



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIANA UBALDO BARBOSA PAIVA

*Metabolômica e escore tomográfico de Leaman
como métodos não invasivos para estratificação
de risco em pacientes assintomáticos com
escore de Framingham intermediário: um
estudo piloto translacional*

Brasília, 30 de março de 2023

MARIANA UBALDO BARBOSA PAIVA

Metabolômica e escore tomográfico de Leaman como métodos não invasivos para estratificação de risco em pacientes assintomáticos com escore de Framingham intermediário: um estudo piloto translacional

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Antibas Atik

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Maria Araújo Martins

Brasília, 30 de março de 2023

Agradecimentos

É justo que muito custe o que muito vale. Esta frase não é minha, mas me caiu como uma luva. Peguei emprestado de Santa Tereza Dávila. Confesso que não foram poucos os momentos em que tive que me lembrar dela para seguir adiante com o doutorado. É um processo difícil, eu diria que um misto de persistência e teimosia. Mas o fato é que o aprendizado que se tira daqui fez valer todo e qualquer esforço.

Realmente eu acredito que algo externo a nós tem um papel gigantesco no desenrolar da nossa vida. De fato, coisas incríveis acontecem quando dizemos: “Deus, seja feita a sua vontade”. Começo agradecendo a Ele, porque o simples fato de acordar todos os dias já é um milagre. Agradeço por Ele nos permitir vivenciar este momento. Permitir eu estar viva, com saúde e por vocês todos fazerem parte desta história. É Deus que permite que a gente enxergue melhor e mais longe. E a primeira frase que ele sussurrou no meu ouvido e entrou direto no meu coração quando sentei para escrever este texto de agradecimento foi: “Qualquer que seja sua luta, não existe vitória pessoal. Toda, toda vitória é coletiva”.

Agradeço aos meus pais, Mariangela e Antonio, por terem me dado a vida não uma, mas inúmeras vezes. Vocês dois sempre me ajudaram a enfrentar situações difíceis sem me perder nelas, cada um à sua maneira. Ao praticarem pequenos atos de gentileza e amor ao próximo no dia a dia com desconhecidos, vocês me ensinaram a como promover o ordinário à sagrado, demonstrando que se a gente oferecer o nosso melhor, não tem erro: a vida retribui.

Agradeço ao meu marido e companheiro Diego. Pelo apoio e presença nos momentos mais difíceis. E pelas risadas nos mais engraçados. Existem conexões que não podem ser explicadas, só sentidas. Quando isso acontece, quando você mora no coração de alguém e este mesmo alguém mora no seu, este é o lugar mais bonito que você pode habitar. Quando a gente sente que mora no coração de alguém a única coisa que podemos fazer é honrar ao máximo este lugar. Sempre foi amor. Obrigada por tudo, sempre!

Aos meus filhos, João e Luísa, meus presentes nesta jornada da vida! Vocês são como tinta colorida para os meus dias mais nublados. Pode parecer meio clichê, mas parece que depois que se vira mãe passamos a ter uma bússula interna que sempre aponta para a mesma direção.

Estendo meu agradecimento a todos os meus familiares. Especialmente aos meus irmãos queridos, Guilherme e Eduardo e à Tia Selma, grande incentivadora para que eu buscasse realizar os meus sonhos; uma referência para mim dentro e fora da Medicina. Aqui no agradecimento aos familiares, incluo Têssia Regina, a amiga que virou irmã e há mais de 20 anos faz parte da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Fernando Atik, pela convivência e aprendizado que o senhor me proporcionou nestes anos de trabalho, por ter acreditado e incentivado este projeto translacional quando ele ainda era só uma ideia, pela sua competência técnica aliada à sua sempre postura de otimismo e tranquilidade, fica aqui minha eterna gratidão.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Francisco Laurindo, Dr. Guilherme Uripia, Dr. Carlos Rassi e Dr. Daniel França, todos expoentes em suas áreas, saibam que é uma grande honra para mim a presença de vocês. Muito obrigada por terem aceitado o convite de participar desta banca.

Aos meus amigos do Hospital de Base, da Cardioclínica, do Procardiológico e do UNIEURO, o meu muito obrigada pela parceria de sempre. Aprendi e sigo aprendendo sempre com vocês. À Dr^a. Viviane Rocha, da Unidade de Lípidos do Instituto do Coração (InCor-USP), e à Prof^a. Dr^a. Marina Tavares, da Faculdade de Química da USP, pelas enormes contribuições na minha qualificação. À Prof^a. Dra. Coral Barbas e a toda a sua equipe do CEMBio da Universidade de San Pablo, em Madri, na Espanha, pela cooperação no processamento das nossas amostras. À Universidade de Brasília, e especialmente ao Alessandro, secretário da pós-graduação da Faculdade de Medicina, por fazer seu trabalho com tanto zelo, prontidão e eficácia. A todos os 40 participantes do trabalho que, voluntariamente, se dispuseram a ajudar com a ciência e tornaram possível a realização desta tese, o meu muito obrigada!

Agradeço muito a toda equipe da Cardiologia Translacional. Aos alunos PIBIC, Leonardo Jadyr e Henrique Louzan, por terem participado deste trabalho durante sua graduação. À Raphaela Menezes e Carolina Picossi, que me ensinaram muito durante todo o processo. Foram noites adentro discutindo tabelas, matrizes, estatísticas, escrevendo e revisando textos. Nada que eu disser aqui será suficiente para traduzir minha gratidão a vocês duas. Só desejo que nossa amizade continue a crescer para além da Universidade.

Aprendi na prática que trabalhos complexos envolvem esforços colaborativos. Vivenciei a realidade de que para se fazer pesquisa temos que ter 3 pilares: o Pesquisador, a Instituição e Orçamento. Mas para que ela seja translacional de verdade tem que haver um diferencial; tem que existir uma cultura de integração. Cooperação de áreas afins. E esta habilidade de conexão poucos têm. Isto é privilégio de poucos. Isto quem faz com maestria é a professora Aline Martins. Uma frase atribuída a Antoine de Saint Exupéry diz que se você quer construir um navio, não chame as pessoas para juntar madeira ou atribua-lhes tarefas e trabalho, mas, sim, ensine-os a desejar a infinita imensidão do mar. Você faz isso com seus alunos, professora: os faz desejar a infinita imensidão do mar do conhecimento. Obrigada por me permitir beber desta fonte!

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas.....	12
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	13
Capítulo 1 – Considerações Gerais.....	17
1. Relevância do tema e panorama geral.....	18
2. Biologia da aterosclerose e formação das placas.....	20
3. Curso temporal do ateroma: heterogeneidade das placas.....	23
4. Placa vulnerável e aterotrombose: mudança de paradigma.....	26
5. Avaliação da aterosclerose por angio TC coronariana.....	33
5.1. Escore de Leaman Adaptado (CT-LeSc)	36
6. Estratificação do risco cardiovascular na prática clínica.....	40
6.1. Escore de Risco de Framingham.....	41
6.2. Por que estudar o grupo intermediário?.....	42
6.3. Abordagem prática no grupo intermediário: reclassificação do risco.....	43
6.4. Limitações dos critérios atuais.....	45
7. Biomarcadores e a estratégia translacional nas pesquisas médicas.....	49
8. Uso da abordagem <i>multiômica</i> nos estudos de prospecção de biomarcadores.....	50
8.1. Metabolômica.....	53
8.2. Lipidômica: o ramo da metabolômica no cenário da aterosclerose.....	54
9. Espectrometria de massas.....	56
9.1. Conceito de espectrometria de massas	56
9.2. Papel da espectrometria de massas na cardiologia translacional.....	58
10. Objetivos.....	61
10.1. Objetivo geral.....	61
10.2. Objetivos específicos.....	61
11. Justificativa.....	62
12. População do estudo.....	64
12.1. Critérios de inclusão.....	66
12.2. Critérios de exclusão.....	67
12.3. Riscos.....	67
12.4. Benefícios.....	67
12.5. Dados clínico-epidemiológicos.....	68
13. Material suplementar.....	70
14. Referências.....	71

Capítulo 2 – Análise metabolômica por GC-MS.....	81
1. Uso da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) na prospecção de biomarcadores de aterosclerose coronariana.....	82
2. A técnica GC-MS.....	83
3. Análise metabolômica de amostras de plasma por GC-MS.....	84
3.1. Preparo da amostra.....	84
3.2. Preparo da amostra de controle de qualidade.....	85
3.3. Instrumentação e análise.....	85
3.4. <i>Worklist</i> da análise.....	86
3.5. Tratamento dos dados.....	86
4. Resultados.....	87
4.1. Placa <i>versus</i> Controle.....	88
4.1. Alto CT-LeSc <i>versus</i> Controle.....	91
4.1. Alto CT-LeSc <i>versus</i> Baixo CT-LeSc.....	93
5. Discussão.....	96
5.1. Associação de aminoácidos e DAC.....	96
5.2. Associação de outros ácidos orgânicos e DAC.....	98
5.3. Associação de açúcares e DAC.....	99
5.3. Associação de ácidos graxos e DAC.....	99
6. Limitações.....	102
7. Conclusão.....	103
8. Material suplementar.....	104
9. Referências.....	112

Capítulo 3 – Análise metabolômica por LC-MS.....116

1. Uso da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) na prospecção de biomarcadores de aterosclerose coronariana.....	116
2. A técnica LC-MS.....	121
3. Análise metabolômica de amostras de plasma por LC-MS.....	122
3.1. Preparo da amostra.....	122
3.2. Preparo da amostra de controle de qualidade.....	122
3.3. Instrumentação e análise.....	122
3.4. <i>Worklist</i> da análise.....	123
3.5. Tratamento dos dados.....	123
4. Resultados.....	125
4.1. Placa <i>versus</i> Controle.....	125
4.1. Alto CT-LeSc <i>versus</i> Controle.....	128
4.1. Alto CT-LeSc <i>versus</i> Baixo CT-LeSc.....	130
4.2. Tercil 3 de Leaman (T3) <i>versus</i> Controle.....	132
4.3. Tercil 3 de Leaman (T3) <i>versus</i> Tercil 1 de Leaman (T1).....	134

5. Discussão.....	137
6. Conclusão.....	141
7. Material suplementar.....	142
8. Referências.....	146
Capítulo 4 – Apêndice.....	149

RESUMO

Paiva, M.U.B. *Metabolômica e escore tomográfico de Leaman como métodos não invasivos para estratificação de risco em pacientes assintomáticos com escore de Framingham intermediário: um estudo piloto translacional* [Tese]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2023.

A detecção precoce de aterosclerose subclínica em pacientes com risco intermediário de Framingham é uma grande necessidade clínica não atendida e testes adicionais são recomendados para personalizar as estimativas de risco. A revelação prognóstica do escore de Leaman adaptado à TC aliada à análise de potenciais candidatos a biomarcadores por perfil metabolômico abrangente pode aprofundar o conhecimento atual do fenótipo dos pacientes e ser utilizada como técnica complementar para re-estratificação do risco. Levantamos a hipótese de que o escore CT-LeSc é capaz de discriminar diferentes perfis metabolômicos em indivíduos de risco intermediário e auxiliar os médicos na tomada de decisão para melhor estratificar esses pacientes. Estudamos 40 indivíduos com risco CV intermediário pelo escore de Framingham, subdividindo-os de acordo com a presença ou ausência de DAC, avaliada por angiotomografia computadorizada. Eles foram recrutados em três grupos de acordo com o escore CT-LeSc (baixo ≤ 5 , alto > 5 e Controle) e outra análise em quatro grupos de acordo com os tercis de CT-LeSc (T1: 0,3-3,7; T2: 3,8-8,2; T3: 8,3-24,1 e Controle). A análise metabolômica do soro dos pacientes em cada grupo foi executada com uma abordagem global baseada em cromatografia líquida de desempenho não direcionado acoplada à espectrometria de massa de tempo de voo (LC-QTOF/MS) e em cromatografia gasosa (GC MSMS). Os dados foram analisados entre janeiro de 2018 e julho de 2020. Entre os pacientes, 28 (70%) apresentavam placas identificáveis na árvore coronária; destes, 16 pacientes (40%) eram de alto risco, 12 (30%) eram de baixo risco e 12 (30%) eram controles. Na abordagem GC MSMS, altas concentrações de ácido pipecólico, 2-hidroxi-3-metibutírico, ácido palmítico, ácido oleico, asparagina, ácido linoleico, L-fenilalanina, ácido L-glutâmico foram encontradas no grupo controle, enquanto a L-5-oxoprolina foi expressa de forma mais intensa no grupo Alto CT-LeSc quando comparada aos grupos Baixo CT-LeSc e Controle. O modelo sPLS-DA teve uma baixa taxa de erro de classificação incorreta e o valor da área sob as curvas ROC foi de 0,789 (95% CI: 0,559-0,952), 0,734 (95% CI: 0,424-0,955) e 0,654 (95% CI: 0,389-0,812) no grupo placa vs controle, grupo Alto-CT LeSc vs controle e grupo Alto-CT LeSc vs. Baixo-CT LeSc, respectivamente. Na abordagem LC MSMS, os dados mostram perfil metabólito discriminante entre os fenótipos extremos do grupo intermediário (Alto CT-LeSc *versus* Controle e T3 *versus* Controle), com AUC de 0,926 e 0,967, respectivamente. Neste estudo piloto, prospectivo e translacional, a análise metabolômica revelou impressões digitais metabólicas discriminatórias de fenótipos de CT-LeSc alto e T3, apesar de perfis de risco CV intermediários comparáveis com controles, o que parece indicar, mesmo nesta análise global, um indício de haver uma assinatura molecular discriminante para estes pacientes. Em última análise, um agrupamento específico de metabólitos, em vez de um único marcador, pode melhorar a compreensão biológica do risco de DCV.

Palavras-chave: escore CT-LeSc, metabolômica, doença arterial coronariana (DAC), estratificação de risco cardiovascular, pesquisa translacional, espectrometria de massa, GC e LC-QTOF/MS.

ABSTRACT

Paiva, M.U.B. *Metabolomics and Leaman CT score as non-invasive methods for risk stratification in asymptomatic patients with intermediate Framingham score: a translational pilot study* [Thesis]. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 2023.

Early detection of subclinical atherosclerosis on patients with Framingham intermediate risk is a major unmet clinical need and additional tests are recommended to personalize the risk estimates. A prognostic revelation of CT-adapted Leaman score coupled with the analysis of potentials candidates for biomarkers by comprehensive metabolomic profile can deepen the current knowledge of the phenotype of patients and be used as a complementary technique for re-stratification of the risk. To test the hypothesis that CT-LeSC is able to discriminate different metabolomic profiles in intermediate risk subjects and aid physicians in the decision-making in order to better stratify these patients. We studied 40 subjects with an intermediate CV risk profile, subdividing them according to the presence or absence of CAD, assessed by computed tomography angiography. They were recruited into three groups according to CT-LeSc score (Low: < 5 and High > 5), and Control, and another analysis in four groups according to CT-LeSc tertiles (T1: 0.3-3.7; T2: 3.8-8.2; T3: 8.3-24.1 and Control). Metabolomic analysis of serum from patients in each group was performed with a global approach based on undirected performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF/MS) and gas chromatography (GC MSMS). Data were analyzed between January 2018 and July 2020. Among the patients, 28 (70%) had identifiable plaques in the coronary tree; of these, 16 patients (40%) were high-risk, 12 (30%) were low-risk, and 12 (30%) were controls. In the GC MSMS approach, high concentrations of pipercolic acid, 2-hydroxy-3-methylbutyric acid, palmitic acid, oleic acid, asparagine, linoleic acid, L-phenylalanine, L-glutamic acid were found in the control group, while L-5- oxoproline was expressed more intensely in the High CT-LeSc group when compared to the Low CT-LeSc and Control groups. The sPLS-DA model had a low misclassification error rate and the value of the Area Under Curve (AUC) from ROC curves was 0.789 (95% CI: 0.559-0.952), 0.734 (95% CI: 0.424-0.955) and 0.654 (95% CI: 0.389-0.812) in the plaque group vs control, High-CT LeSc group vs control and High-CT LeSc group vs Low-CT LeSc, respectively. In the LC MSMS approach, the data show a discriminating metabolite profile between the extreme phenotypes of the intermediate group (High CT-LeSc versus Control and T3 versus Control), with AUC of 0.926 and 0.967, respectively. In this pilot, prospective, translational study, metabolomics analysis revealed discriminatory metabolic fingerprints of high CT-LeSc and T3 phenotypes, despite comparable intermediate CV risk profiles with controls, which seems to indicate, even in this global analysis, a hint of there may be a discriminating molecular signature for these patients. Ultimately, a specific grouping of metabolites, rather than a single marker, may improve the biological understanding of CVD risk.

