lipídica (HIGASHI *et al.*, 2009). A peroxidação lipídica compreende um dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento da aterosclerose, visto que o oxLDL é retirado das paredes dos vasos por macrófagos mediante via não inibida por

feedback, levando a formação de células espumosas, que contribuem para a formação e progressão da placa (FORGIONE; LEOPOLD; LOSCALZO, 2000).

Em condições fisiológicas, a produção de *ROS* é compensada por sistema de moléculas antioxidantes, capazes de neutralizar e prevenir os danos oxidativos. Naturalmente são sintetizados antioxidantes enzimáticos, tais como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, e catalase que desempenham papel importante na conversão de *ROS* para oxigênio e água (AKILA *et al.*, 2006).

Acredita-se que a atividade reduzida da paraoxonase, enzima antioxidante associada às HDL, é preditivo de doença vascular. Jayakumari; Thejaseebai, 2009, observaram que durante síndromes de angina estável e não estável, em pacientes com doença arterial coronária (DAC) diagnosticada, há presença de estresse oxidativo avançado, devido às enzimas antioxidantes alteradas, especialmente a superóxido dismutase. A vitamina C, antioxidante *in vivo* e *in vitro*, inibe a peroxidação lipídica, protagonizada pelo ânion superóxido, e repara a função do endotélio em pacientes diagnosticados com DAC (CARAMORI; ZAGO, 2000; FORSTERMANN, 2010).

A glutathione peroxidase (GPX) (glutathione: peróxido de hidrogênio oxidoreductase, EC = 1.11.1.9) catalisa peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos lipídicos em água e seus respectivos alcoóis. A principal isoforma, GPX1 está localizada no plasma da mitocôndria e sua atividade é inversamente correlacionada com doença coronária arterial (PARK; TAEG OH, 2011; FORSTERMANN, 2010). Segundo Park; Taeg Oh, 2011, a superexpressão de GPX4, mais uma isoforma da glutathione peroxidase, *down*-regula a expressão de moléculas de adesão e reduz necrose em células endoteliais.

A catalase (peróxido de hidrogênio: peróxido de hidrogênio oxidoreductase, EC = 1.11.1.6), outra importante peroxidase localizada nos peroxissomos de todos os organismos vivos aeróbicos, transforma H_2O_2 , a água e oxigênio. A catalase parece proteger contra o stress oxidativo através da redução da peroxidação lipídica e, por conseguinte, inibição do desenvolvimento da aterosclerose (FORSTERMANN, 2010).

1.5 HDL – LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE

A lipoproteína de alta densidade (HDL) foi descoberta por Gofman *et al.* (1949 *apud* FRANCIS; PIERCE, 2011) em estudos de separação e categorização de distintas famílias de lipoproteínas séricas de acordo com sua densidade através de ultracentrifugação, onde foi observado que as lipoproteínas flutam em diferentes densidades. As HDL são lipoproteínas de pequeno diâmetro (5nm a 17nm) que sedimentam numa determinada região de densidade (1,063 g/mL a 1,21 g/mL).

As HDL são representadas por um grupo altamente heterogêneo de partículas plasmáticas em origem, tamanho, composição e função, composto por muitas subclasses. As diferenças entre as subclasses de HDL dependem das propriedades físicas das partículas, incluindo forma, tamanho, densidade e carga. As subclasses podem ser ainda reclassificadas de acordo com seu conteúdo lipídico, apolipoproteínas, proteínas de transferência lipídica e enzimas (PODREZ, 2010).

A análise por ultracentrifugação, técnica padrão ouro utilizada atualmente para identificar as diferentes subclasses de partículas de HDL foi desenvolvida por Gofman *et al.* (1951 *apud* FRANCIS; PIERCE, 2011). De acordo com este método, as HDL podem ser separadas em duas subfrações, baseado em suas densidades: HDL₂ (1063 g/mL a 1125 g/mL) e HDL₃ (>1125 g/mL). Segundo Nichols *et al.* (1986 *apud* DOBIASOVA; FROHLICH, 1998) estas duas subfrações podem ser ainda subdivididas com base no tamanho (diâmetro) usando eletroforese em gel de poliacrilamida, produzindo HDL_{2b} (9,7 nm a 12 nm), HDL_{2a} (8,8 nm a 9,7 nm), HDL_{3a} (8,2 nm a 8,8 nm), HDL_{3b} (7,8 nm a 8,2 nm) e HDL_{3c} (7,2 nm a 7,8 nm).

Outro sistema de classificação utiliza eletroforese em gel de agarose, separando HDL, com base na intensidade de carga negativa da superfície, em α -HDL – maioria das HDL plasmáticas, esféricas, de alta intensidade de carga negativa – e pré β -HDL – conhecidas como HDL nascentes (LIMA; COUTO, 2006). Mediante eletroforeses dimensionais, que combinam eletroforese em gel de agarose e eletroforese em gel gradiente, as α -HDL e pré β -HDL podem ser

ainda separadas em mais 12 subclasses, produzindo pré β (pré β_1 , pré β_2 e pré β_3), α (α_1 , α_2 e α_3) e pré α (pré α_1 , pré α_2 e pré α_3) (Castro; Fielding, 1988; Asztalos; Scharfer, 2003 *apud* FRANCIS; PIERCE, 2011)

Gordon *et al.* (1977 *apud* FRANCIS; PIERCE, 2011) demonstrou existir relação inversa entre níveis sistêmicos de HDL-C e risco prospectivo para DAC, sugerindo que tal correlação seja mantida mesmo com níveis baixos do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C). Segundo Gordon (1989, *apud* FRANCIS; PIERCE, 2011), a elevação da concentração de HDL-C em até 1mg/dL estaria vinculada à diminuição de 3 a 4% na mortalidade por causas cardiovasculares.

Embora o mecanismo completo dos efeitos anti-ateroscleróticos das HDL ainda não tenha sido totalmente desvendado, sabidamente as HDL atuam na proteção dos aspectos patológicos relacionados à formação, progressão e estabilidade da placa aterosclerótica. As HDL restauram a função basal da célula endotelial, diminuindo a proliferação e migração de células musculares lisas e diminuindo a inflamação e retenção de detritos dentro da placa, pois inibem a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e promovem o transporte reverso do colesterol (do inglês, RCT) (LANDMESSER, 2012; FORTI; DIAMENT, 2006).

No RCT, as HDL e sua principal apolipoproteína, apolipoproteína A-I, promovem o efluxo do colesterol a partir dos tecidos periféricos: as HDL então carregam o colesterol da circulação e o transportam para o fígado onde é reutilizado para a montagem das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) ou excretado como colesterol livre ou como sais e ácidos biliares. A contribuição das HDL para a regressão da placa, através da promoção do RCT, é uma função central para o papel ateroprotetor das HDL, contudo, estas lipoproteínas possuem outras funções protetoras no organismo, tais como inibição da agregação plaquetária, ação antiinflamatória, antioxidante e vasodilatadora (PODREZ, 2010).