Keywords: CT-LeSc score, metabolomics, Coronary Arterial Disease (CAD), cardiovascular risk stratification, translational research, mass spectrometry, GC and LC-QTOF/MS.

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1. A estrutura da parede arterial.....	21
Figura 2. Fases do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas.....	22
Figura 3. Corte transversal de uma artéria coronária com placa.....	24
Figura 4. Lesão aterosclerótica em uma artéria humana.....	24
Figura 5. Erosão de uma placa aterosclerótica.....	25
Figura 6. Comparação das características dos ateromas humanos.....	26
Figura 7. Representação esquemática da placa vulnerável.....	27
Figura 8. Evolução de placa aterosclerótica.....	28
Figura 9. Exemplo de um paciente com SCA) 6 meses após a angiografia por TC.....	29
Figura 10. Resultado do estudo PROSPECT.....	30
Figura 11. Papel da cura da placa na história natural da doença cardíaca isquêmica.....	31
Figura 12. Mudanças no conceito de doença arterial coronariana 1980-2020.....	32
Figura 13. Caracterização da placa coronária por CCTA.....	34
Figura 14. Três exemplos de casos de pacientes com DAC não obstrutiva estratificados por diferentes escores de carga aterosclerótica coronariana.....	38
Figura 15. Curva ROC do escore CT-LeSc para a previsão de eventos cardíacos graves.....	39
Figura 16. Volumes das placas ateroscleróticas.....	48
Figura 17. Os estudos multiômicos.....	52
Figura 18. Fluxograma de trabalho na metabolômica.....	54
Figura 19. Oito categorias de lipídios com suas estruturas químicas representativas.....	56
Figura 20. Componentes de um espectrômetro de massas.....	57
Figura 21: Esforço amostral.....	64
Figura 22. Seleção dos pacientes e métodos do estudo.....	66

CAPÍTULO 2

Figura 23. Analisador GC/MS.....	83
Figura 24. Análise discriminante de mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) na comparação Placa vs Controle.....	89
Figura 25. Curvas ROC obtidas com metabólitos selecionados (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA na comparação Placa vs Controle.....	89
Figura 26. Acurácia de previsão pelo modelo sPLS-DA na comparação Placa vs Controle.....	90
Figura 27. Metabólitos discriminantes validados pela curva ROC na comparação Placa vs Controle.....	90
Figura 28. Análise discriminante de mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) na comparação Alto CT-LeSc vs Controle.....	91
Figura 29. Curvas ROC obtidas com metabólitos selecionados (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA na comparação Alto CT-LeSc vs Controle.....	92
Figura 30. Acurácia de previsão pelo modelo sPLS-DA na comparação Alto CT-LeSc vs Controle.....	92

Figura 31. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Alto CT-LeSc vs Controle.....	93
Figura 32. Análise discriminante de mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc	94
Figura 33. Curva ROC obtida com características selecionadas (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc.....	94
Figura 34. Acurácia de predição pelo modelo sPLS-DA na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc.....	95
Figura 35. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc.....	95
Figura Supl. 1. Gráficos de escores dos Tercis 1 (T1) vs Tercil 2 (T2) vs Tercil 3 (T3) de Leaman vs Controle.....	104
Figura Supl. 2. Gráficos de escores do Tercil 1 de Leaman (T1) vs Controle	104
Figura Supl. 3. Gráficos de escores do Tercil 2 de Leaman (T2) vs Controle.....	105
Figura Supl. 4. Gráficos de escores do Tercil 3 de Leaman (T3) vs Controle	105
Figura Supl. 5. Gráficos de escores do Tercil 1 de Leaman (T1) vs Tercil 2 de Leaman (T2).....	106
Figura Supl. 6. Gráficos de escores do Tercil 1 de Leaman (T1) vs Tercil 3 de Leaman (T3).....	107
Figura Supl. 7. Gráficos de escores do Tercil 2 de Leaman (T2) vs Tercil 3 de Leaman (T3).....	108
Figura Supl. 8. Análise de PCA e PLS-DA de pacientes com Placa e Controle	109
Figura Supl. 9. Análise de PCA e PLS-DA de pacientes com Alto CT-LeSc e Controle.....	109
Figura Supl. 10. Análise de PCA e PLS-DA de pacientes com Alto CT-LeSc e Baixo CT- LeSc.....	110
Figura Supl. 11. Análise de PCA das amostras do QC.....	110
Figura Supl. 12. Metabólitos discriminantes na análise univariada pelo teste T de Student.....	111

CAPÍTULO 3

Figura 36. Expansão rápida da lipidômica na pesquisa de DCV.....	118
Figura 37. Representação da técnica híbrida LC/MS.....	121
Figura 38. Representação esquemática das porções obtidas com aplicação do (protocolo de Bligh-Dyer modificado).....	122
Figura 39. Gráficos da comparação Placa vs Controle.....	126
Figura 40. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Placa vs Controle....	126
Figura 41. Mapa de calor (Heatmap) da comparação Placa vs Controle.....	127
Figura 42. Gráficos da comparação Alto CT-LeSc vs Controle.....	128
Figura 43. Gráficos da comparação Alto CT-LeSc vs Controle após remoção de 2 amostras do Controle.....	129
Figura 44. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Alto CT-LeSc vs Controle.....	129
Figura 45. Mapa de calor (Heatmap) da comparação Alto CT-LeSc vs Controle.....	130
Figura 46. Gráficos da comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc.....	131
Figura 47. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc.....	131
Figura 48. Mapa de calor (Heatmap) da comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc.....	132
Figura 49. Gráficos da comparação Tercil 3 (T3) vs Controle.....	133
Figura 50. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Tercil 3 (T3) vs Controle.....	133
Figura 51. Mapa de calor (Heatmap) da comparação T3 vs Controle.....	134

Figura 52. Gráficos da comparação Tercil 3 (T3) vs Tercil 1 (T1).....	135
Figura 53. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação T3 vs T1.....	135
Figura 54. Mapa de calor (Heatmap) da comparação T3 vs T1.....	136
Figura Supl. 13. LIPIDOMIX®	141
Figura Supl. 14. Distribuição do sinal (log ₂) antes e depois do preenchimento dos valores ausentes (<i>missing values</i>).....	142
Figura Supl. 15. Distribuição das intensidades de sinal de todas as amostras pré-normalização.....	142
Figura Supl. 16. Cromatogramas de íons extraídos para o conjunto de padrões internos.....	143
Figura Supl. 17. Distribuição das intensidades de sinal de todas as amostras pré-normalização.....	143
Figura Supl. 18. Comparação entre abundâncias (log ₂) de dados brutos, dados em escala mediana e dados normalizados.....	145
Figura Supl. 19. Análise de PCA na comparação com Placa e Controle.....	145

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Fatores de ponderação do CT-LeSc.....	37
Tabela 2. Características clínicas dos participantes (Controle, CT-LeSc alto e baixo).....	69
Tabela Supl. 1. Características clínicas dos participantes (Controle, T1, T2 e T3).....	70

CAPÍTULO 3

Tabela 3. Compilação de trabalhos com abordagem lipidômica e LC-MS.....	120
---	-----

Lista de abreviaturas e siglas

ACC – do inglês “*American College of Cardiology*” (Colégio Americano de Cardiologia)
ACD – Artéria Coronária Direita
ACX – Artéria Coronária Circunflexa
ADA – Artéria Coronária Descendente Anterior
AHA – do inglês “*American Heart Association*” (Associação Americana do Coração)
ANOVA – do inglês “*Analysis of Variance*” (Análise de Variância)
AUC – do inglês “*Area Under the Curve*” (Área Sob a Curva)
BCAA – do inglês “*Branched Chain Amino Acid*” (Aminoácidos de Cadeia Ramificada)
BCKA – α -ceto-ácidos de cadeia ramificada
BRA – Bloqueador do Receptor de Angiotensina
CAC score – *Coronary Artery Calcium Score* (Escore de Cálcio da Artéria Coronária)
CAD-RADS – do inglês “*Stenosis-Severity Component of the Coronary Artery Disease - Reporting and Data System*”
CCTA – do inglês “*Coronary Computed Tomography Angiography*” (Angiografia Coronária por Tomografia)
CE – Éster de Colesterol
CL – Lesões Culpadas
CML – Células Musculares Lisas
CRVM – Cirurgia de Revascularização Miocárdica
CT – Colesterol total
CT-LeSc – do inglês “*CT-adapted Leaman Score*” (Escore de Leaman adaptado)
CTRL – Controle
DAC – Doença Arterial Coronariana
DAC-P - Doença Arterial Coronariana Prematura
DCV – Doença Cardiovascular
DDVE - Diâmetro Diastólico do Ventrículo Esquerdo
DG – Diacilglicerol
DILA – Dilatação Fluxo-Mediada da Artéria Braquial
DP – Descendente Posterior
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
EMI – Espessura Média-Intimal
ESC – do inglês “*European Society of Cardiology*” (Sociedade Europeia de Cardiologia)
FEVE – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
FRS – do inglês “*Framingham Risk Score*” (Escore de Risco de Framingham)
FV – Fibrilação Ventricular
GC – do inglês “*Gas Chromatography*” (cromatografia gasosa)
HDL – do inglês “*High Density Lipoprotein*” (Lipoproteína de Alta Densidade)
HPLC – do inglês “*High Performance Liquid Chromatographic*” (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HU - Unidades Hounsfield
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio
IC – Intervalo de Confiança
ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular
IFN – Interferon
IGF-1 – do inglês “*Insulin-Like Growth Factor 1*” (Fator de crescimento semelhante à insulina)

IMC – Índice de Massa Corporal
ITB – Índice Tornozelo-Braquial
KW – Kruskal-Wallis
LBPQ/UnB – Laboratório de Química e Bioquímica de Proteínas da Universidade de Brasília
LC – “*Liquid Chromatography*” (Cromatografia Líquida)
LDL – do inglês “*Low Density Lipoprotein*” (Lipoproteína de Baixa Densidade)
LPC – do inglês “*Lysophosphatidylcholine*” (Lisofosfatidilcolina)
m/z – do inglês “*Mass-to-charge*” (Massa/Carga)
MF – do inglês “*Molecular Features*”
MG – Monossialodihexosilgangliosídeo
MMP – Metaloproteinases
MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas
MS – do inglês “*Mass Spectrometry*” (Espectrometria de Massas)
MS/MS – do inglês “*Tandem Mass Spectrometry*” (Espectrometria de Massas em Sequência)
mTORC1 – Complexo 1 de Rapamicina
NCL – Lesões não culpadas
OPLS-DA – do inglês “*Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*” (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais)
PA – do inglês “*Phosphatidic acid*” (Ácido Fosfatídico)
PC – do inglês “*Phosphatidylcholine*” (Fosfatidilcolina)
PCA – do inglês “*Principal Component Analysis*” (Análise dos Componentes Principais)
PC – do inglês “*Phosphatidylcholine*” (Fosfatidilcolina)
PE – do inglês “*Phosphatidyletanolamine*” (Fosfatidiletanolamina)
PCR-us – Proteína C Reativa ultrassensível
PI – do inglês “*Phosphatidylinositol*” (Fosfatidilinositol)
PLS-DA – do inglês “*Partial Least Square Discriminant Analysis*” (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)
PPAR α – Proliferador de receptores de peroxissoma α
PPAR γ – Proliferador de receptores de peroxissoma γ
PS – “*Phosphatidylserine*” (Fosfatidilserina)
QC – “*Quality Control*” (Controle de Qualidade)
RI – do inglês “*Retention Index*” (Índice de Retenção)
SCA – Síndrome Coronariana Aguda
SIS – do inglês “*Segment Involvement Score*” (Escore de Envolvimento do Segmento)
SM – do inglês “*Sphingomyelin*” (Esfingomiélinea)
sPLS-DA – do inglês “*sparse PLS Discriminant Analysis*” (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Esparsos)
SSS – do inglês “*Segment Stenosis Score*” (Escore de Estenose de Segmento)
T1 – Tercil 1 do escore de Leaman adaptado
T2 – Tercil 2 do escore de Leaman adaptado
T3 – Tercil 3 do escore de Leaman adaptado
TAG – Triacilglicerídeo
TC – Tomografia Computadorizada
TCE – Tronco de Coronária Esquerda
TCFA – do inglês “*Thin Cap Fibroatheroma*” (Fibroateroma de Capa Fina)
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1 – Células T auxiliares tipo 1
Th2 – Células T auxiliares tipo 2

TQ - Triplo espectrômetro de massa Quadrupolo

VCAM – Molécula de adesão vascular

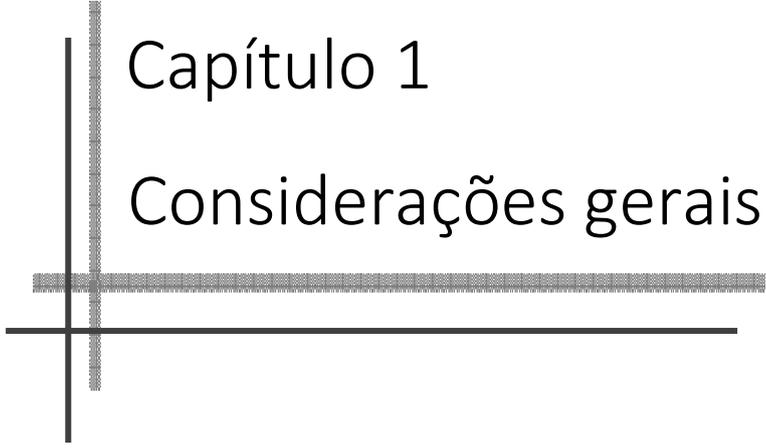
VF – Valores Faltantes

VIP score – do inglês “*Variable Importance in Projection Score*” (Escore de Variáveis Importantes na Projeção)

VLDL – do inglês “*Very Low Density Lipoprotein*” (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade)

“A menos que modifiquemos nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein



Capítulo 1

Considerações gerais

*“Talvez ainda mais importante do que as respostas sejam as perguntas, que relevam
tão claramente o que significa ser humano”*

Marcelo Gleiser

1. Relevância do tema e panorama geral

Há quase duas décadas, esperava-se que o tratamento da hipercolesterolemia e da hipertensão arterial eliminasse a doença arterial coronariana (DAC) até o final do século XX (HANSSON, 2005). Em verdade, essa previsão otimista precisou ser revisada e está bem distante da realidade atual. Apesar de todas as melhorias na prevenção, diagnóstico e tratamento, a DAC continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo (ELLIMS et al., 2014; KRISHNAN et al., 2017; MONTALESCOT et al., 2013; YUSUF, 2004; MORAN et al., 2014). Globalmente, o envelhecimento e o crescimento da população levaram ao aumento do número de mortes por doença cardiovascular (DCV). Além disso, projeta-se que a mortalidade cardiovascular prematura continue nas taxas atuais ou mesmo aumente ainda mais se políticas de combate aos fatores de risco não forem bem-sucedidas (ROTH et al., 2015a).

As DCV já são responsáveis por um terço de todas as mortes no mundo (17 milhões em 1999 e com projeção de 25 milhões em 2020). Nos Estados Unidos, um a cada três adultos (em torno de 81 milhões de pessoas) tem alguma forma de DCV, incluindo mais de 10 milhões de pessoas com angina *pectoris*, sendo que aproximadamente metade deles tem menos de 60 anos de idade (MOZAFFARIAN et al., 2016). Naquele país, as DCV e os acidentes vasculares cerebrais causam 1 morte a cada 33 a 37 segundos e, cumulativamente, representam mais mortes anuais do que neoplasias, doenças respiratórias, acidentes e diabetes combinados (ARNETT et al., 2019). Todos os anos, as DCV causam 3,9 milhões de mortes na Europa e mais de 1,8 milhões de mortes na União Europeia (UE), respondendo por 45% de todas as mortes na Europa e 37% de todas as mortes na UE (WILKINS, 2017).

No Brasil, dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) mostram que a DCV corresponde a aproximadamente 30% das causas de morte. Registrou-se mais de 80 mil internações apenas no mês de fevereiro de 2014 por doenças do sistema circulatório (CESAR et al., 2014).