As lipoproteínas de alta densidade têm demonstrado possuir também funções anti-apoptóticas, antitrombóticas e anti-infecciosas, em particular, as HDL pequenas e densas, consideradas as mais potentes promotoras do efluxo

do colesterol, possuindo maior atividade antioxidante e antiinflamatória (PODREZ, 2010; SHUHEI *et al.*, 2010).

As funções fisiológicas das HDL influenciam o sistema cardiovascular positivamente, exceto quando as HDL são modificadas patologicamente (NAVAB *et al.*, 2009; LANDMESSER, 2012). Além das mudanças composicionais das HDL, seus componentes proteicos ou lipídicos podem ser modificados através de oxidação/modificação por oxidantes, tais como radicais peróxido e hidróxidos, aldeídos, oxidantes gerados pela mieloperoxidase (MPO), lipoxigenase, fosfolipase A₂ (FERRETTI *et al.*, 2004; BINDU G; RAO; KAKKAR, 2011).

As HDL disfuncionais são caracterizadas por níveis diminuídos de atividades anti-inflamatória e antioxidante. Estas lipoproteínas possuem em seu conteúdo fosfolipídios oxidados e lisofosfolipídios, proteínas pró-inflamatórias, tais como α -amilóide sérica A e ceruloplasmina (BINDU G; RAO; KAKKAR, 2011). Funcionalmente, não podem promover o efluxo do colesterol ou prevenir a oxidação das LDL (NAVAB *et al.*, 2009; FEINGOLD; GRUNFELD, 2010). Muitos processos patológicos, tais como síndrome metabólica, doenças reumatóides, doença renal crônica, doença coronária crônica e algumas infecções, caracterizados pela presença de inflamação sistêmica, têm a participação de HDL disfuncionais ou pró-inflamatórias, (NAVAB *et al.*, 2009; PODREZ, 2010).

Processos inflamatórios agudos são acompanhados por mudanças no metabolismo lipídico, como o aumento dos níveis de triglicérides, diminuição dos níveis de HDL e, conseqüentemente, apoA-I e paraoxonase-1 (PON-1) (BINDU G; RAO; KAKKAR, 2011). A composição lipídica das HDL também sofre modificação, com redução de colesterol esterificado e fosfolipídios e aumento de triglicérides e colesterol não esterificado (SHUHEI *et al.*, 2010; FEINGOLD; GRUNFELD, 2010).

Portanto, a função das HDL está alterada durante respostas agudas, consecutivamente, em traumas cirúrgicos e na circulação extracorpórea, e tais modificações funcionais podem contribuir para o aumento do risco de eventos cardíacos.

1.5.1 Metabolismo das HDL

A síntese das lipoproteínas de alta densidade ocorre no plasma e no compartimento extravascular. O fígado secreta as apolipoproteínas A-I e A-II, enquanto que o intestino secreta apenas A-I (LIMA; COUTO, 2006).

As HDL no plasma passam por remodelamentos sucessivos (figura 1). As apolipoproteínas recebem conteúdo lipídico através da ação da proteína *ATP binding cassette transporter A1* (ABC-A1), presente na superfície do macrófago. O transportador ABC-A1 provoca a saída do colesterol livre das células dos tecidos periféricos e incorpora a apoA-I pobre em lipídios através da ação da proteína de transferência de fosfolípide (PLTP). As HDL discoides nascentes (pré β -HDL) possuem, além de apolipoproteínas, fosfolípídios e pequena quantidade de colesterol não esterificado (FORTI; DIAMENT, 2006; LIMA; COUTO, 2006).

O colesterol livre é esterificado nas HDL através da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) dando origem as HDL esféricas (α -HDL). Posteriormente, adquirindo mais fosfolípídios com a ação da PLTP, as HDL esféricas de núcleo lipídico se tornam mais maduras e menos densas, e passam a ser denominadas HDL₂. As HDL₂ ainda podem ser convertidas em HDL₃ através da ação da lipase hepática (LH) e da proteína de transferência do colesterol esterificado (CETP), uma glicoproteína sintetizada no fígado. Pode ocorrer também a interconversão de HDL₃ em HDL₂ através da participação das proteínas LCAT e PLTP (DOBIASOVA; FROHLICH, 1998).

A CETP é responsável pela troca do colesterol esterificado das HDL com triglicérides contidos nas lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

As HDL são captadas pelo fígado através de processo dependente de receptores *SR-B1* (*scavenger receptors B, class 1*) e receptores de apoE. Os fosfolípídios e colesterol esterificado são hidrolisados no fígado por lipases (LH e fosfolipase A2) e depois são excretados sobre a forma de ácidos biliares. A

1.5.2 Paraoxonase (PON-1)

O efeito protetor, antiaterogênico e antioxidante das HDL são atribuídos à ligação de metais de transição e a presença da enzima paraoxonase, uma aril-esterase (EC 1.1.2), carregada predominantemente pela apolipoproteína A-I, contida nas partículas de HDL, com atividade inversamente relacionada ao risco de doenças cardiovasculares (CAGIRCI *et al.*, 2009; MINEO; SHAUL, 2011; ZHAO *et al.*, 2011). O efeito antioxidante direto das HDL na oxidação das LDL, ou seja, inibição da peroxidação lipídica é provavelmente conferido pela PON-1 (CAGIRCI *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2011).

PON-1 diminui o acúmulo de colesterol nos macrófagos através da inibição da biosíntese deste esterol; atenuação da retirada de oxLDL via receptores *scavenger* CD36; estimulação do efluxo de colesterol de macrófagos mediado pelas HDL; promove o efluxo do colesterol de macrófagos através da promoção de ligação das HDL mediada pelo ABC-A1; contribui com os efeitos anti-inflamatórios das HDL pela diminuição da quimiotaxia monocítica e adesão a células endoteliais, sendo que sua ausência pode estar associada com alta expressão de moléculas de adesão (ROSENBLAT *et al.*, 2011).

A atividade enzimática de HDL-PON-1 é amplamente diversificada entre humanos saudáveis, e, quando comparados a pacientes com alta atividade de PON-1, àqueles com baixa atividade de PON-1 têm risco elevado de desenvolver doenças caracterizadas pela presença de danos oxidativos e peroxidação lipídica (BHATTACHARYA *et al.*, 2011). Além disso, existe uma relação entre a atividade de PON-1 e as propriedades antioxidantes das HDL e a susceptibilidade destas lipoproteínas às modificações aterogênicas, tais como glicação e ligação à homocisteína (FERRETTI *et al.*, 2004).

A PON-1 pode diminuir o conteúdo de peróxido de hidrogênio de macrófagos diretamente, através de sua atividade similar às peroxidases, hidrolisando peróxidos de hidrogênio mediante seus grupos SH livres. A aterogênese tem como circunstâncias a adesão de monócitos circulantes às células endoteliais, invasão do subendotélio, e diferenciação destes em macrófagos. A derivação de monócitos em macrófagos é etapa essencial para

o desenvolvimento de células espumosas e, por conseguinte, lesão aterosclerótica. Dito isto, uma vez que a PON-1 associada às HDL inibe a diferenciação de monócitos em macrófagos, tal ação pode levar a diminuição da formação de células espumosas e desenvolvimento de aterosclerose (ROSENBLAT *et al.*, 2011).