Claramente novas estratégias são necessárias para reduzir a prevalência dessa condição, que tem implicações tanto para o orçamento da saúde quanto para o paciente. A prevenção primária tem contribuído substancialmente para a redução das taxas de mortalidade e, embora a maioria dos eventos de DCV aterosclerótica sejam evitáveis por meio da prevenção primordial e do controle dos fatores de risco cardiovascular tradicionais, não existe uma única calculadora de risco apropriada para todos os pacientes (FORD, 2007; KRAMER et al., 2010; MEIKLE et al., 2011a).

O valor da triagem para detecção de aterosclerose subclínica é relevante. A maior razão disso encontra-se no fato de que as síndromes coronarianas agudas (SCA) são frequentemente a primeira manifestação da aterosclerose coronariana em indivíduos previamente assintomáticos,

sendo que a manifestação mais temida, a morte súbita cardíaca, é a consequência primária da DAC em 50% dos homens e 64% das mulheres (MIHAILIDOU; RITCHIE; W., 2013).

Pesquisas recentes sugerem que rupturas de placa coronariana geram diversos trombos que ocasionam morte súbita, indicando que a trombose não oclusiva pode preceder o evento fatal com maior frequência do que observado anteriormente (KRAMER et al., 2010) e que, na verdade, a maioria das oclusões das artérias coronárias ocorre em vasos que apresentavam nos angiogramas de anos ou meses anteriores estenose inferior a 50%. Esse achado fortalece o conceito de que infarto não transmural ocorre como resultado de oclusão trombótica súbita no sítio de rotura de placas ateroscleróticas previamente não obstrutivas, porém ricas em lipídios (GREENLAND; SMITH; GRUNDY, 2001; KHAMBHATI et al., 2018; SHAW; WARREN, 2019). Por essas razões, há um debate contínuo sobre como melhorar as ferramentas atuais usadas na prática clínica para prever o risco de um futuro infarto agudo do miocárdio (IAM) (KHAMBHATI et al., 2018; LLOYD-JONES, 2010).

Estudos prévios de anatomia patológica demonstraram que o aspecto anatômico e a composição do ateroma são mais determinantes para a instabilidade da placa do que propriamente a porcentagem de estenose e a intensidade de redução do fluxo coronariano provocada por ela. Ou seja, uma placa pode provocar uma obstrução de 70% no lúmen do vaso, mas ser estável, calcificada, com capa fibrótica espessa, núcleo necrótico homogêneo e, portanto, com baixa probabilidade de romper e provocar uma SCA. Por outro lado, uma placa não obstrutiva provocando uma estenose de 30% da luz do vaso pode ter várias características de instabilidade (capa fina, atividade inflamatória intensa), determinando maior risco de ruptura e, conseqüentemente, evolução para um evento agudo. Entretanto, os fatores de risco relacionados à placa para provocar o evento agudo são múltiplos e difíceis de serem demonstrados *in vivo* (STONE et al., 2011).

Nem todos os eventos coronarianos ocorrem em indivíduos com múltiplos fatores de risco tradicionais. Em alguns indivíduos, as anormalidades ligadas ao processo inflamatório, à hemostasia e/ou à trombose isoladamente parecem desempenhar papéis decisivos (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2009). De fato, à ocasião do primeiro infarto, mais de 75% dos pacientes não estão sob medidas preventivas baseadas em escores de probabilidade de eventos cardiovasculares tradicionais (ELLIMS et al., 2014; MONTALESCOT et al., 2013). Além disso, embora o acúmulo e o desenvolvimento da placa sejam progressivos ao longo da vida, as placas podem alternar entre estável e instável durante todo o processo da doença (MUSHTAQ et al., 2015).

Notadamente no subgrupo previsto como de risco intermediário pelos modelos clínicos tradicionais, a predição de eventos assumiu um papel central no campo da prevenção de doenças cardiovasculares. A adição de novos marcadores de risco busca ajudar a reclassificar (para baixo ou alto risco) alguns indivíduos de risco intermediário e, conseqüentemente, influenciar na tomada de

decisão clínica (KHAMBHATI et al., 2018; LLOYD-JONES, 2010; YEBOAH et al., 2012) (LLOYD-JONES et al., 2019).

Portanto, a capacidade de identificar, entre os indivíduos assintomáticos, o subgrupo que apresenta maior risco de desenvolver eventos cardiovasculares como infarto e morte no futuro representa etapa fundamental em qualquer estratégia voltada para a diminuição das taxas de eventos cardiovasculares (CESAR et al., 2014; FORD, 2007). Testes adicionais podem ser úteis para reclassificar as estimativas de risco e melhorar a seleção de pacientes para uso ou prevenção de terapias. A caracterização dos perfis metabolômicos por meio da espectrometria de massas pode ser uma ferramenta para diferenciar pacientes com base em seus perfis metabólicos desde que haja discriminação aditiva dos pacientes. Uma assinatura molecular para a detecção da aterosclerose subclínica pode representar uma grande mudança no tratamento da aterosclerose por meio de uma abordagem mais personalizada.

No presente estudo, realizou-se a análise de metabolômica global (do inglês, *untargeted*) do plasma de indivíduos assintomáticos com risco cardiovascular intermediário pelo Escore de Risco de Framingham. Os participantes foram estratificados pela angiotomografia de artérias coronárias utilizando a classificação de Leaman adaptado (CT-LeSc), com o valor de corte validado de alto risco > 5 (Alto CT-LeSc), baixo risco ≤ 5 (Baixo CT-LeSc) e grupo controle (sem placas). Realizamos, ainda, a análise quanto aos cortes tomográficos de Leaman T1, T2, T3 e controle, buscando características únicas de metabólitos que poderiam ser usados para diferenciar esses quatro grupos. A análise metabolômica foi executada com uma abordagem global não direcionada baseada em cromatografia líquida de desempenho acoplada a espectrometria de massa de tempo de voo (UPLC-QTOF / MS) e em cromatografia gasosa (GC MSMS) na fase de descoberta para comparar as populações distintas. Uma vez identificadas as moléculas que diferenciam esses grupos, uma abordagem direcionada (metabolômica alvo, do inglês, *targeted*) poderá, futuramente, ser usada para busca útil por potenciais biomarcadores de aterosclerose subclínica.

2. Biologia da aterosclerose e formação das placas

A causa mais comum de DAC é a aterosclerose. Os mecanismos que conduzem ao desenvolvimento da placa aterosclerótica são complexos e envolvem a retenção de lipoproteínas, recrutamento de células inflamatórias, formação de células espumosas, apoptose e necrose, proliferação de células musculares lisas (CML), síntese de matriz de colágeno, calcificação e remodelamento arterial (LIBBY et al., 2019a). O nome tem origem na combinação do núcleo lipídico e necrótico “mole” (do grego *atheré*, mingau) com os componentes duros da fibrose e calcificação (do grego *scleros*, duro). Trata-se de uma doença progressiva que se inicia nos primeiros anos de vida,

mas a velocidade de progressão é altamente dependente da localização e de fatores individuais (COSTOPOULOS et al., 2019). A aorta abdominal, as artérias coronárias, as artérias ilíacas e femorais, e as bifurcações carotídeas são tipicamente as mais afetadas (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011).

As artérias normais têm uma estrutura trilaminar bem desenvolvida (Figura 1). A camada mais interna, a íntima, é bastante delgada ao nascimento, mas se torna mais complexa com o envelhecimento (espessamento intimal). É sobre essa camada que residem as células endoteliais. A membrana elástica interna separa a íntima da camada média subjacente. Essa possui camadas concêntricas bem desenvolvidas de CML intercaladas por matriz extracelular rica em elastina. As CML nas artérias normais raramente proliferam. A adventícia é a camada mais externa, e usualmente recebe pouca atenção, apesar do seu papel na homeostase arterial. Caracteriza-se por uma extensa matriz de colágeno, assim como pela presença de *vasa vasorum* e terminações nervosas (LIBBY et al., 2019a).

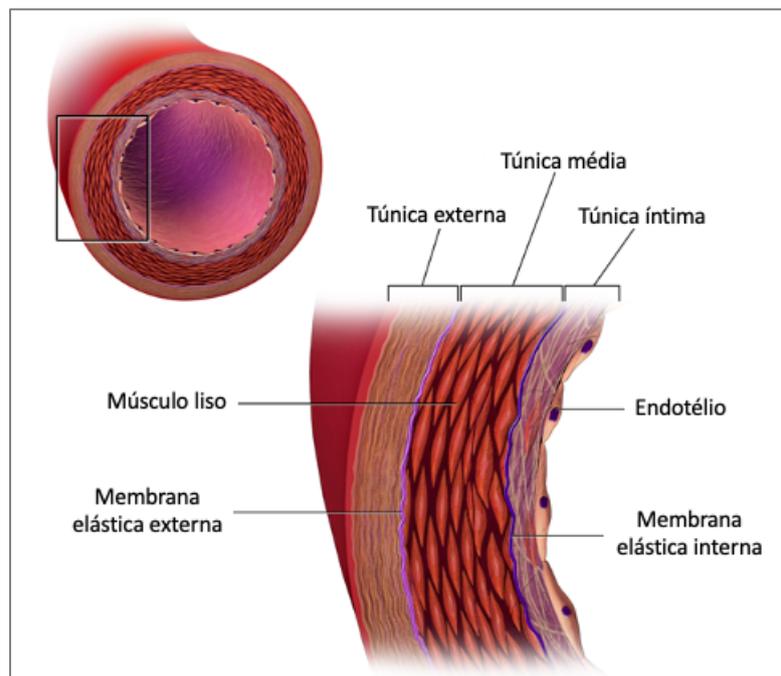


Figura 1. A estrutura da parede arterial (modificado de BLAUSEN, 2014).

O principal ator no mecanismo de aterosclerose é a LDL colesterol, do inglês *Low Density Lipoproteins* (lipoproteína de baixa densidade). Quando há disfunção endotelial, geralmente causada pela presença de fatores de risco cardiovasculares clássicos, a LDL é retida na íntima arterial e fica sujeita à oxidação e modificação molecular. A imunidade adaptativa reage à LDL oxidada e desencadeia uma resposta imune multifacetada. O movimento quase contínuo dessa lipoproteína entre o plasma e a íntima propicia um estado pró-inflamatório crônico, e sem resolução, na parede vascular. As células endoteliais e CML reagem à LDL oxidada e expressam moléculas de adesão (molécula de adesão intercelular [ICAM-1], E-selectina, molécula de adesão vascular [VCAM-10]), e

citocinas (interleucinas 6 e 8), que interagem com receptores em monócitos circulantes e estimulam sua migração e diferenciação em macrófagos (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011; VERGALLO; CREA, 2020).

Na íntima, as células recrutadas fagocitam a LDL oxidada, levando à formação de células espumosas, com acúmulo maciço de colesterol no seu interior. A função inicial dos monócitos/macrófagos seria protetora, removendo a LDL modificada da íntima e minimizando os efeitos dessa partícula sobre as células endoteliais. Porém, as células inflamatórias que se formam, na verdade, reforçam o estado pró- inflamatório (AHMADI et al., 2019). Mais citocinas e outras moléculas de adesão (como a P-selectina) são expressas e reforçam a migração de monócitos e, também, de linfócitos T, para a íntima arterial. Ao mesmo tempo, CML migram da camada média para a íntima. Elas passam a se comportar como células do tecido conectivo, multiplicando-se e elaborando matrix extracelular, rica em colágeno e proteoglicanos. Dessa maneira, a placa gordurosa evolui para uma lesão fibrogênica. O resultado é o espessamento da camada íntima, com a formação de uma capa fibrosa que tende a isolar o conteúdo lipídico.

Por outro lado, tanto as CML presentes na íntima quanto macrófagos e células espumosas sofrem apoptose e morte celular. Trata-se do principal mecanismo responsável pela formação de núcleos lipídico-necróticos na placa aterosclerótica (LIBBY et al., 2019a). A necrose das lesões é uma parte crítica do desenvolvimento da placa, porque predispõe a eventos cardiovasculares. Na sua ausência, a aterosclerose seria uma doença muito menos perigosa. Ainda não está bem compreendido por que essa necrose ocorre em algumas lesões, e não em todas (Figura 2).

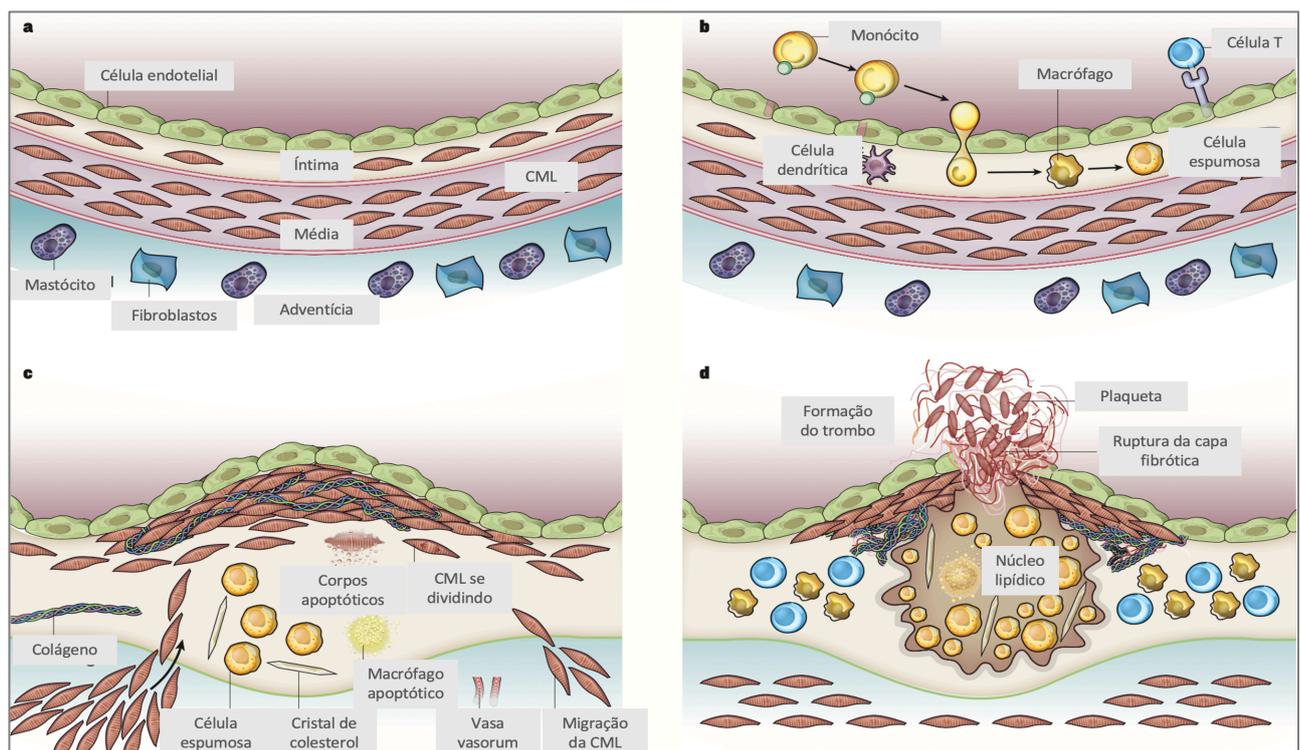


Figura 2. Fases do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas. A artéria muscular normal e as mudanças celulares que ocorrem durante a progressão da doença são mostrados. a: a artéria normal contém três camadas. b: as etapas iniciais da aterosclerose incluem a adesão de leucócitos sanguíneos à monocamada endotelial ativada, migração direcionada de leucócitos na íntima, maturação de monócitos (os mais numerosos dos leucócitos recrutados) em macrófagos, e sua captação de lipídios, produzindo células espumosas. c: a progressão da lesão envolve a migração de CML da média para a íntima, a proliferação de CML residentes na íntima e CML derivados da média, e a síntese aumentada de macromoléculas da matriz extracelular, como colágeno, elastina e proteoglicanos. Macrófagos de placa e CML podem morrer em lesões em avanço, alguns por apoptose. O lipídio extracelular derivado de células mortas e moribundas pode se acumular na região central de uma placa, frequentemente denotado como núcleo necrótico. As placas que avançam também contêm cristais e microvasos de colesterol. d: trombose, a complicação final da aterosclerose, muitas vezes complica uma ruptura física da placa aterosclerótica. É mostrada uma fratura da capa fibrosa da placa, que permitiu que os componentes da coagulação do sangue entrassem em contato com fatores de tecido no interior da placa, desencadeando o trombo que se estende para o lúmen do vaso, onde pode impedir o fluxo sanguíneo (modificado de LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011).