Condições patológicas associadas à inflamação e estresse oxidativo, tais como falência crônica renal, artrite reumatóide e doença de Alzheimer, estão associadas com atividade reduzida da PON-1 (SORAN, 2009 *apud* PODREZ, 2010). De maneira geral, múltiplos fatores (fisiológicos e genéticos; patologias associadas; medicação em uso; estilo de vida) podem alterar a atividade da PON-1.

1.6 RELEVÂNCIA

Vários estudos já demonstraram que durante a cirurgia de revascularização miocárdica são desenvolvidos processos agudos de resposta endotelial às alterações hemodinâmicas com importante impacto na expressão de moléculas de adesão e proteínas inflamatórias. Além disso, a maioria dos estudos que examinam eventos adversos após cirurgias cardíacas apresenta enfaticamente dados angiográficos. Poucos investigaram o impacto das alterações ocasionadas por intervenções cirúrgicas, como a revascularização miocárdica, e circulação extracorpórea (CEC) no metabolismo lipídico.

Avaliar o comportamento de estimativas de risco cardiovascular através do transporte reverso do colesterol, remodelamento de partículas lipoproteicas, incorporação *in vitro* do colesterol livre nas HDL e atividades da paraoxonase e da peroxidase endógena, antes e depois da CEC, é de grande interesse devido ao fato de que tal evento proporciona um ambiente de disfunção endotelial num curto espaço de tempo, possibilitando comparar dois momentos críticos do mesmo indivíduo, e determinar as consequências desta intervenção no *status* metabólico de pacientes cardiopatas.

Os dados gerados por esse estudo podem influenciar positivamente os protocolos e estratégias cirúrgicas atualmente utilizadas.

1.7 HIPÓTESE

H0 - A circulação extracorpórea (CEC) NÃO altera as enzimas e marcadores relacionados ao remodelamento de partícula de HDL.

H1 - A circulação extracorpórea (CEC) altera as enzimas e marcadores relacionados ao remodelamento de partícula de HDL.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivos Gerais

Avaliar o remodelamento de partículas de HDL, antes e depois da circulação extracorpórea (CEC), a partir da incorporação *in vitro* de colesterol livre (CL).

1.8.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar os fatores que podem influenciar o remodelamento das HDL, como a atividade da LCAT (lecitina acil transferase; fosfolipídios: colesterol acil transferase, EC 2.3.1.43), da paraoxonase (PON-1, EC 1.1.2) e participação da peroxidase endógena como medidas de risco cardiovascular.

2. Verificar a capacidade aceptora (incorporação) de CL nas HDL para avaliar o remodelamento das HDL e fase plasmática do transporte reverso do colesterol;

3. Determinar a atividade da Paraoxonase;

4. Determinar a atividade da Peroxidase Endógena;

5. Determinar a concentração apoA e apoB e a razão apoB/apoA.

2 METODOLOGIA

2.1 CASUÍSTICA

O grupo de estudo foi constituído por 15 pacientes de ambos os sexos, entre 21 e 75 anos, admitidos no Hospital Ana Neri, submetidos à cirurgia de Revascularização Miocárdica (RM) com Circulação Extracorpórea (CEC), selecionados por conveniência. Todos os indivíduos foram informados sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este projeto foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira da UFBA (CEP/MCO/UFBA), ofício nº 379, ref. V/Of. nº 02/2005, 27/09/2005 e, Parecer/Resolução Aditiva nº 075/2011.

2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Ambos os Sexos;
- Idade entre 21 e 75 anos;
- Termo de Consentimento Livre e Pré-esclarecido (TCLE) assinado;
- Realização de cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea no Hospital Ana Neri.

2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Indivíduos portadores de disfunção hepática (ALT e AST maior do que três vezes o valor superior de referência);
- Indivíduos portadores de disfunção renal (creatinina sérica > 2,0 mg/dL) e ou síndrome nefrítica (proteinúria > 1,0 g/L e albumina sérica < 3,0 g/l),

conforme informações contidas nos prontuários e obtidas junto à equipe médica;

- Indivíduos com disfunção tireoidiana, conforme informações contidas nos prontuários e obtidas junto à equipe médica;

2.4 DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS

Todas as determinações foram realizadas antes do início da cirurgia de revascularização miocárdica e trinta minutos depois de finalizada a CEC.

2.4.1 Determinações do perfil lipídico

As concentrações de colesterol total (CT), suas frações e triglicérides (TG) foram determinadas por métodos enzimáticos, reações de ponto final. O HDL colesterol (HDL-C) foi determinado por método homogêneo (LABEST, Brasil). As concentrações do colesterol de VLDL e LDL foram calculadas pela fórmula de FRIEDEWALD (1972). Foi utilizado o equipamento automatizado LabMax 240, *Clinical Chemistry Analyzer* (LABTEST, Brasil). Os resultados foram validados a partir da utilização, durante cada determinação, de amostra controle fornecida pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade PNCQ, da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

2.4.2 Determinação da concentração de apoA e apoB

As concentrações de apoA e apoB foram determinadas por imunonefelometria através do analisador automatizado IMAGE[®] (BeckmanCoulter, USA). Neste método determina-se a taxa de aumento da dispersão da luz causada por partículas em suspensão numa solução provenientes dos complexos formados durante reação antígeno-anticorpo. Os

valores de referência utilizados para apoA e apoB foram: apoA (90-170 mg/dL) e apoB (107-214 mg/dL).

2.4.3 Incorporação de colesterol livre (CL³H) nas HDL

A incorporação de CL³H foi determinada pelo método de substrato exógeno (CHANNON *et al.*, 1990). O plasma obtido das amostras dos participantes do estudo foi marcado com colesterol livre (CL³H), atividade final 0,7microCi/mL, e submetido a incubação por 3 horas a 37°C sob agitação. Decorrido o tempo, as partículas que contêm apoB foram precipitadas utilizando MgCl₂ (0,3 mol/L) e sulfato de dextran (0,2%), seguido de centrifugação e coleta do sobrenadante contendo HDL para determinação do percentual de CL³H que foi incorporado na partícula. A radioatividade presente em cada amostra foi determinada a partir da utilização de solução cintiladora (Ultima Gold – PerkinElmer, Boston, USA), utilizado o leitor de microplacas CHAMELEON™V – Hidex, para a reação de cintilação líquida. A incorporação do CL foi expressa como porcentagem de CL³H, incorporado por hora para as HDL (% CPM incorporado/h).

2.4.4 Determinação da atividade da paraoxonase

A atividade da paraoxonase foi determinada de acordo com o método descrito por Mackness *et al.*, 1998 e Senti *et al.*, 2003. Adiciona-se 140µL de tampão Tris-HCl 0.1M, pH 8.05 contendo 2mmol/L de CaCl₂ e 1.1 mmol/L de paraoxon (Sigma Chemical Co.) a 7µL de soro. A amostra é distribuída em placa de 96 poços fundo chato em duplicata. A leitura é feita em comprimento de onda de 405nm e temperatura de 37°C utilizando “Leitor de Microplacas” (Microplate Reader, Benchmark, BIO-RAD). Para cálculo da atividade, foram feitas 6 leituras em intervalo de 1 minuto cada, sendo que o resultado foi obtido multiplicando-se a média da variação das absorbâncias pelo fator.