3. Curso temporal do ateroma: heterogeneidade das placas

Uma vez formado, o ateroma pode progredir e aumentar o suficiente para se tornar uma lesão isquêmica limitadora do fluxo. Alternativamente, as placas ateroscleróticas também podem seguir outro caminho baseado principalmente na erosão ou ruptura, complicando em última instância com a formação do trombo, oclusão do lúmen do vaso e isquemia aguda do tecido.

As placas ateroscleróticas são distribuídas de maneira não uniforme ao longo da árvore coronária (CHERUVU et al., 2007), sugerindo que fatores hemodinâmicos locais podem determinar o início e o desenvolvimento da placa. As placas também mostram marcadas diferenças na composição em pequenas distâncias (BROWN et al., 2016) e são estruturas altamente dinâmicas. Assim, diferentes áreas dentro de uma placa mostram progressão ou regressão e mudanças na composição, sugerindo que forças biomecânicas locais também podem influenciar o comportamento futuro da placa (COSTOPOULOS et al., 2019).

A ruptura da placa (Figura 3) é o mecanismo mais importante subjacente à trombose aguda das artérias coronárias, responsável por 2/3 dos casos de IAM e morte súbita. Assim que a capa fibrosa se rompe, o núcleo necrótico do ateroma, altamente trombogênico e rico em fator tecidual e partículas apoptóticas pró-trombóticas, é exposto ao sangue luminal. Isto desencadeia a formação de trombo, culminando em última instância com obstrução significativa ao fluxo coronariano e SCA (Figura 4). O fluxo rápido e forças de cisalhamento promovem a trombose arterial via agregação plaquetária (ao contrário da trombose venosa) e, subsequentemente, formação de fibrina e estabilização do trombo. A ruptura ocorre quando a capa é mais fina e mais infiltrada por macrófagos e células espumosas. Fatores que diminuem a síntese de colágeno ou estimulam a sua degradação podem comprometer a resistência mecânica da capa fibrosa contra fatores internos (núcleo necrótico) e externos (circulação). Em placas excêntricas, o ponto de ruptura mais fraco é frequentemente a margem da placa ou “região do ombro”.

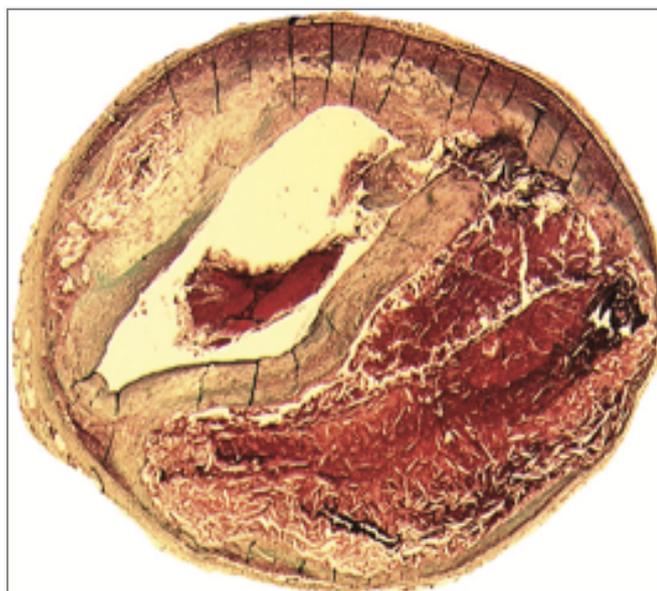


Figura 3. Corte transversal de uma artéria coronária com placa. Placa rota no ombro da cobertura fibrosa, com um trombo não-oclusivo superposto. O grande centro necrosado pode ser identificado por cristais de colesterol e a extensa hemorragia intraplaca secundária à ruptura da placa. Corante tricrômio, tornando o trombo vermelho, o colágeno azul e o lipídio incolor (modificado de MORENO, 2015).

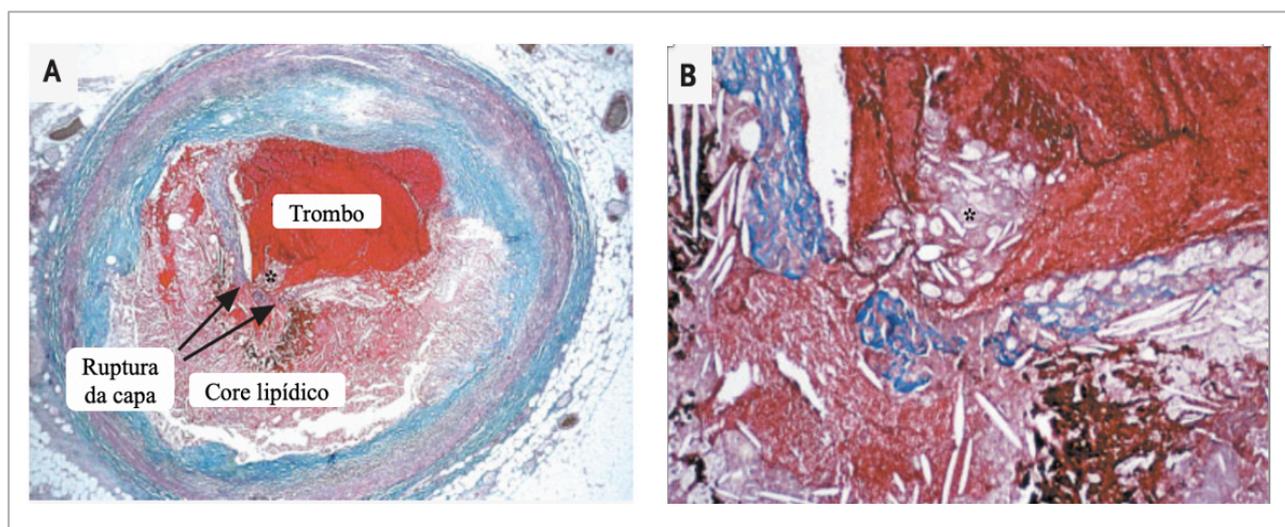


Figura 4. Lesão aterosclerótica em uma artéria humana. O painel A mostra uma artéria coronária seccionada de um paciente que morreu de IAM. Ele contém um trombo oclusivo sobreposto a uma placa aterosclerótica rica em lipídios. A capa fibrosa se rompeu (área entre as setas), expondo o núcleo trombogênico ao sangue. A coloração de tricrômio foi usada, tornando o trombo luminal e a hemorragia intraplaca vermelha e o colágeno azul. O painel B é uma micrografia de alta potência da área no painel A indicada pelo asterisco e mostra que o conteúdo da placa aterosclerótica vazou pela abertura na tampa para o lúmen, sugerindo que a ruptura da placa precedeu a trombose (o asterisco indica cristais de colesterol) (modificado de HANSSON, 2005).

A erosão da placa (Figura 5) é outro mecanismo de complicações trombóticas agudas da aterosclerose, caracterizada pela formação de um trombo em região de desnudamento endotelial sem ruptura da capa fibrosa (SHAW; WARREN, 2019). Seu mecanismo ainda é incerto, e as razões pelas quais o endotélio se perde e precipita trombose permanecem obscuras. A atenuação da

inflamação e o acúmulo de lipídios nos ateromas devido a terapias mais eficazes contra a aterosclerose são provavelmente uma das explicações para o aumento da proporção de SCA derivadas da erosão da placa (LIBBY et al., 2019a; PARTIDA et al., 2018).

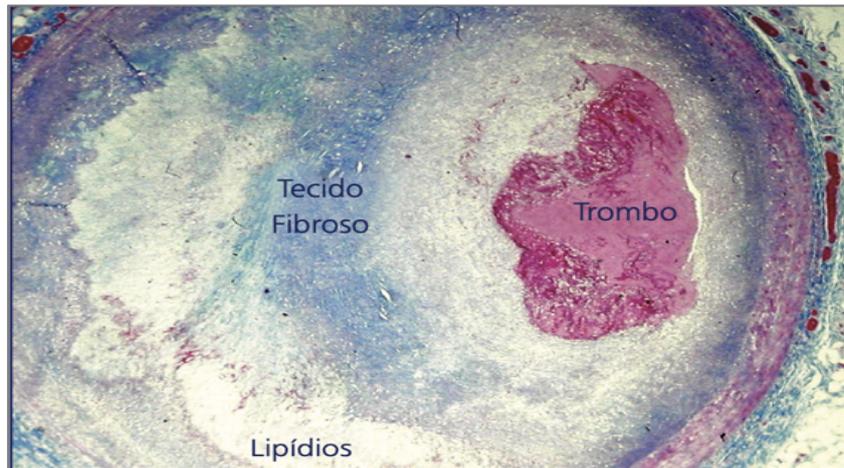


Figura 5. Erosão de uma placa aterosclerótica. Corte transversal de uma artéria coronária contendo uma placa aterosclerótica estenótica, com um trombo oclusivo superposto. Apesar de faltar o endotélio na interface da placa com o trombo, a superfície da placa está intacta. Corante tricromo, tornando o trombo vermelho, o colágeno azul e o lipídio incolor (modificado de MORENO, 2015).

Placas complicadas pela erosão tendem a ser ricas em matriz, pobres em lipídios e geralmente não possuem coleções de macrófagos proeminentes, ao contrário das placas que sofrem ruptura, que caracteristicamente tem capas fibrosas finas, grandes *pools* de lipídios e células espumosas abundantes (Figura 6).

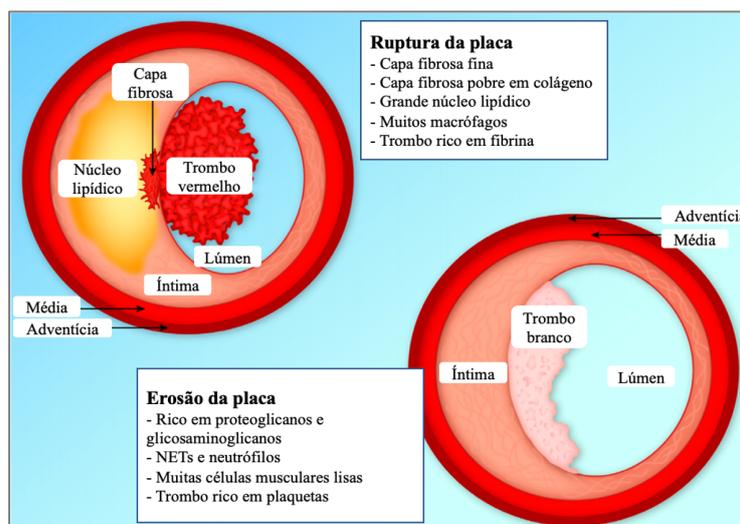


Figura 6. Comparação das características dos ateromas humanos. Ateromas complicados por trombose devido à ruptura da placa (topo) ou erosão superficial (inferior). O texto destaca algumas das características demonstradas por análises de lesões arteriais coronárias humanas que sofreram trombose por estes dois mecanismos diversos. NETs (Neutrophil Extracellular Traps) indica armadilhas extracelulares de neutrófilos (modificado de LIBBY et al, 2019b).

Nem todas as placas ateroscleróticas sofrem complicações trombóticas, ainda que possam progredir e se tornar ateromas limitantes do fluxo. Sob demanda aumentada de oxigênio do miocárdio, tais lesões impedem o fornecimento adequado ao miocárdio, levando à isquemia. As distintas trajetórias dos ateromas podem resultar de diversos fatores, que vão desde o microambiente e a composição da placa até a presença e magnitude de fatores de risco sistêmicos tradicionais e não tradicionais (LIBBY et al., 2014).

Estudos patológicos mostraram que muitas (senão a maioria) placas ateroscleróticas desestabilizam sem resultar em uma síndrome clínica (BURKE et al., 2001). Durante os últimos 30 anos, os esforços de pesquisa têm se concentrado principalmente nos mecanismos de instabilidade da placa (CREA; LIUZZO, 2013; LIBBY et al., 2019). Ainda assim, o risco de IAM ou morte súbita por causas coronárias permanece difícil de prever, sugerindo que outros mecanismos patogênicos também devem ser investigados (VERGALLO; CREA, 2020).

4. Placa vulnerável e aterotrombose: mudança de paradigma

A compreensão dos mecanismos de aterogênese evoluiu dramaticamente nos últimos 30 anos. O papel do colesterol na aterogênese conforme previamente descrito é relatado há muito tempo, mas somente na última década do século XX fortes evidências científicas começaram a apontar a deposição de lipídios na parede arterial apenas como o ponto de ignição da aterosclerose, a partir da qual uma miríade complexa de eventos inflamatórios se sucede (LIBBY et al., 2014, 2019a; NORDESTGAARD; VARBO, 2014; ROSS, 1999). Recentemente, muitos foram os avanços acerca dos processos dinâmicos que influenciam a composição e a estabilidade do ateroma, assim como os mecanismos de sua instabilidade e ruptura (LIBBY et al., 2019a).

As células T, importantes orquestradoras da inflamação local, podem induzir efeitos distintos, tanto pró quanto anti-inflamatórios, dependendo de suas citocinas secretadas. É importante ressaltar que a síntese de moléculas de matriz extracelular também é influenciada por essas diferentes citocinas. O interferon - citocina pró-inflamatória Th1 (IFN) - reduz a capacidade das CML de produzir colágeno intersticial, um componente crítico da capa fibrosa que fica sobre o núcleo lipídico necrótico. Por outro lado, o fator de crescimento transformador de citocinas de células T regulatórias (TGF-) pode atuar de forma oposta, promovendo a síntese de colágeno. Portanto, as placas ateroscleróticas que são caracterizadas pela predominância de células Th1 produtoras de IFN- podem estar mais sujeitas à ruptura, devido a uma capa fibrosa mais fina. Além da síntese de colágeno, a magnitude da degradação do colágeno induzida pelas colagenases das células inflamatórias também interfere na suscetibilidade da capa fibrosa à ruptura e, portanto, na

vulnerabilidade da placa. Desta maneira, a síntese de colágeno prejudicada e a degradação aumentada do colágeno, ambos fenômenos induzidos por inflamação, são contribuintes importantes para a ruptura da capa fibrosa (LIBBY et al., 2014).

A definição contemporânea de *placa vulnerável* é aquela mais propensa a desestabilização (ruptura e erosão) e complicações trombóticas que levem a eventos cardiovasculares (placa “culpada”). Existem, portanto, características morfológicas que as caracterizam como vulneráveis (RODRIGUEZ-GRANILLO et al., 2016). O fibroateroma de capa fina (TCFA, do inglês, *Thin Cap Fibroatheroma*), uma placa com um grande núcleo necrótico coberto por uma capa fibrosa fina (<65 µm) infiltrada por macrófagos ativadas, é considerada a protótipo da placa com tendência à ruptura (RIGLA et al., 2017) (Figura 7).

Além da espessura da capa fibrosa, várias outras características da placa também governam a suscetibilidade da placa à ruptura, incluindo o tamanho do núcleo lipídico necrótico, a quantidade de macrófagos da placa, a presença de remodelação positiva da placa e calcificação irregular.

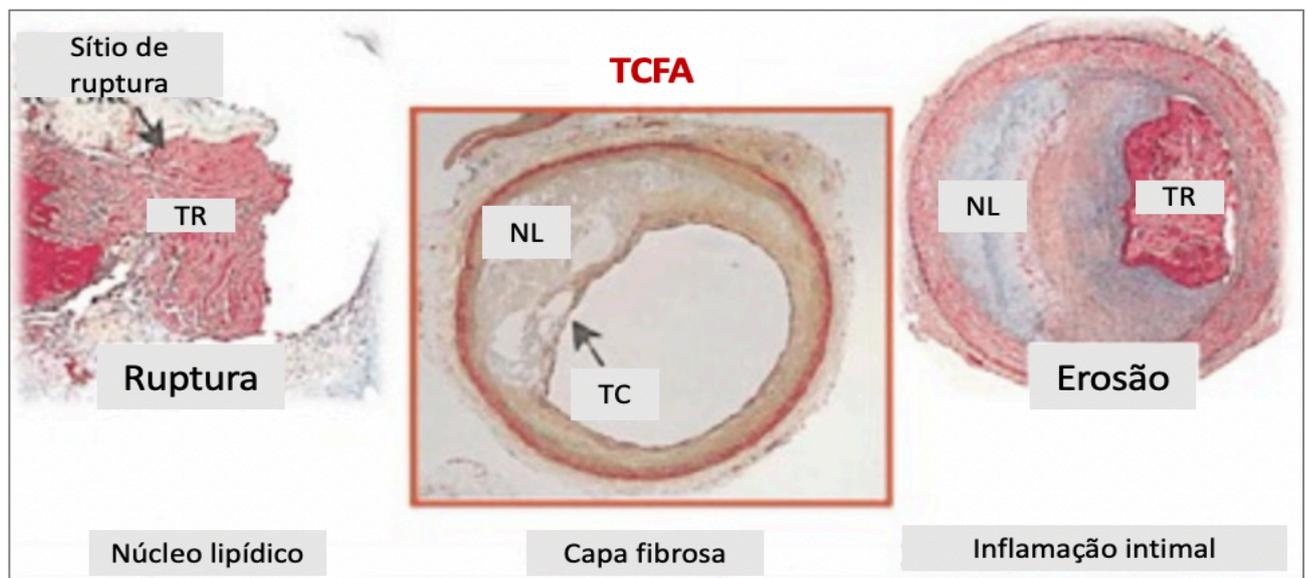


Figura 7. Representação esquemática da placa vulnerável. O TCFA derivado da tomografia de coerência óptica foi definido como a presença de capa fibrosa fina (<65 µm) sobreposta a uma placa rica em lipídios. TR: Trombo; NL: Núcleo lipídico; TCFA: do inglês, *Thin Cap Fibroatheroma* – Fibroateroma de capa fina (modificado RIGLA et al., 2017).

Esta definição histológica, entretanto, não satisfaz os padrões clínicos. Na prática, no laboratório de cateterismo cardíaco não se consegue visualizar essas características morfológicas. Necessita-se de uma definição que possa ser reproduzida na prática diária. Para o cardiologista intervencionista, a placa vulnerável de alto risco é definida como uma lesão coronária não-obstrutiva silenciosa, que se torna subitamente obstrutiva e sintomática, como demonstrado na Figura 8. As evidências clínicas disso não são recentes: foram desenvolvidas por Ambrose & Fuster em 1988, quando eles estudaram as características basais de lesões que evoluíram para um IAM (AMBROSE et

al., 1988). Já naquela época os investigadores verificaram que no período basal a maioria das lesões que evoluíram para um infarto agudo do miocárdio eram não-obstrutivas, com estenose de diâmetro médio de 48%. Vários investigadores reproduziram esse achado, criando o conceito de que a maioria das lesões responsáveis por infartos origina-se de uma DAC não-obstrutiva (MORENO, 2015).

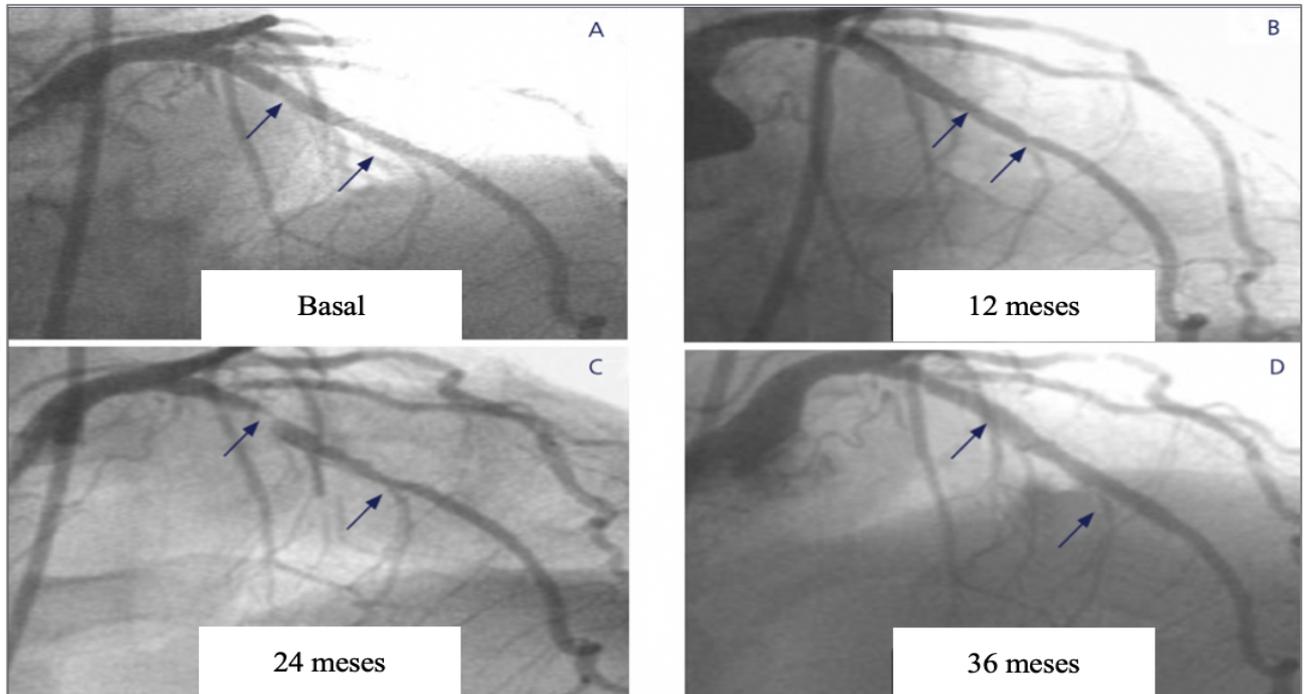


Figura 8. Evolução de placa aterosclerótica. Evolução rápida de um estado não-obstrutivo e assintomático a uma doença gravemente obstrutiva e sintomática (definição de placas vulneráveis). Angiogramas coronários sequenciais da artéria coronária descendente anterior (ADA), realizados a intervalos de 12 meses. A. Angiograma basal mostrando uma estenose de 10 a 20% na ADA nos segmentos proximal e médio, destacadas pelas setas. B. Evolução a uma estenose de 30 a 40% em ambos os segmentos, 12 meses após o angiograma basal. C. Evolução adicional a uma estenose grave de 95%, no segmento proximal e a uma estenose de 50% no segmento médio, 24 meses após o angiograma basal. Nesta ocasião, o paciente foi tratado com um único stent. D. Estenose de 10 a 20% nos mesmos segmentos 12 meses após a terapia local com stent e 36 meses após o angiograma basal (modificado de MORENO, 2015).

Estudo de Motoyama *et al.* fortaleceu o argumento de que causar trombose luminal não é o mesmo que causar evento isquêmico agudo ao documentar em seu estudo casos de SCA causadas por placas ateroscleróticas que não causam estenose luminal (Figura 9) (MOTOYAMA *et al.*, 2009).

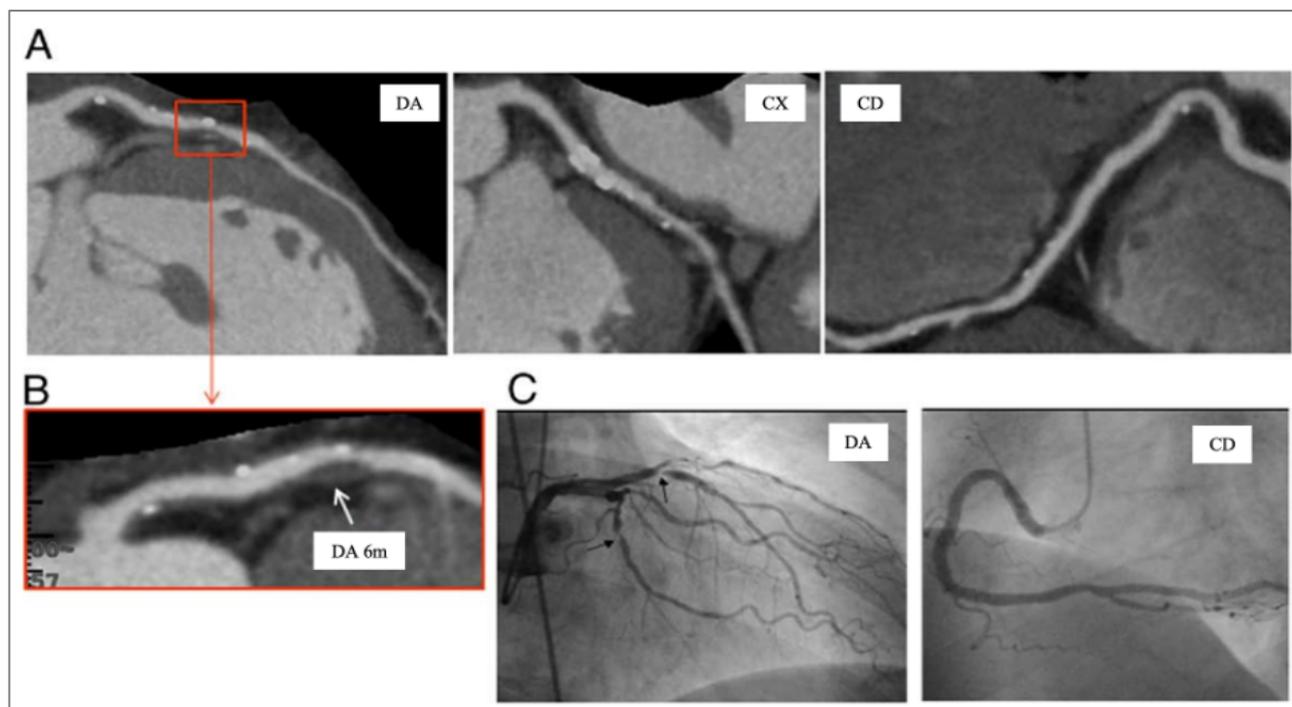


Figura 9. Exemplo de um paciente com SCA) 6 meses após a angiografia por TC. (A) Imagens curvas multiplanares da artéria coronária descendente anterior (ADA), artéria coronária circunflexa (ACX) e artéria coronária direita (ACD). (B) Remodelação positiva, placa de baixa atenuação e calcificação irregular foram detectadas na angiografia de tomografia computadorizada coronariana. (C) síndrome coronariana aguda (SCA) ocorreu 6 meses após a angiotomografia. Foi determinado como a lesão culpada com base nos achados de angiografia coronária invasiva. Observe a localização da lesão proximal ao primeiro ramo septal, tanto na angiografia por TC antes do evento quanto na angiografia coronária após o evento, quando o paciente foi levado ao laboratório de hemodinâmica para intervenção coronária percutânea na descendente anterior (modificado por MOTOYAMA et al., 2009).

Desta maneira, as evidências crescentes que apontaram para um papel da inflamação no desenvolvimento do ateroma nos forçaram a repensar as visões clássicas da aterosclerose como uma doença segmentar ou localizada (LIBBY, 2002, 2017). A oclusão súbita coronária é, na verdade, frequentemente precedida por um período variável de instabilidade da placa e evolução do trombo antes do início dos sintomas (KRAMER et al., 2010) e ocorre em locais de estenose arterial coronariana angiograficamente leve, como mostrado no estudo PROSPECT (STONE et al., 2011) Esse importante estudo sobre a história natural da aterosclerose confirmou a hipótese de que SCA surgem de ateromas com certas características histopatológicas, e que essas características não são necessariamente dependentes do grau de estenose angiográfica naquele local (Figura 10). Assim, a oclusão coronariana aguda pode representar a fase final de uma série de eventos aterotrombóticos não oclusivos que ocorrem nos dias ou mesmo semanas anteriores.

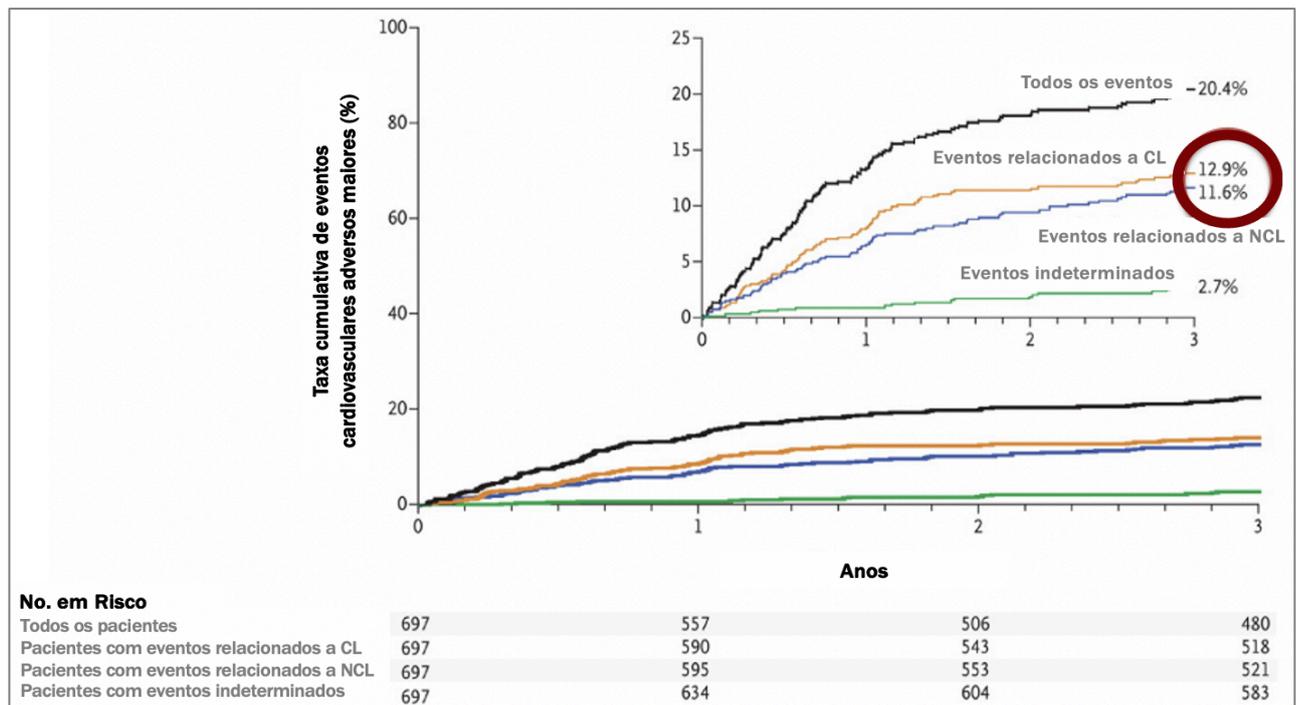


Figura 10. Resultado do estudo PROSPECT. Curvas de tempo até o desfecho para eventos cardiovasculares adversos maiores após intervenção coronária percutânea não complicada e bem-sucedida em 697 pacientes com SCA (acompanhamento médio de 3,4 anos). A taxa cumulativa de eventos cardiovasculares adversos maiores que foram julgados como doença recorrente nas lesões culpadas (CL) originalmente tratadas foi de 12,9% (118 lesões em 83 pacientes). A taxa de eventos cumulativos de 3 anos considerada relacionada a lesões não culpadas (NCL) foi de 11,6% (104 lesões em 74 pacientes), mostrando que NCL causaram tantos eventos após angioplastias quanto CL. (modificado de STONE et al., 2011).

Recentes descobertas sobre vulnerabilidade da placa vão mais além. A noção de que as SCA se desenvolvem a partir da ruptura ou erosão superficial de uma placa aterosclerótica é simplificação excessiva de um processo que envolve atividade da placa, trombogenicidade do sangue e cura da placa (CREA; LIUZZO, 2013; LIBBY et al., 2019). Esses achados sugerem que o status funcional, mais do que a anatomia, é o fundamental determinante do prognóstico. Somado a isto, estudos sobre esse tema deram luz à recente teoria do “duplo golpe” na aterosclerose. A ideia é que ciclos repetidos e periódicos de ruptura/erosão, trombose e cura parecem causar uma crise de proliferação e migração de CML, e síntese de matriz extracelular, levando à perda luminal progressiva com progressão estenótica gradativa na ausência de eventos agudos (VERGALLO; CREA, 2020), conforme descrito na Figura 11.