Fator = $VTR \text{ (mL)} / \epsilon_{405} \times VA \text{ (mL)} \times E \text{ (cm)}$, onde:

VTR - Volume total da reação

VA – Volume da amostra

E – Espessura da cubeta

ϵ_{405} – $1805 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Logo, atividade da paraoxonase = Fator x $\Delta\text{abs}/\text{min}$

2.4.5 Determinação da atividade da peroxidase endógena

A atividade da Peroxidase Endógena foi determinada pelo teste colorimétrico *EPA Fast Track* da Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG[®] para determinação quantitativa da atividade da peroxidase endógena no soro ou plasma-EDTA. No presente estudo foi utilizado o soro dos pacientes. O princípio do teste baseia-se na reação de peróxidos com peroxidase, seguido de uma reação colorimétrica do substrato cromógeno tetrametilbenzidina. A cor azul torna-se amarela após a adição da solução de parada e pode ser medida fotometricamente a 450nm. A quantificação é adquirida através das diluições seriadas de uma solução padrão de peroxidase. A amostra foi distribuída em placa de 96 poços em duplicata e a leitura foi realizada no Microplate Reader, Benchmark, BIO-RAD.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de D'Agostino foi utilizado para testar a normalidade da distribuição dos dados, ou seja, quando a distribuição foi normal, teve-se evidência para utilizar testes para comparação e correlação paramétricos, teste t pareado e Pearson, quando não, utilizou-se teste não paramétrico, Wilcoxon e Spearman, respectivamente. Em todas as análises efetuadas, antes e depois, os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes

quando obtivemos p bicaudal $< 0,05$ para intervalo de confiança de 95%. Toda a análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 6.0 (USA).

3 RESULTADOS

O grupo de estudo foi composto por 15 pacientes com idade média de 63 ± 14 do sexo feminino ($n = 4$), e 58 ± 13 anos no sexo masculino ($n = 11$), variando entre 29 e 75 anos de idade. A tabela 1 apresenta a análise da casuística dos 15 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica (RM), segundo sexo e idade. É observada maior prevalência de pacientes do sexo masculino.

Tabela 1 - Classificação dos participantes do estudo estratificados por sexo e idade.

PACIENTES	(n=15)	%
Sexo F	04(15)	26,67
Idade	63 ± 14	
Sexo M	11(15)	73,33
Idade	58 ± 13	

A figura 2 mostra a distribuição dos participantes do estudo em estratos etários, 20 - 35 anos ($n = 1$), 36 - 45 anos ($n = 2$), 56 - 65 ($n = 5$) e 66 - 75 anos ($n = 7$). Nenhum dos pacientes do estudo encontrava-se no estrato etário entre 46 - 55 anos.

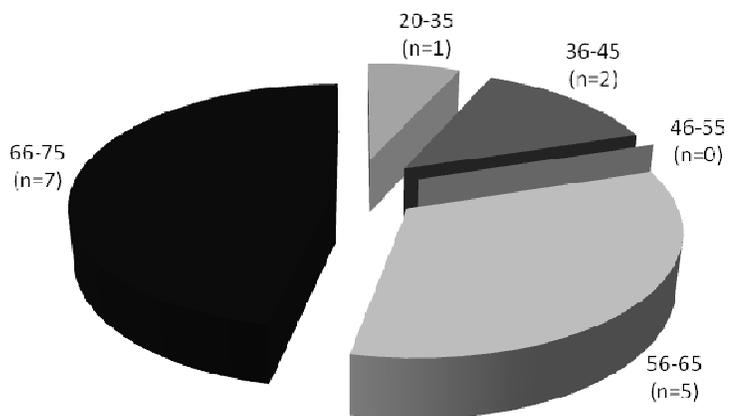


Figura 2 - Participantes do estudo estratificados por faixa etária.

O estrato etário com maior número de pacientes do sexo feminino foi o de 66 - 75 anos, n = 3 (figura 3). Apenas dois pacientes encontravam-se no estrato etário de 36 - 45 anos, um de cada gênero. Nenhum dos pacientes do sexo feminino encontrava-se nos grupos de 20 - 35 anos e 56 - 65 anos.

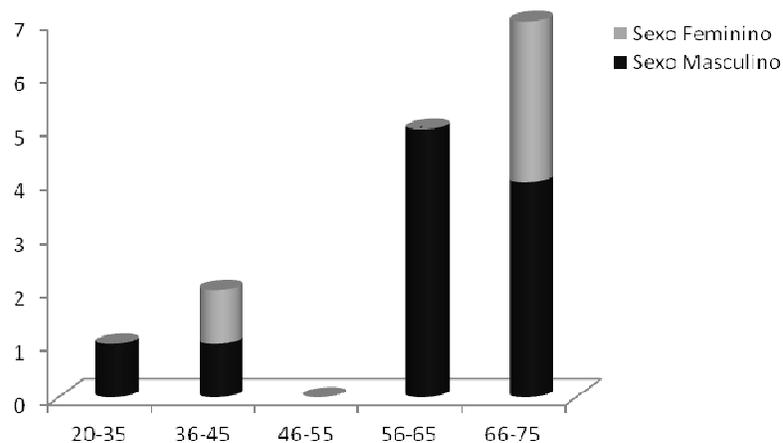


Figura 3 - Distribuição dos pacientes participantes do estudo por sexo, estratificados por faixa etária.

A figura 4 mostra a frequência dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares entre os pacientes submetidos à

cirurgia de revascularização miocárdica (RM), participantes do estudo. No grupo estudado, o fator de risco de maior prevalência foi hipertensão, seguida de dislipidemia, etilismo e tabagismo, respectivamente. O fator de risco de menor prevalência foi o diabetes.

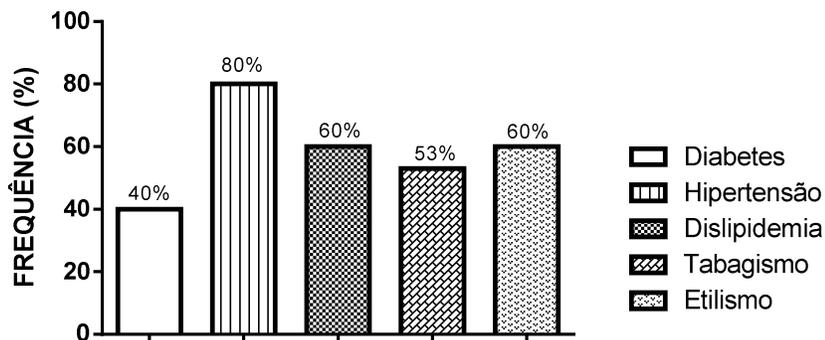


Figura 4 - Fatores de risco para doenças cardiovasculares, obtidos a partir dos dados dos prontuários dos pacientes.