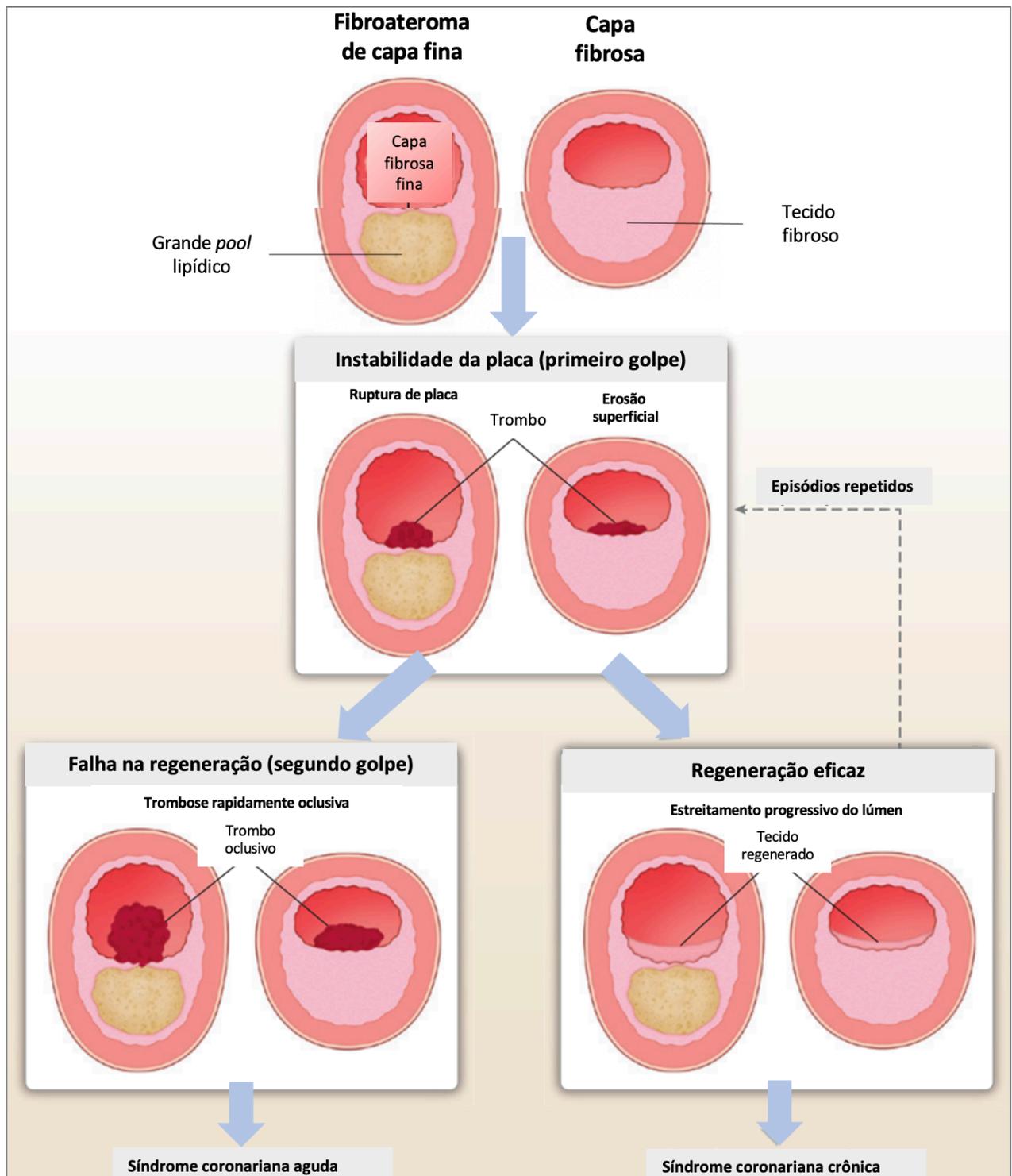


Figura 11. Papel da cura da placa na história natural da doença cardíaca isquêmica. Na teoria de "duplo golpe" da aterosclerose, o primeiro golpe é a ruptura aguda de uma placa aterosclerótica (ruptura ou erosão) e o segundo golpe é uma capacidade de cura prejudicada. Em pacientes com um duplo acerto de ruptura de placa e falha na cura (regeneração), trombose oclusiva ou suboclusiva e uma SCA irão se desenvolver. Em contraste, o primeiro golpe está contido em pacientes com um sistema de cura eficaz, e o processo promove a evolução para uma placa mais fibrosa e estável, muitas vezes acompanhada de remodelação constritiva (modificado de VERGALLO; CREA, 2020).

Em uma perspectiva histórica, se antes a visão tradicional de que a formação do ateroma seguia um curso inexoravelmente progressivo com a idade (representada por uma curva ascendente) desempenhou papel de destaque na análise da doença, atualmente o conceito sugere uma evolução progressiva, mas em etapas. Segundo o modelo de pensamento atual, ao longo do tempo podem ocorrer episódios críticos provocados por uma ruptura da placa, seguidos de trombose mural e cicatrização, nas quais se observa a proliferação de músculo liso e deposição de matriz extracelular. De fato, este modelo episódico de progressão da placa se ajusta melhor aos dados angiográficos humanos do que o modelo tradicional de função contínua. Estes episódios podem ser limitados, clinicamente imperceptíveis e seguidos por períodos de relativa inatividade da lesão ao longo do tempo ou manifestar-se como SCA (sem supra de ST ou com supra de ST).

Dado que a pesquisa na base molecular da aterosclerose fez avanços consideráveis na compreensão da base fisiopatológica da ruptura da placa e refinou nossa compreensão da doença, também nos obrigou a refinar nossa visão sobre as melhores estratégias para evitá-la. Assim, tanto a avaliação quanto o manejo de pacientes com doença coronariana estão em transição e uma abordagem abrangente para pacientes com DAC está substituindo, cada vez mais, uma estratégia focada na lesão (Figura 12).

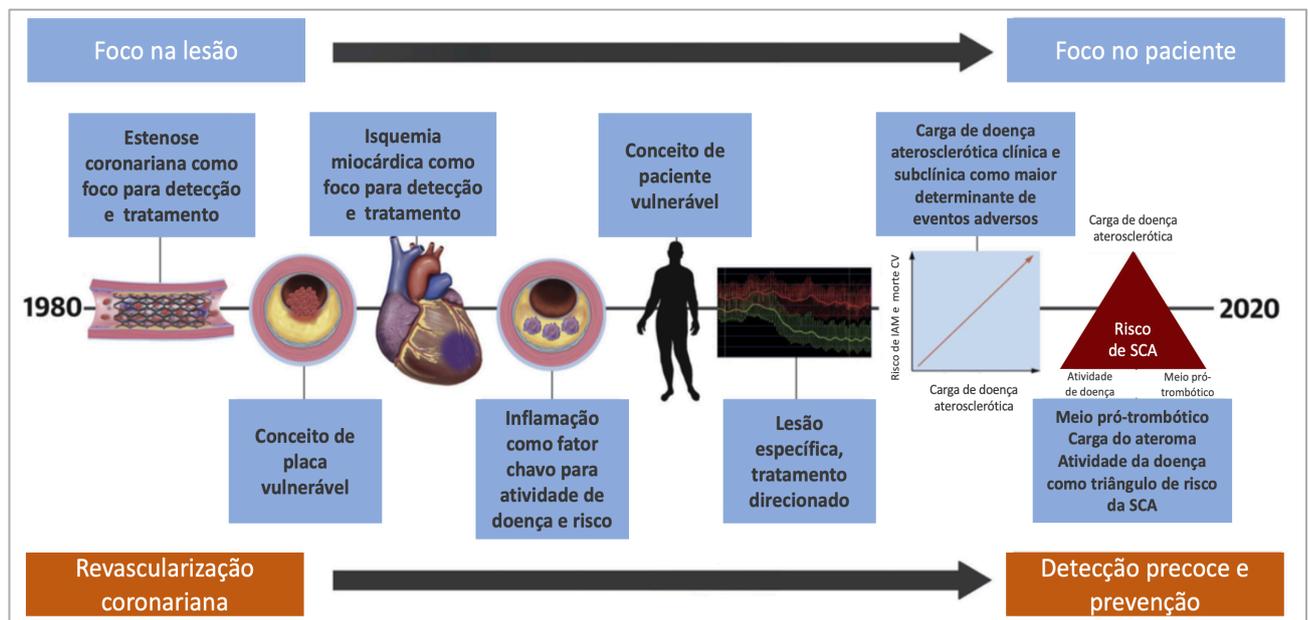


Figura 12. Mudanças no conceito de doença arterial coronariana 1980-2020. Da detecção da placa vulnerável ao manejo do paciente vulnerável (modificado de ARBAB-ZADEH; FUSTER, 2019).

Desta maneira, é notório, mesmo com as lacunas atuais do conhecimento sobre vulnerabilidade da placa, o expressivo progresso na elucidação, nas últimas décadas, dos mecanismos que levam à SCA e morte cardíaca súbita. Como previamente descrito, estudos de patologia e imagem identificaram características de aterosclerose coronariana que precedem eventos coronários agudos.

No entanto, muitos fatores influenciam o risco de eventos adversos da DAC e os dados disponíveis apoiam uma transição do enfoque na *“placa vulnerável”* individual, estenose arterial coronariana e isquemia miocárdica induzível, para o entendimento da doença cardíaca coronária como doença crônica multifatorial. O conceito de *“paciente vulnerável”* evoluiu com o entendimento da carga do ateroma, sua atividade metabólica e a disposição para trombose vascular, construindo uma plataforma para avaliar os aspectos centrais da doença coronariana. Assim, esse modelo direcionou-nos para o foco no controle da atividade da doença aterosclerótica e na modificação da suscetibilidade da trombose vascular (ARBAB-ZADEH; FUSTER, 2019).

5. Avaliação da aterosclerose por angio TC coronariana

A angiografia coronária por tomografia (CCTA, do inglês *Coronary Computed Tomography Angiography*) tornou-se uma ferramenta não invasiva valiosa para a avaliação confiável de DAC. Esse método é capaz de representar não apenas o lúmen do vaso, mas também a parede vascular. Há uma intensa pesquisa em andamento sobre a caracterização da placa e a previsão de eventos coronários por CCTA e as conquistas tecnológicas futuras (como energia dupla e melhores algoritmos de reconstrução) podem melhorar essa capacidade. Avanços tecnológicos recentes permitiram que a CCTA auxiliasse na caracterização da morfologia da placa em doenças obstrutivas e não obstrutivas (NOGUCHI et al., 2018; TARKIN et al., 2016).

Tradicionalmente, as placas ateroscleróticas são classificadas (Figura 13) convencionalmente em relação à sua morfologia básica em *não calcificadas*, *calcificadas* ou *parcialmente calcificadas* (*também chamadas de mistas*) pela CCTA (MORTENSEN et al., 2016; RAFF et al., 2009).

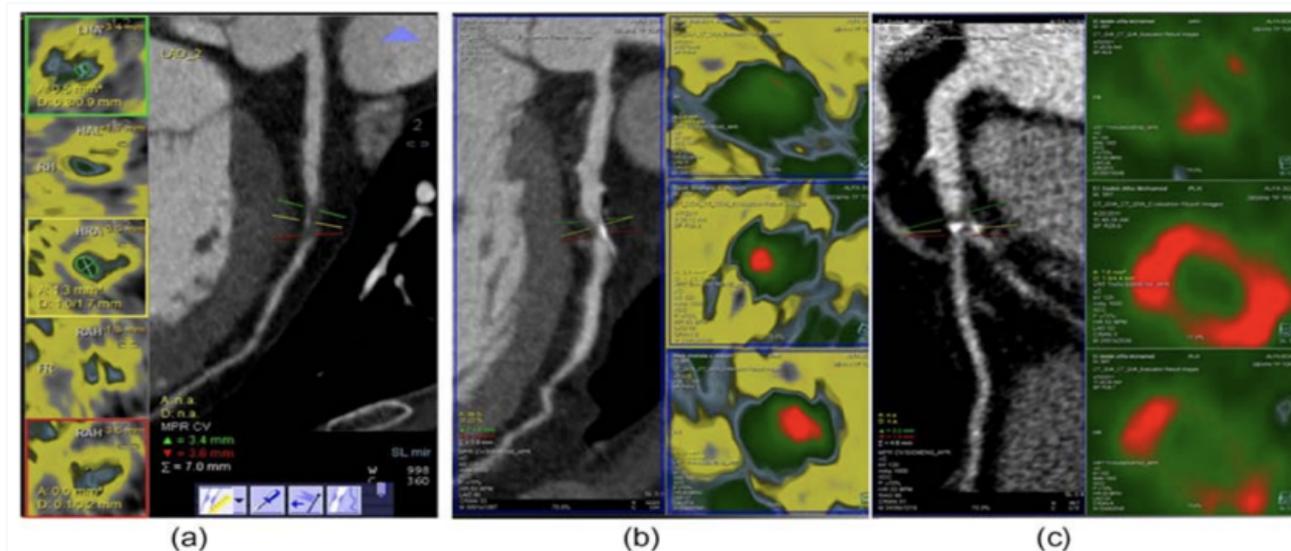


Figura 13. Caracterização da placa coronária por CCTA. Placa não calcificada (a); placa mista (b); placa calcificada (c). Cor vermelha: cálcio (modificado de JACOB; HASSAN; YACOUB, 2015).

Investigações indicam que simplesmente classificar as placas com base na quantidade de cálcio presente contém poucas informações sobre o resultado clínico. As características estruturais da placa por si só não podem definir a vulnerabilidade da placa (ELLIMS et al., 2014; KRUK, 2020). A identificação de características mais complexas é necessária para melhor previsão de resultados adversos (BITTENCOURT et al., 2014). Em síntese, é necessária uma abordagem mais holística, responsável por muitas características diferentes da aterosclerose. Para isso, novas características precisam ser definidas e novos métodos estatísticos precisam ser empregados. Refinar de forma mais acurada a caracterização das placas para além dessa classificação proposta é particularmente importante no cenário de placas não calcificadas e não obstrutivas, categoria heterogênea em que muitos pacientes assintomáticos de risco intermediário se enquadram.

Desta forma, na vanguarda dos novos conceitos, o método CCTA refinou-se. Como já descrito, investigações sugeriram algumas características da placa que estão mais associadas à sua ruptura, levantando assim o conceito de placa “vulnerável” (FINN et al., 2010): capa fibrosa fina, placa rica em lipídios com grande núcleo necrótico, remodelação positiva (KRÖNER et al., 2011), lesão heterogênea (MAUROVICH-HORVAT et al., 2012), manchada ou microcalcificação dentro da placa (MOTOYAMA et al., 2009). Embora a CCTA não possa fornecer informações sobre todos esses aspectos devido aos limites de resolução espacial (como espessura da capa fibrosa e microcalcificação, por exemplo), alguns deles são, na verdade, bem avaliados pelo exame (KRÖNER et al., 2011; MAUROVICH-HORVAT et al., 2012; MOTOYAMA et al., 2009).

O núcleo da placa e a remodelação positiva podem ser avaliados por CCTA. Em grandes placas de núcleo necrótico, geralmente é possível medir o valor de atenuação em unidades Hounsfield (UH). Os núcleos de baixa atenuação (<30 UH) vistos na TC têm boa correlação com placas ricas em lipídios

comprovadas por ultrassom intracoronário (USIC) (MARWAN et al., 2011). Um índice de remodelação foi sugerido para quantificar o remodelamento positivo: é calculado como a área da seção transversal do vaso no local da estenose máxima dividida pela média das áreas transversais de referência proximal e distal. Um índice de remodelação 1,1 é assumido como o limiar de remodelação positiva no CCTA. Placas de baixa atenuação e remodelação positiva foram associadas a eventos coronários agudos (KRÖNER et al., 2011).

A heterogeneidade da placa pode ser reconhecida pelo CCTA com base em seus padrões de atenuação. O chamado “sinal do anel do guardanapo” também é um marcador da heterogeneidade da placa. É descrito como um centro de placa de baixa atenuação adjacente ao lúmen e um padrão anular de alta atenuação semelhante ao anel em torno do núcleo (MAUROVICH-HORVAT et al., 2012). Esse sinal foi considerado um preditor independente de SCA (OTSUKA et al., 2013). Finalmente, a calcificação irregular (definida como nódulos calcificados <3 mm dentro da placa, circundados por componentes não calcificados) pode ser facilmente descrita pela CCTA e foi associada à maior ocorrência de SCA (MOTOYAMA et al., 2009). Assim, a calcificação dentro de uma placa não deve ser assumida como um sinal de "estabilidade".

As seguintes características da placa parecem estar associadas a eventos cardiovasculares: composição (como mencionado acima, placas de capa fina ricas em lipídios e placas heterogêneas são mais preditivas de SCA); gravidade (o grau de estenose também é um marcador prognóstico independente); localização (placas que surgem nas artérias coronárias principais, como o tronco da artéria coronária esquerda (TCE) ou artéria descendente anterior esquerda proximal (ADA proximal), carregam um prognóstico pior; e extensão (número de segmentos coronários envolvidos pela aterosclerose).

As diretrizes atuais, entretanto, não recomendam rotineiramente esse exame como método de triagem de pacientes assintomáticos (ARNETT et al., 2019; TAYLOR et al., 2010). Melhorias futuras nas estratégias de redução da dose de radiação, bem como o uso de menor quantidade de contraste iodado, podem mudar tal cenário. Vários escores foram desenvolvidos a fim de quantificar a carga aterosclerótica pela CCTA, mas a maioria deles não inclui todas essas características da placa: o Escore de Envolvimento do Segmento (SIS), do inglês *Segment Involvement Score*, usa o número total de segmentos com placa, obstrutivos ou não obstrutivos (AL-MALLAH et al., 2014); o Escore de Estenose de Segmento (SSS), do inglês *Segment Stenosis Score*, e o CAD-RADS, do inglês, *Stenosis-Severity Component of the Coronary Artery Disease-Reporting and Data System*, são baseados no grau de estenose (AL-MALLAH et al., 2014; XIE et al., 2018). Por outro lado, o escore de Leaman adaptado (CT-LeSc) (DE ARAÚJO GONÇALVES et al., 2013) avalia todas essas características da placa. O CT-LeSc é bem validado como um forte marcador prognóstico e demonstrou melhor previsão de eventos cardiovasculares quando comparado ao SIS e SSS (ANDREINI et al., 2012; MUSHTAQ et al., 2015).

5.1 Escore de Leaman Adaptado (CT-LeSc)

Recentemente proposto por Araújo Gonçalves *et al.* (DE ARAÚJO GONÇALVES *et al.*, 2013), o escore Leaman adaptado (CT-LeSc) foi uma adaptação da publicação original de Leaman *et al.* (LEAMAN *et al.*, 1981) desenvolvido para quantificar a gravidade da DAC obstrutiva, de acordo com a sua localização documentada na coronariografia invasiva. Em linhas gerais, CT-LeSc permite a quantificação da carga aterosclerótica coronariana total por englobar três conjuntos de fatores de ponderação:

- (1) **Localização da placa**, responsável pela dominância. Desta forma, são atribuídos pesos diferentes às lesões de acordo com a sua localização mais proximal na árvore coronária, refletindo a massa de miocárdio em risco dependente desta lesão.
- (2) **Tipo de placa**, explorando a acuidade diagnóstica da CCTA na identificação e classificação dos diferentes tipos de placas (RAFF *et al.*, 2009), com um fator de multiplicação de 1 para placas calcificadas e de 1,5 para placas não calcificadas e mistas, tentando refletir o maior potencial de instabilização destas duas últimas (ANDREINI *et al.*, 2012; MOTOYAMA *et al.*, 2009; STONE *et al.*, 2011).
- (3) **Grau de estenose**, com um fator de multiplicação de 0,615 para lesões não obstrutivas (< 50% de estenose) e um fator de multiplicação de 1 para lesões obstrutivas (\geq 50% de estenose).

O CT-LeSc do paciente é calculado como a soma do CT-LeSc parcial de todos os segmentos coronários avaliáveis. Considera-se o valor de corte validado de alto risco > 5 e baixo risco ≤ 5 , e grupo controle (sem placas). A graduação em tercís também é aplicável, sendo tercil 1 (T1) ≤ 3.7 (0.3-3.7); tercil 2 (T2) entre 3.8-8.3; T3 ≥ 8.3 (8.3-24.1), sendo que CT-LeSc alto é definido com o ponto de corte para o terceiro tercil (MUSHTAQ *et al.*, 2015). O CT-LeSc é um preditor independente de longo prazo de eventos cardíacos duros. Pacientes com DAC não obstrutiva e alto CT-LeSc (valores de corte validados > 5) tiveram sobrevida livre de eventos duros semelhantes aos pacientes com DAC obstrutiva. Em comparação com os outros escores de TC desenvolvidos e validados prognosticamente, ou seja, o escore de envolvimento do segmento (SIS) e o escore de estenose do segmento (SSS), o CT-LeSc demonstrou melhor previsão de eventos cardiovasculares (GONÇALVES *et al.*, 2013; ANDREINI *et al.*, 2017).

Assim, um dos pressupostos para o desenvolvimento do CT-LeSc foi justamente a identificação dos indivíduos em maior risco de eventos poder passar pela identificação não das

características de uma placa em particular, mas pela quantificação da carga aterosclerótica global (Tabela 1).

Tabela 1. Fatores de ponderação do CT-LeSc.

Localização			
Segmento	Dominância direita	Dominância esquerda	Dominância balanceada
CD proximal	1	0	0.5
CD média	1	0	0.5
CD distal	1	0	0.5
Descendente Posterior	1	na	0.5
Tronco comum	5	6	5.5
DA proximal	3.5	3.5	3.5
DA media	2.5	2.5	2.5
DA distal	1	1	1
1ª Diagonal	1	1	1
2ª Diagonal	0.5	0.5	0.5
Cx proximal	1.5	2.5	2.0
1ª Obtusa marginal	1	1	1
Cx distal	0.5	1.5	1
2ª Obtusa marginal	1	1	1
DP esquerda	na	1	na
Postero-lateral esquerda	na	0.5	0.5
Postero-lateral direita	0.5	na	na
Ramo intermediário	1	1	1
Grau de estenose			
DC obstrutiva (≥50%)	1		
DC não obstrutiva	0.615		
Tipo de placa			
Não calcificada ou mista	1.5		
Calcificada	1		

*Localização, grau de estenose e tipo de placa pelo escore Leaman adaptado para CT (CT-LeSc). ACD: artéria coronária direita; ADA: artéria coronária descendente anterior; ACX: artéria coronária circunflexa; DP: artéria coronária descendente posterior. *O fator de multiplicação para o grau de estenose reflete a proporção relativa das razões de risco para mortalidade no grande registro CCTA CONFIRM, no qual o efeito prognóstico da DAC não obstrutiva foi demonstrado. † O maior fator de multiplicação para placas não calcificadas ou mistas reflete a suposição de sua maior vulnerabilidade em comparação com placas predominantemente calcificadas (DE ARAÚJO GONÇALVES et al., 2013).*

Pacientes com DAC não obstrutiva podem, por exemplo, apresentar diferentes escores de carga aterosclerótica pelo CT-LeSc (Figura 14).

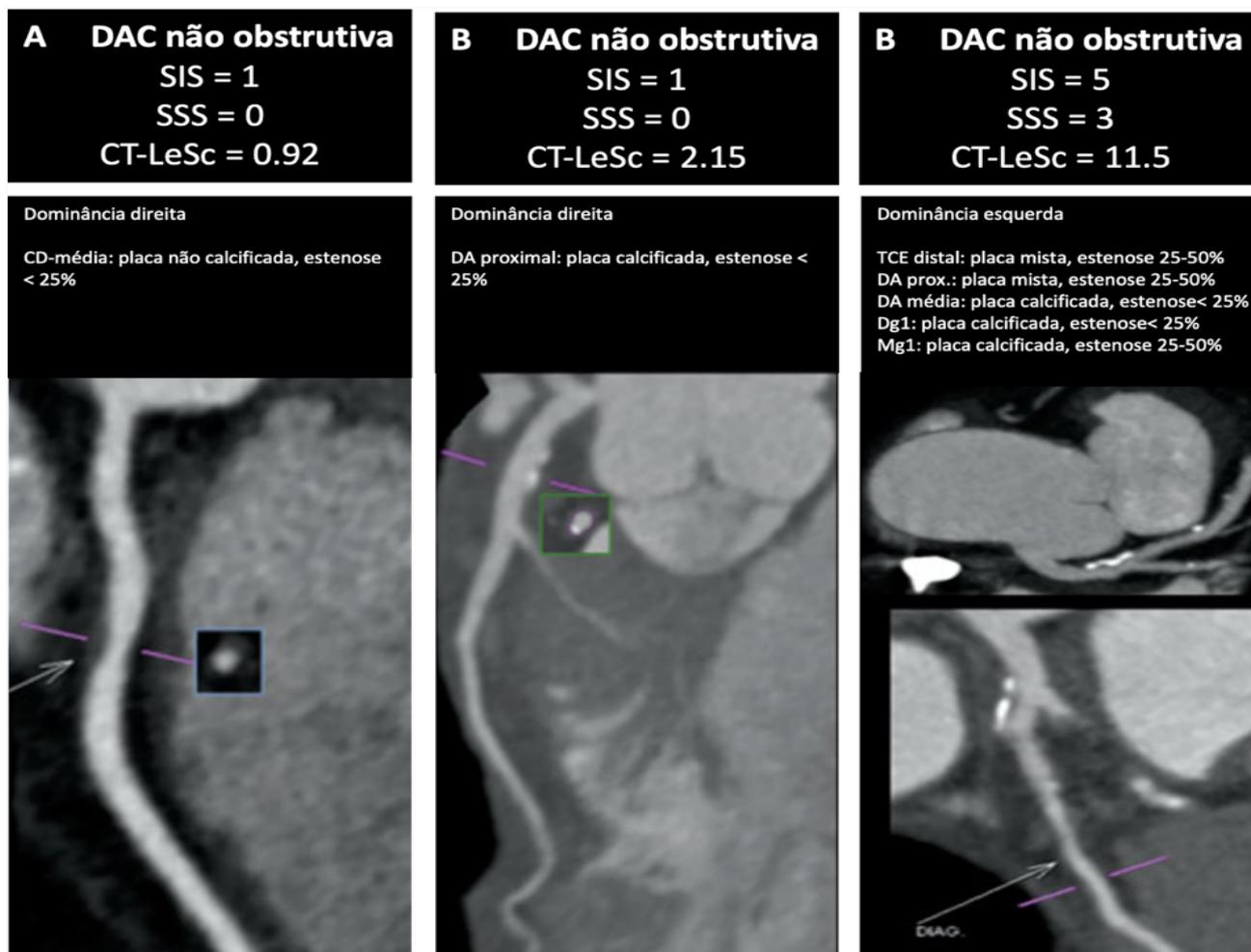


Figura 14. Três exemplos de casos de pacientes com DAC não obstrutiva estratificados por diferentes escores de carga aterosclerótica coronariana. No painel A, um paciente com uma única lesão no terço médio da ACD (ponderação para localização x tipo de placa x grau da estenose = $1 \times 1,5 \times 0,615 = 0,92$); No painel B, um paciente com uma única lesão proximal DA (CT-LeSc = $3,5 \times 1 \times 0,615 = 2,15$). No painel C, um paciente com dominância esquerda e 5 lesões não obstrutivas com um total CT-LeSc = TCE ($6 \times 1,5 \times 0,615$) + ADA proximal ($3,5 \times 1,5 \times 0,615$) + DA médio ($2,5 \times 1 \times 0,615$) + Dg1 ($1 \times 1 \times 0,615$) + Dg1 ($1 \times 1 \times 0,615$) = 11,5. DAC: doença arterial coronariana; escore CT-LeSc: escore de Leaman; escore de envolvimento do segmento SIS; escore de estenose do segmento SSS; TCE: tronco da artéria coronária esquerda; ADA: artéria descendente anterior, ACX: circunflexa esquerda; ACD artéria coronária direita; 1ºDiag. primeiro ramo diagonal; 1ºMg, primeiro ramo marginal obtuso (modificado de MUSHTAQ et al., 2015).

Além de diagnósticas, o escore de Leaman adaptado fornece informações prognósticas. Gonçalves *et al* (DE ARAÚJO GONÇALVES et al., 2013) mostraram uma associação significativa entre o CT-LeSc e alguns fatores demográficos tradicionais e fatores de risco clínicos. Nesse estudo, os preditores independentes de um CT-LeSc alto foram sexo masculino, diabetes, hipertensão, escore de Morise ≥ 16 e HeartScore ≥ 5 . Além disso, cerca de um quinto dos pacientes com DAC não obstrutiva tinha um CT-LeSc no mais alto tercil. Esse achado pode potencialmente levar à reclassificação do perfil de risco desse subconjunto de pacientes identificados pelo CCTA.

Os escores SIS e SSS (ANDREINI et al., 2012), já desenvolvidos e validados prognosticamente, levam em consideração apenas o número de segmentos com placa e o grau de estenose, enquanto o CT-LeSc combina esses dois aspectos e a localização, em um escore mais abrangente. Em um registro prospectivo, Mushtaq *et al* (MUSHTAQ et al., 2015) avaliaram o valor prognóstico do CT-LeSc

em comparação ao SIS e SSS. O CT-LeSc melhorou a classificação de risco em 38% em comparação com SSS ($p < 0,01$) e em 19% em comparação com SIS. Por refletir as informações sobre a localização da placa, composição e grau de estenose, o CT-LeSc pôde estratificar os indivíduos com mais precisão em categorias de alto ou baixo risco (Figura 15). Os autores demonstraram, assim, que o escore de Leaman é um preditor independente de longo prazo de eventos cardíacos graves (morte cardíaca e coronária aguda não fatal), sendo que pacientes com DAC não obstrutiva e alta carga aterosclerótica tiveram uma sobrevida livre de eventos semelhante a pacientes com DAC obstrutiva (78,6% vs 76,5%; $p = 0,627$).

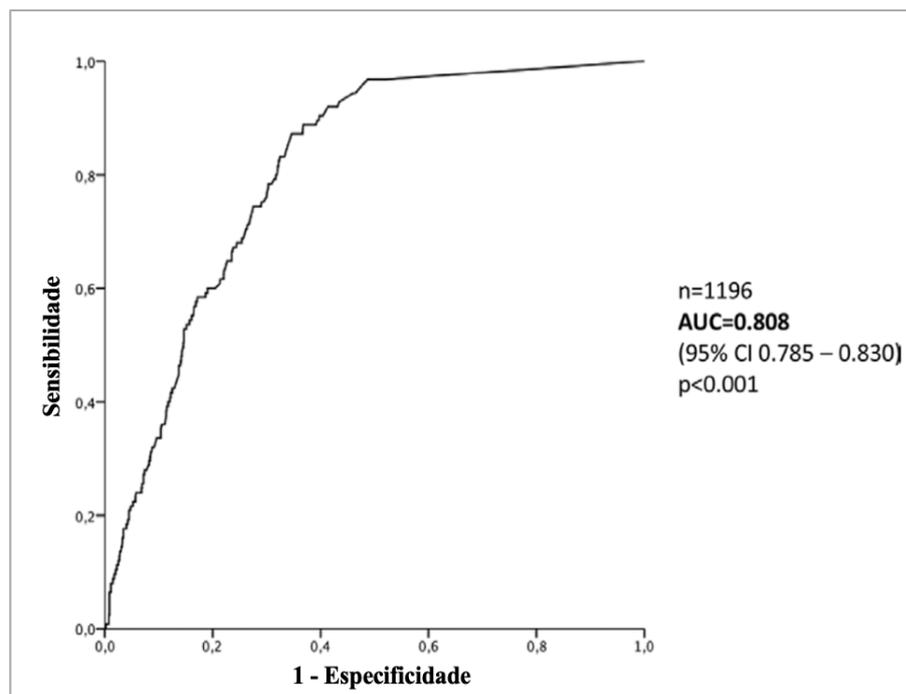


Figura 15. Curva ROC do escore CT-LeSc para a previsão de eventos cardíacos graves. AUC: Area Under the Curve (Área Sob a Curva); IC, intervalo de confiança; e CT-LeSc, pontuação de Leaman adaptada para CT (modificado de MUSHTAQ et al., 2015).