A tabela 2 sumariza os resultados das determinações bioquímicas dos perfis lipídicos dos pacientes participantes do estudo, antes e depois da circulação extracorpórea (CEC). Nenhum dos pacientes fazia uso de hipolipemiantes no momento da coleta.

Tabela 2 - Perfil lipídico dos pacientes participantes do estudo submetidos à revascularização miocárdica (RM).

PACIENTES (n=15)	Antes da CEC	Depois da CEC	valor de <i>p</i>
CT (mg/dL) (n=15)	119 ± 42	89 ± 22	0,0007
TG (mg/dL) (n=14)	129 ± 60	51 ± 12	< 0,0001
HDL-C (mg/dL) (n=14)	29 ± 5	16 ± 3	< 0,0001
LDL-C (mg/dL) (n=15)	65 ± 31	61 ± 19	0,4382
VLDL-C (mg/dL) (n=14)	24 ± 9	10 ± 2	0,0001

Valores expressos em média ± desvio padrão, teste t, $p < 0,05$; presença de outlier (teste de Grubbs) significativos antes ou depois foram removidos.

A classificação das dislipidemias dos pacientes do estudo segundo os critérios da IV Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e Diretriz de Prevenção de aterosclerose (2007) é apresentada a seguir - figura 5. Foram identificadas três classes de dislipidemias entre os participantes: Hipertrigliceridemia associada a HDL-C baixo (n = 2); HDL-C isoladamente baixo (n = 11); dislipidemia mista - hipercolesterolemia associada à hipertrigliceridemia e HDL-c baixo (n = 1). Apenas um paciente fez parte da classificação normolipidêmico (n = 1).

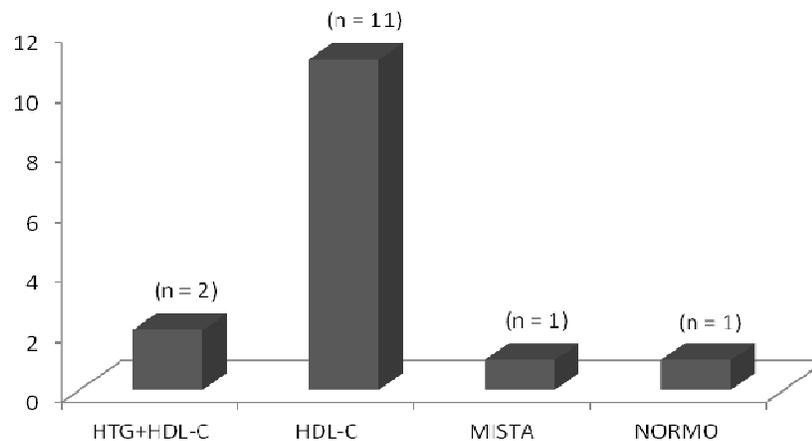


Figura 5 - Distribuição dos pacientes participantes do estudo segundo a classificação das dislipidemias. HTG+HDL-C: Hipertrigliceridemia associada a HDL-C baixo; HDL-C: Colesterol das HDL isoladamente baixo; MISTA: Dislipidemia Mista; NORMO: Normolipidêmico.

Na figura 6 observa-se a comparação da atividade da enzima paraoxonase (PON-1) dos pacientes participantes do estudo, antes e depois da circulação extracorpórea (CEC), onde se evidencia uma diminuição da atividade desta enzima após o evento da CEC ($p < 0,0001$).

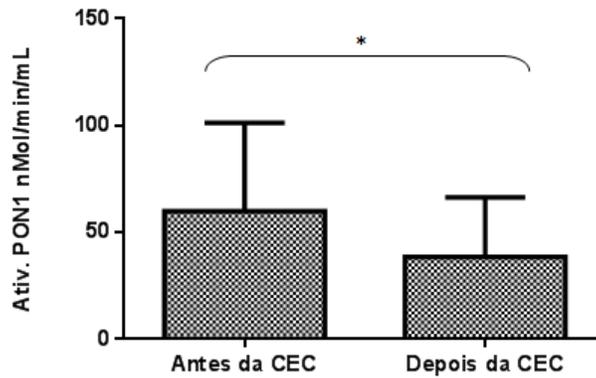


Figura 6 - Atividade da paraoxonase determinada por método espectrofotométrico nas amostras dos 15 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica (RM); comparação entre atividades Antes e Depois da Circulação Extracorpórea (CEC); Teste t Pareado; $p < 0,0001$, I.C. 95%. Depois da CEC vs Antes da CEC ($p < 0,05$); Antes da CEC $\bar{X} = 59,83$, $SD = 41,34$; Depois da CEC $\bar{X} = 38,62$, $SD = 27,85$.

Na figura 7 observa-se a comparação da atividade da peroxidase endógena dos pacientes submetidos à revascularização miocárdica (RM), antes e depois da circulação extracorpórea (CEC), onde constatamos aumento da atividade total da peroxidase endógena após o evento da CEC ($p = 0,0302$).

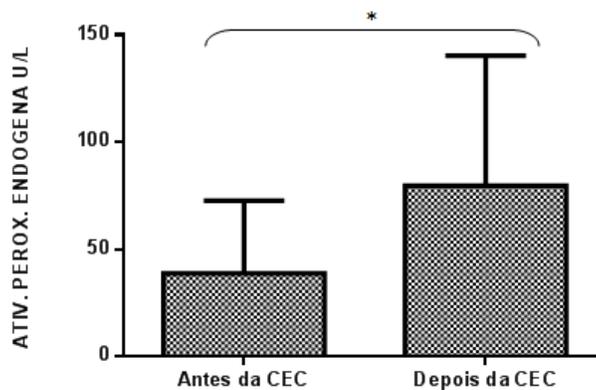


Figura 7 - Atividade da peroxidase endógena determinada por método colorimétrico nas amostras dos 15 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica (RM); comparação entre atividades Antes e Depois da Circulação Extracorpórea (CEC); Teste t Pareado; $p = 0,0302$; I.C. 95%. Depois da CEC vs Antes da CEC ($p < 0,05$); Antes da CEC $\bar{X} = 38,87$, $SD = 33,96$; Depois da CEC $\bar{X} = 79,73$, $SD = 60,61$.

As taxas de incorporação do colesterol livre (CL) nas HDL não foram diferentes quando comparadas antes e depois da CEC ($p = 0,2661$) (figura 8).

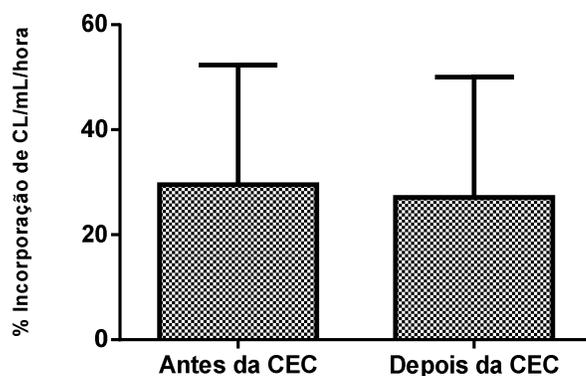


Figura 8 - Incorporação do colesterol livre (CL) nas HDL em pacientes submetidos à revascularização miocárdica (RM); comparação entre porcentagens Antes e Depois da Circulação Extracorpórea (CEC), avaliada pelo método do substrato exógeno utilizando CL ^{3H} segundo Channon *et al.*, 1990. Teste t Pareado; $p = 0,2661$; I.C. 95%. Depois da CEC vs Antes da CEC ($p > 0,05$); Antes da CEC $\bar{X} = 29,57$, $SD = 22,81$; Depois da CEC $\bar{X} = 27,10$, $SD = 22,91$.

Os resultados das concentrações das apolipoproteínas A e B (apoA, apoB) foram maiores antes da circulação extracorpórea (CEC) quando comparados com as concentrações depois da CEC (tabela 3). A razão de risco cardiovascular, TG/HDL-C (tabela 3), foi significativamente diferente após a CEC ($p = 0,0007$).

Tabela 3 - Concentração de apolipoproteínas e razões de risco dos pacientes submetidos à revascularização miocárdica (RM) antes e depois da circulação extracorpórea (CEC).

PACIENTES (n=15)	Antes da CEC	Depois da CEC	valor de p
apoA (mg/dL)	90 ± 24	54 ± 17	< 0,0001
apoB (mg/dL)	56 ± 21	40 ± 9	0,0005
TG/HDL-C	4,56 ± 1,92	3,10 ± 0,91	0,0007

Valores expressos em média ± desvio padrão, teste t, $p < 0,05$.

A razão apoB/apoA foi calculada para avaliar o risco cardiovascular, os resultados encontram-se na figura 9. Os pacientes apresentaram maior razão apoB/apoA depois da circulação extracorpórea (CEC) do que antes da CEC, embora não houve diferença significativa ($p = 0,1554$).

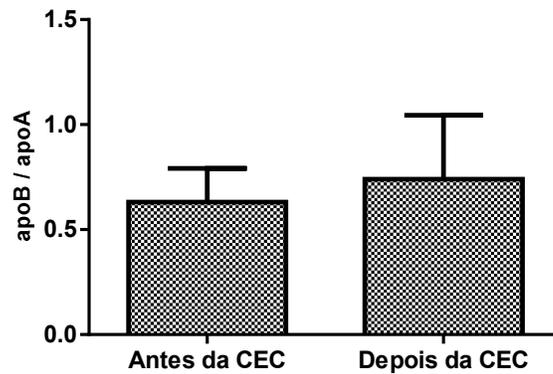


Figura 9 - Comparação da razão apoB/apoA Antes e Depois da Circulação Extracorpórea (CEC) em pacientes submetidos a revascularização miocárdica (RM). Teste t pareado; $p = 0,1554$; I.C. 95%. Depois da CEC vs Antes da CEC ($p > 0,05$); Antes da CEC $\bar{x} = 0,6313$, $SD = 0,1609$; Depois da CEC $\bar{x} = 0,74$, $SD = 0,3043$.

4 DISCUSSÃO

A casuística deste estudo apresenta, quando estratificados por grupo (normolipidêmico, hipertrigliceridemia associada à HDL-C baixo, HDL-C isoladamente baixo, dislipidemia mista) maior participação de pacientes caracterizados por HDL-C isoladamente baixo (figura 5). Tal fato evidencia o descrito na literatura: valores baixos de HDL-C são por si só, fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Foram identificados os seguintes fatores e marcadores de risco na população de estudo: dislipidemia, hipertensão, diabetes, tabagismo e etilismo (figura 4). Os fatores e marcadores de risco presentes na população estudada, baseando-se nos estudos realizados por Framingham *et al.*, 2009, caracterizam uma população susceptível ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, vasculares periféricas e cerebrovasculares, características presentes na população de países em desenvolvimento.

Foram determinados marcadores para avaliação do risco cardiovascular, das funções renal e hepática, razões de risco a partir do perfil lipídico e parâmetros associados, assim como, a determinação de parâmetros específicos como a atividade da paraoxonase (OLIVEIRA *et al.*, 2012 in press), incorporação de CL nas HDL (CHANON *et al.*, 1990) e determinação da atividade da paraoxonase e da peroxidase endógena.

Nas determinações bioquímicas dos perfis lipídicos dos pacientes participantes do estudo, antes e depois da circulação extracorpórea (CEC), as alterações mais significativas foram em partículas ricas em triglicérides (TG, $p < 0,0001$; HDL-C, $p < 0,0001$). Este resultado pode ser consequente, principalmente, ao uso de heparina ou ainda ao volume de perfusato usado durante a cirurgia, e até mesmo devido ao bloqueio feito com a administração de protamina. Assim como o trauma cirúrgico, os anestésicos administrados durante a cirurgia de revascularização podem induzir resposta inflamatória que ocasionam estresse oxidativo e mudanças no perfil lipídico (HACQUEBARD *et al.*, 2007).

Dentre as determinações mais específicas, tem-se a atividade da paraoxonase (PON-1) e da peroxidase endógena. Neste estudo, observa-se a

comparação da atividade da enzima paraoxonase (PON-1) dos pacientes antes e depois da CEC (figura 6), evidenciando diminuição significativa ($p < 0,0001$) da atividade desta enzima após o evento da CEC. Tal resultado pode ser devido ao catabolismo das partículas de HDL ou até mesmo à inativação da PON-1 associada as HDL pelos peróxidos lipídicos formados, prejudicando a atividade antioxidante da enzima (HACQUEBARD *et al*, 2007).

Mastorikou *et al.*, 2008, ao avaliar modificações nas HDL por glicação ou oxidação da paraoxonase, observaram que tais alterações afetam as propriedades anti-ateroscleróticas da lipoproteína, levando ao aumento da oxidação das células da parede arterial, aumento da inflamação na parede do vaso e aterosclerose. Segundo o estudo supracitado, a redução da atividade da paraoxonase pode ser considerada como um fator de risco independente para DAC.

Jayakumari e Thejaseebai, 2009, demonstraram que a atividade da PON-1 e a concentração de HDL-C estão significativamente reduzidos em pacientes com DAC diagnosticada, quando comparados com pacientes saudáveis. Ainda segundo este estudo, a atividade da PON-1 pode estar diminuída em pacientes tanto devido à diminuição da síntese como também à inativação da PON-1 por peróxidos lipídicos em condições de estresse oxidativo. Estes autores também demonstraram que, em pacientes com DAC, o estresse oxidativo avançado é caracterizado pelo aumento dos níveis de peróxidos lipídicos.

A comparação da atividade da peroxidase endógena dos pacientes submetidos à revascularização miocárdica, antes e depois da CEC (figura 7) revelou aumento da atividade total da peroxidase endógena após o evento da CEC ($p = 0,0302$). Este resultado pode ser decorrente do aumento da quantidade de hidroperóxidos e substrato enzimático disponível para as peroxidases, além da diminuição da atividade PON-1. Ao comparar os danos oxidativos decorrentes de cirurgia de revascularização miocárdica com CEC e sem CEC, Akila *et al.*, 2007, constatou que os níveis de glutathiona diminuíram em ambos os procedimentos, sendo que tal diminuição foi mais pronunciada em pacientes submetidos à RM com CEC. A atividade da catalase aumentou após a reperfusão, em ambos os procedimentos, contudo o aumento foi maior em pacientes submetidos à RM com CEC ($p < 0,0001$), sugerindo ativação do

sistema de defesa antioxidante para proteger os tecidos contra radicais livres. Ainda nesse estudo, segundo os autores, os dados obtidos sugerem que a peroxidação lipídica foi desencadeada pela reperfusão do coração isquêmico, que pode intensificar os danos e aumentar a extensão da necrose miocárdica.

A formação de produtos de oxidação fosfolipídica pode aumentar durante a primeira fase da reperfusão, dessa forma, radicais livres de oxigênio podem reagir com os lipídios das membranas celulares formando hidroperóxidos.

Na figura 8, observamos que as taxas de incorporação do colesterol livre marcado (CL^3H) nas HDL não foram diferentes quando comparadas antes e depois da CEC ($p = 0,2661$). O que pode ser interpretado deste resultado é que mesmo com a redução das HDL, a proporcionalidade da incorporação de CL^3H parece manter-se inalterada. Portanto, a atividade da LCAT se mostrou proporcional em relação às condições gerais, fenômeno esse provavelmente relacionado à estabilidade e quantidade das partículas de HDL presentes antes e depois da CEC.

Vale ressaltar que, no momento presente, a falta de outros estudos, utilizando a metodologia de incorporação, dificulta maiores interpretações e extrapolações de tais resultados.

Ainda não está bem esclarecida a relação entre transferências lipídicas e aterogênese. No metabolismo das HDL, após remoção do colesterol nos tecidos periféricos, ocorre a incorporação do colesterol livre nas HDL por esterificação e em seguida, transferência desse colesterol para outras lipoproteínas. Tal mecanismo é de extrema importância na maturação/remodelamento da lipoproteína de alta densidade (LIMA; COUTO, 2006).

Os resultados das concentrações das apolipoproteínas A e B (tabela 3) foram maiores antes da CEC (apoA, $p < 0,0001$; apoB, $p = 0,0005$). Este dado pode ser reflexo da associação física da apoA-I com a paraoxonase, ambas localizadas nas HDL, responsáveis pela diminuição da oxidação das LDL, protegendo contra a aterosclerose. Outro ponto importante a ser considerado é a instabilidade e fragilidade da partícula de HDL, daí, portanto a apoA estar tão diminuída. Em estudo avaliando a mortalidade e infarto do miocárdio, 30 dias, 60 dias, 12 meses, 24 meses e cinco anos após cirurgia de revascularização

miocárdica, Skinner *et al.*, 1999, constaram que a baixa concentração de apoA-I (e mais nenhum outro marcador de dislipidemia) apresentou uma associação consistente e independente com todas as causas de mortalidade e eventos cardíacos tardios. Segundo o estudo, a apoA-I possui papel importante na função do *RCT* das HDL e pode ser um melhor marcador de metabolismo do colesterol do que outras frações lipídicas analisadas.

Com o objetivo de caracterizar mudanças na composição de lipoproteínas plasmáticas induzidas pela cirurgia cardíaca com CEC, Hacquebard *et al.*, 2007, observaram significativa diminuição dos níveis de apoA-I e apoB, diminuição da atividade da paraoxonase, além da diminuição de LDL-C. Segundo este estudo, a diminuição da concentração de apoB na fração LDL ($p > 0,0001$), reflete uma redução proporcional do número de partículas circulantes de LDL-C. Além disso, a diminuição da concentração de apoA-I foi interpretada, principalmente, como resultado do aumento da taxa catabólica das partículas de HDL. O conteúdo de colesterol esterificado nas HDL diminuiu ($p < 0,02$) após a cirurgia, mas a razão HDL-C/apoA-I permaneceu a mesma.

A razão TG/HDL-C (tabela 3), foi significativamente diferente após a CEC ($p = 0,0007$), apresentando pacientes com fenótipo B, com perfil aterogênico evidenciado pela presença de LDL pequena e densa, visto que os resultados foram maiores que 1,9. O uso da razão TG/HDL-C é um importante parâmetro para avaliar risco cardiovascular, pois é indicador de tamanho de partícula de LDL (MARUYAMA *et al.*, 2003).

Na figura 9, observa-se que os pacientes apresentaram maior razão apoB/apoA depois da CEC quando comparado a antes da CEC, embora não houve diferença significativa ($p = 0,1554$). Este resultado evidencia o aumento do risco cardiovascular após a CEC, com perda de HDL e manutenção de apoB e LDL pequena e densa. A diminuição da concentração de apoA, associado ao aumento da concentração de apoB e elevada razão apoB/apoA são importantes preditores de risco cardiovascular. Juntos possuem maior poder em prever risco, em comparação com concentrações séricas de LDL-C, CT e TG (WALLDIUS *et al.*, 2001). A apolipoproteína B está presente em todas as partículas aterogênicas, enquanto que a apolipoproteína A está presente nas partículas anti-aterogênicas. Portanto, a razão apoB/apoA é uma

proporção entre partículas que contêm apoB, ricas em colesterol e aterogênicas, e partículas que contêm apoA, anti-aterogênicas (WALLDIUS; JUNGNER, 2004).

As determinações e estimativas (razões de risco) realizadas nesse estudo serviram para avaliar o comportamento do transporte reverso do colesterol e remodelamento de partículas lipoproteicas antes e depois do evento da CEC em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica, a partir da incorporação *in vitro* do colesterol livre nas HDL e da atividade da paraoxonase e da peroxidase endógena. Os resultados enfatizam o papel da cirurgia de revascularização miocárdica com CEC na alteração aguda do metabolismo lipoproteico, mostrando assim, a importância do acompanhamento e investigação clínica desses pacientes no pós-operatório.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo indica que a fase aguda da cirurgia de revascularização miocárdica com CEC, induz alterações importantes na concentração e composição das lipoproteínas, assim como redução da atividade da PON-1 e elevação da atividade da peroxidase endógena. Esses achados mostram alterações importantes nos mecanismos de defesa anti-aterogênicos após a cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea.

Limitações

As coletas foram iniciadas em outubro de 2011 e finalizadas em fevereiro de 2012, e nesse período inúmeras cirurgias de revascularização miocárdica foram suspensas ou remarcadas por motivos diversos, em maioria, clínicos ou logísticos. Esses fatos impactaram diretamente no quantitativo de pacientes selecionados para o estudo.

Ademais, com o modelo utilizado, não foi possível prever se foi o impacto do trauma cirúrgico com CEC ou a anestesia, os responsáveis pelos achados do estudo, individualmente ou o sinergismo entre eles, em particular, os prejuízos ao metabolismo lipoproteico e à ação dos antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- AKILA *et al.* Oxidative injury and antioxidants in coronary artery bypass graft surgery: off-pump CABG significantly reduces oxidative stress. **Clinica Quimica Acta**, v. 375, p. 147-152, 2007.
- BALCIUNAS, M.; *et al.* Markers of endothelial dysfunction after cardiac surgery: soluble forms of vascular-1 and intercellular-1 adhesion molecules. **Medicina (Kaunas)**, v. 45, n. 6, p. 434-439, 2009.
- BHATTACHARYA, T. *et al.* Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. **JAMA. Archives Journals**, 2011. Disponível em: <doi: 10.1001/jama.299.11.1265>. Acesso em: 08 abr 2012.
- BINDU G, H.; RAO, V. S., KAKKAR, V. Friends turns foe: Transformation of anti-inflammatory HDL to proinflammatory HDL during acute-phase response. **Hindawi Publishing Corporation Cholesterol**, 2011.
- CAGIRCI, G. *et al.* Association between paraoxonase activity an late saphenous vein graft occlusion in patients with coronary artery bypass grafting. **Kardiologia Polska**, v. 67, n. 10, p. 1063-1068, 2009.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. **Circulation Research**, v. 87, p. 840-844, 2000.
- CARAMORI, P. R. A.; ZAGO, A. J. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 75, n. 2, p. 163-172, 2000.
- CHANNON, K. M., *et al.* Investigation of lipid transfer in human serum leading to the development of an isotopic method for the determination of endogenous cholesterol esterification and transfer. **Atherosclerosis**, v. 80, p. 217-226, 1990.
- DOBIASOVA, M.; FROHLICH, J. Understanding the mechanism of LCAT reaction may help to explain the high predictive value of LDL/HDL cholesterol ratio. **Physiological Research**, v. 47, p. 387-397, 1998.

ESPER, R. J. *et al.* Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. **Cardiovascular Diabetology**, v. 5, n. 4, 2006.

FARRET, J. F. **Nutrição e doenças cardiovasculares: prevenção primária e secundária.** São Paulo: Atheneu, 2005.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. The acute phase response inhibits reverse cholesterol transport. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 682-684, 2010.

FERRETTI, G. *et al.* Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2957-2962, 2004.

FORGIONE, M. A.; LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. **Current Opinion in Cardiology**, v. 15, n. 6, p. 409-15, 2000.

FORSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **European Journal Physiology**, v. 459, p. 923-939, 2010.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. 672-679, 2006.

FRAMINGHAM *et al.* Predicting the 30-Year Risk of Cardiovascular Disease The Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 119, p. 3078-3084, 2009.

FRANCIS, A. A.; PIERCE, G. N. An integrated approach for the mechanisms responsible for atherosclerotic plaque regression. **Experimental & Clinical Cardiology**, v. 16, n. 3, p. 77-86, 2011.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 499-502, 1972.

HACQUEBARD, M. *et al.* Changes in plasma LDL and HDL composition in patients undergoing cardiac surgery. **Lipids**, v. 42, p. 1143-1153, 2007.

HIGASHI, Y. *et al.* Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. **Circulation Journal**, v. 73, p. 411-418, 2009.

JAYAKUMARI, N.; THEJASEEBAI, G. High prevalence of low serum paraoxonase-1 in subjects with coronary artery disease. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 45, p. 278-284, 2009.

LANDMESSER, U. High Density Lipoprotein – Should we raise it? **Current Vascular Pharmacology**. v. 10, p. 718-719, 2012.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 169-178, 2006.

MACKNESS, B. *et al.* Human Serum paraoxonase. **General Pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 329-336, 1998.

MARUYAMA, C. *et al.* Assessment of LDL particle size by Triglyceride/HDL-C ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 10, n. 3, p. 186-191, 2003.

MASTORIKOU, M. *et al.* Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. **Diabetic Medicine**, v. 25, p. 1049-1055, 2008.

MINEO, C.; SHAUL, P. W. PON-dering differences in HDL function in coronary artery disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2545-2548, 2011.

NAVAB, M. *et al.* The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. 145-149, 2009.

AFIUNE NETO, A. *et al.* Monocytosis is an independent risk marker for coronary artery disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, n. 3, p. 240-244, 2006.

ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE. **Estadísticas Sanitarias Mundiales** 2011.

PANAGIOTOPOULOS, I. *et al.* Alterations in Biomarkers of Endothelial Function Following On-Pump Coronary Artery Revascularization. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 24, p. 389-398, 2010.

PARK, J.G.; TAEG OH, G. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. **BMB Reports**, v. 44, n. 8, p. 497-505, 2011.

PASSOS, V. M. A. *et al.* Hipertensão Arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. **Epidemiologia e serviços de saúde**, v. 15, n. 1, p. 35-45, 2006.

PODREZ, E. A. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 7, p. 719-725, 2010.

ROSENBLAT, M. *et al.* Paraoxonase 1 (PON1) inhibits monocyte-to-macrophage differentiation. **Atherosclerosis**, v. 219, p. 49-56, 2011.

SANTOS, R. D. (Coord.) *et al.* III Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e Diretriz de Prevenção de aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 77, p. 1-48, 2001.

SENTI, M. *et al.* Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 11, p. 5422-5426, 2003.

SHUHEI, N. *et al.* Effect of composition and particle size on the resistance of HDL to the oxidation. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, n. 104, p. 1-10, 2010.

SKINNER, J. S. *et al.* High apolipoprotein AI concentrations are associated with lower mortality and myocardial infarction five years after coronary artery bypass graft surgery. **Heart**, v. 81, p. 488-494, 1999.

SPOSITO C.A. (Coord.) *et al.* IV Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e Diretriz de Prevenção de aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, p. 1-19, 2007.

WALLDIUS, G. *et al.* High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. **The Lancet**, v. 358, p. 2026-2033, 2001.

WALLDIUS, G.; JUNGNER, I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. **Journal of Internal Medicine**, v. 255, p. 188-255, 2004.

ZHAO, Y. *et al.* Association between PON1 activity and coronary heart disease risk: a meta analysis based on 43 studies. **Molecular Genetics and Metabolism**, 2011. Disponível em: <doi: 10.1016/j.ymgme.2011.09.018>. Acesso em: 05 nov 2011.

ANEXO

Procedimento Cirúrgico

Os pacientes foram submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica de acordo com procedimentos de rotina. A tática cirúrgica foi a de rotina no Hospital Ana Neri, ou seja: preparo do paciente com monitorização contínua de sua pressão arterial média, pressão venosa central, diurese e eletrocardiograma.

Após anestesia geral, os enxertos foram obtidos, quando necessário, pela retirada de segmentos da veia safena magna de um ou ambos os membros inferiores, pela dissecação de uma ou ambas as artérias torácicas internas, quando indicado, pela dissecação das artérias: gastroepiplóica direita, radial e epigástrica inferior.

A cirurgia habitualmente é realizada com o auxílio da circulação extracorpórea e parada cardíaca. Após a realização dos enxertos e recuperação dos batimentos cardíacos, a circulação extracorpórea é interrompida e inicia-se o processo de fechamento torácico e dos demais locais incisados para obtenção dos enxertos.

Ao final do procedimento, o paciente é enviado, ainda sob assistência ventilatória, à unidade de recuperação pós-operatória onde deverá permanecer até que tenha condições hemodinâmicas e gerais para que retorne ao leito de origem.

Os pacientes receberam alta hospitalar após sete ou oito dias, de acordo com sua condição geral.