Em resumo, a CCTA, especialmente os escores que quantificam a carga aterosclerótica total, é uma técnica promissora para a detecção de placa vulnerável. No entanto, o custo relacionado à execução do exame rotineiramente em pacientes que não apresentam alto risco torna a viabilidade de seu uso questionável. Ademais, os contrastes e os efeitos colaterais potenciais da radiação aplicados são um fator de dissuasão. Assim, uma estratégia potencial mais segura é testar uma assinatura molecular para indicar a presença de DAC, que possa ser detectada por amostra de sangue periférico e não envolva os efeitos colaterais potenciais do CCTA, evitando custos elevados e riscos injustificados para pacientes assintomáticos (JACOB; HASSAN; YACOU, 2015).

6. Estratificação do risco cardiovascular na prática clínica

Mais importante do que diagnosticar no indivíduo uma patologia isoladamente, seja diabetes, hipertensão arterial, obesidade ou dislipidemia, é avaliá-lo em termos do seu risco cardiovascular. A avaliação do risco é a primeira e crítica etapa na abordagem atual da prevenção primária da doença cardiovascular aterosclerótica (PIEPOLI et al., 2016) com base em escores que estimam o risco de DCV nos próximos 10 anos, a fim de facilitar a tomada de decisão clínica ao permitir ações preventivas.

Idealmente, o médico deve ser capaz de avaliar com precisão o risco cardiovascular absoluto de um paciente individual, calcular a probabilidade de benefício ou prejuízo de uma intervenção e prescrever terapias após uma discussão franca dos riscos e benefícios específicos do paciente (PIEPOLI et al., 2016). As tendências atuais na prevenção primária incluem a necessidade de entender a avaliação de risco de DCV como um processo, não como um cálculo. Portanto, sugere-se três etapas: estimar, personalizar o risco e reclassificar o paciente se necessário.

Existem várias calculadoras de risco de DCV amplamente utilizadas. O campo é dinâmico, com novos algoritmos sendo desenvolvidos em uma base regular que são adotados por organizações e sociedades regionais. Fornecendo uma plataforma para a tomada de decisão compartilhada entre médico e paciente sobre prevenção primária, essas pontuações devem, fundamentalmente, ser fáceis de aplicar e com alta precisão à beira-leito do paciente. Além disso, devem ser metodologicamente robustas, abordar fatores de risco clinicamente relevantes e resultar em um ganho de saúde mensurável.

É essencial ressaltar a importância de se aplicar os dados de cada uma dessas pontuações à população ou grupo étnico em que foi modelado, com os fatores de risco avaliados e os desfechos previstos. O grande problema é que, atualmente, nenhum modelo de risco único é apropriado para todos os pacientes porque todos os modelos têm vantagens e desvantagens. Uma preocupação geral na triagem é seu potencial de causar danos. Resultados falsos positivos podem causar preocupação desnecessária e tratamento médico. Por outro lado, resultados falsos negativos podem levar a garantias inadequadas e a ausência de mudanças no estilo de vida.

Existe uma variedade de ferramentas de triagem para ajudar os médicos a estimar o risco do primeiro evento cardiovascular em pacientes adultos assintomáticos, incluindo Equações de Risco de Doença Cardiovascular Aterosclerótica de Coorte Conjunta (ASCVD), Pontuação de Risco de Framingham (FRS), QRISK®2 (versão dois do Algoritmo de risco QRISK® CVD), Avaliação do risco cardiovascular usando a rede escocesa de diretrizes intercolegiais (ASSIGN), Avaliação sistemática do risco coronariano (SCORE), Münster Cardiovascular Prospectivo (PROCAM), UKPDS e escore de Reynolds. Cada ferramenta é derivada de uma amostra diferente e tem vantagens e desvantagens

associadas. Essas estimativas de risco visam classificar os indivíduos assintomáticos em baixo risco, intermediário e alto risco de eventos cardiovasculares.

6.1 Escore de Risco de Framingham

Dentre os vários escores utilizados para identificar os indivíduos assintomáticos portadores de aterosclerose subclínica e prever seu risco de eventos cardiovasculares, o Escore de Risco de Framingham (FRS, do inglês *Framingham Risk Score*) é reconhecido e utilizado (MAHMOOD et al., 2014), sendo uma abordagem recomendada (ARNETT et al., 2019; PIEPOLI et al., 2016).

FRS foi pioneiro na previsão da população em risco de doença aterosclerótica e ainda permanece como a base sobre a qual as ferramentas preditivas atuais são baseadas. Seus pesquisadores foram os responsáveis por cunhar o termo “fatores de risco” para doenças cardiovasculares e, além disso, estabeleceram os princípios básicos da previsão de risco (ANDERSSON et al., 2019).

Um dos mais importantes desses princípios é que o fator de risco da doença aterosclerótica não é um fenômeno presente ou ausente. Cada fator de risco exibe um espectro de risco e cada espectro é caracterizado por uma zona de risco de DAC mais alta e uma zona de risco menor. Portanto, tais espectros não são “preto e branco”, mas, sim, “tons de cinza”. Portanto, mesmo os indivíduos de baixo risco, e notavelmente os de risco intermediário, têm aterosclerose subclínica e potencialmente perigosa (CROUSE, 2007).

Assim, os modelos de predição baseados em inventário de fator de risco usando o FRS têm sido recomendados como a pedra angular para a estratificação de risco de indivíduos assintomáticos e correspondente intensidade de intervenções preventivas (especificamente, terapia com drogas hipolipemiantes e alvos de colesterol) para a magnitude do risco previsto, conforme sugerido pelo National Cholesterol Program de Educação (NCEP) e o Tratamento de Adultos Painel III (ATP III) (SHAH, 2010).

O FRS estima a probabilidade de ocorrer IAM ou morte por doença coronária no período de 10 anos em indivíduos sem diagnóstico prévio de aterosclerose clínica, a partir das seguintes variáveis clínicas e laboratoriais: sexo, idade, tabagismo, colesterol total, HDL colesterol e pressão arterial sistólica. De acordo com as diretrizes do NCEP/ATP III, os indivíduos são considerados como baixo risco se a taxa de evento estimada de 10 anos for inferior a 10%, alto risco se a taxa de eventos de 10 anos for de 20%, e risco intermediário se a taxa de evento de 10 anos estiver entre 10% e 20%.

Se o modelo de risco de Framingham puder ser melhorado, o tratamento poderia ser mais bem direcionado, maximizando os benefícios do rastreamento e minimizando os danos. A oportunidade mais provável para melhorar o modelo é o uso de fatores de risco adicionais para

reclassificar aqueles no grupo de risco intermediário para alto ou baixo risco (U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, 2009).

6.2 Por que estudar o grupo intermediário?

Usando diretrizes anteriores, um grande grupo de risco intermediário foi identificado (PASTERNAK et al., 2003). Greenland e cols. (GREENLAND; SMITH; GRUNDY, 2001) analisaram a população adulta norte-americana e estimaram que 35% estão no grupo de baixo risco, 40% no grupo de risco intermediário e 25% no grupo de alto risco. A associação do escore de risco de Framingham, por exemplo, com DAC obstrutiva e placa aterosclerótica proximal foi testada por Nair e colaboradores (NAIR et al., 2008). Nesse estudo, no grupo com escore de risco baixo e intermediário de Framingham, houve uma proporção significativa de placa aterosclerótica proximal (75%) ou DAC obstrutiva (34%), muitos sem indicação atual de terapia com estatinas.

Um número substancial (60% a 70%) dos eventos cardiovasculares não anunciados ocorre em categorias não classificadas como de alto risco (LAUER, 2007). De fato, os índices clínicos atuais não fornecem uma visão completa do risco de um indivíduo para eventos cardiovasculares futuros, especialmente em indivíduos de risco intermediário (WALLACE; RICCO; BARRETT, 2014).

A estratégia individualizada em pacientes de alto risco, familiar aos médicos, exige avaliação com testes diagnósticos seguidos de intervenções médicas em pacientes selecionados. Os pacientes de alto risco percebem os benefícios substanciais e, por causa de seu risco de base aumentado, estão dispostos a considerar a terapia médica prolongada com riscos adversos concomitantes. Diferentemente, o grupo de pacientes de risco intermediário é vasto e heterogêneo, e não há recomendação clara de como manejá-lo. Na verdade, o grupo de risco intermediário abrange vários espectros que não se enquadram em uma grande caixa. A capacidade de reestruturar os pacientes de risco intermediário como baixo ou alto risco conferiria, certamente, benefícios importantes.

Há reconhecimento crescente de que o grupo de risco intermediário abrange, na verdade, um composto de indivíduos de alto risco para os quais uma terapia mais agressiva (ou seja, medicamentosa) pode ser indicada, e também contém indivíduos de baixo risco nos quais a doença cardiovascular pode ser tratada apenas com medidas de estilo de vida. Por essa razão, este grupo tem sido o terreno fértil para pesquisas sobre novos biomarcadores com o objetivo de melhorar as estimativas de risco individualizadas e conduzir a uma mais avançada avaliação (YEBOAH et al., 2012).

Para tal fim, uma série de técnicas não invasivas pode ser considerada como modificadores de risco para melhorar a previsão de risco e a tomada de decisão, incluindo biomarcadores séricos e testes de imagem (DETRANO et al., 2008; KIANOUSH et al., 2016; RIDKER et al., 2003; YEBOAH et al.,

2016). No entanto, todos eles têm limitações, seja de custo, precisão, tratamento excessivo ou exposição à radiação.

6.3 Abordagem prática no grupo intermediário: reclassificação do risco cardiovascular

Superestimar o risco de eventos cardiovasculares em 10 anos pode levar ao tratamento excessivo. O oposto também é verdade. O primeiro ponto a se destacar é que essa estimativa é dominada pela idade cronológica e não pela idade biológica verdadeira. De fato, até o momento, os testes anatômicos e funcionais não são capazes de alcançar boa precisão para todos os pacientes em todas as circunstâncias.

Além de fornecer uma taxa de risco independente significativa associada à incidência de DAC além do que já é conhecido com base nos fatores de risco tradicionais, um marcador deve ser capaz de carregar o poder de discriminação e reclassificação. A causalidade, portanto, não é um requisito para medir um biomarcador. A reclassificação avalia a proporção de indivíduos que se moveram adequadamente entre as categorias de risco pela aplicação do biomarcador (WANG, 2011). Em geral, é de maior valor e utilidade clínica quando o risco do indivíduo se encontra perto de um limiar de decisão (PIEPOLI et al., 2016). Refinar a previsão de risco e, assim, direcionar o tratamento de forma mais eficaz entre aqueles em risco intermediário é um dos objetivos mais importantes na prevenção de DAC, porque reclassificar esses indivíduos para cima (para alto risco) ou para baixo (para baixo risco) pode levar à decisão de tratamento clara.

Há esforços contínuos para alcançar marcadores que possam oferecer maior discriminação de pacientes de alto e baixo risco dentro do grupo de risco intermediário, incluindo biomarcadores circulantes, de imagem e genéticos. O benefício potencial em grupos de risco intermediário foi observado com a adição de informações de história dos pais aos escores de risco tradicionais. Embora muitos desses marcadores já tenham associação definida com desfechos clínicos futuros, seus dados até o momento são limitados em termos de capacidade de discriminação, calibração e reclassificação (WANG, 2011). Por exemplo, quando a Proteína C Reativa ultrasensível (PCR-us) > 3,0 foi adicionada a um modelo com fatores de risco tradicionais em mulheres no meio do espectro de risco previsto (risco previsto de FRS de 5% a 9%) no Women's Health Study (RIDKER et al., 2003) verificou-se uma taxa de eventos igual ou maior que a de algumas mulheres com risco previsto de FRS > 10%. Em contraste, outros estudos encontraram melhorias modestas ou ausentes (FOLSOM et al., 2006; PERSSON et al., 2009) na calibração do modelo com a adição de PCR-us.

Diversos marcadores de risco foram recentemente comparados diretamente entre si em estudo (YEBOAH et al., 2012) que examinou vários biomarcadores de doença cardíaca coronária e

doença cardiovascular (incluindo escore de cálcio coronariano (CAC), espessura média-intimal da carótida (EMI), índice tornozelo-braquial (ITB), dilatação fluxo-mediada da artéria braquial (DILA) e PCR-us em indivíduos assintomáticos classificados como grupo de risco intermediário. A comparação direta nos participantes mostrou que CAC, ITB, PCR-us e história familiar foram preditores independentes de incidente cardíaco ou DCV nesses indivíduos, sendo que CAC forneceu discriminação superior e melhor reclassificação de risco em comparação com outros marcadores de risco.

Um estudo subsequente do mesmo autor (YEBOAH et al., 2016) avaliou a precisão preditiva e melhora na reclassificação obtida pela adição do CAC, do índice ITB, da PCR-us e da história familiar de eventos cardiovasculares em participantes de MESA (Multi-Ethnic Estudo da Aterosclerose). Os autores descobriram que, entre os 4 marcadores de risco não tradicionais recomendados, o CAC é superior para melhorar a previsão de risco de eventos e pode ser útil em indivíduos nos quais a tomada de decisão quantitativa de tratamento pode ser incerta, embora tenha melhorado modestamente a estatística C de Harrell (0,74 vs 0,76; $p = 0,04$).

De acordo com a Sociedade Européia de Cardiologia (ESC, do inglês *European Society of Cardiology*) (PIEPOLI et al., 2016) a avaliação de fator de risco adicional é recomendada se tal fator melhorar a classificação de risco [por exemplo, pelo cálculo de um índice de reclassificação líquido (NRI)] e se a avaliação for viável na prática diária. Desta forma, a ESC descreve como exemplos de modificadores de risco que provavelmente têm potencial de reclassificação a história familiar de DAC prematura, o índice de massa corporal (IMC) e a obesidade central, o CAC, a presença de placas ateroscleróticas carotídeas e o ITB.

Semelhante à diretriz da ESC e com o objetivo de facilitar a discussão de risco clínico-paciente em adultos selecionados, a Diretriz Americana de 2019 (ACC / AHA, do inglês *American College of Cardiology/American Heart Association Task Force*) sobre a prevenção primária de doenças cardiovasculares (ARNETT et al., 2019) afirma que o CAC é o melhor para reclassificação dentre os exames disponíveis. Assim, a ausência de cálcio na artéria coronária poderia reclassificar um paciente para um grupo de menor risco no qual intervenções preventivas (por exemplo, estatinas) poderiam ser adiadas, enquanto aqueles com cálcio na artéria coronária ≥ 100 UA ou cálcio na artéria coronária $\geq 75^{\text{º}}$ percentil tem taxas de eventos CV para as quais o início da terapia com estatinas é razoável. Apesar dessa posição, os autores salientam a preocupação da prevalência de placa não calcificada em pacientes com CAC igual a zero e afirmam que o julgamento clínico sobre o risco deve sempre prevalecer.

6.4 Limitações dos critérios atuais

Indiscutivelmente, tabagismo, diabetes, dislipidemia e hipertensão, denominados como fatores de risco “convencionais”, são fatores de risco independentes (ARNETT et al., 2019; PIEPOLI et al., 2016) e apresentam fortes evidências que apóiam seu papel na patogênese da DAC. No entanto, como citado previamente, nem todos os eventos coronários ocorrem em indivíduos com múltiplos fatores de risco tradicionais. Os marcadores atuais fornecem uma visão incompleta do risco de um indivíduo para eventos cardiovasculares futuros. Entre 15% e 20% de todos os infartos do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais nos EUA ocorrem entre indivíduos não fumantes ou não portadores de hipertensão arterial ou diabetes (KHOT et al., 2003).

O peso dado à história familiar prematura (em parentes de primeiro grau, antes dos 55 anos de idade nos homens e 65 anos nas mulheres) na estratificação de risco também merece consideração, porque estima-se que apenas cerca de 20% dos casos de aterosclerose são geneticamente determinados. Sabemos que a DAC prematura (DAC-P) possui um componente genético, mas é improvável uma contribuição importante de genes atuando na ausência dos fatores de risco convencionais, como sugeriu o Projeto GENECARD (JOMINI et al., 2002). Nesse estudo, em comparação com a população em geral, os pacientes com DAC-P esporádica tiveram maior prevalência de hipertensão (29% vs. 14%, $p < 0,001$), hipercolesterolemia (54% vs. 33%, $p < 0,001$), obesidade (20% vs. 13%, $p < 0,01$) e tabagismo (76% vs. 39%, $p < 0,001$). Esses fatores de risco foram iguais ou até mais prevalentes em pacientes com DAC-P familiar (43% [$p < 0,05$ vs. esporádico DAC-P], 58% [$p = 0,07$], 21% e 72%, respectivamente). Portanto, a história familiar de DAC pode simplesmente representar exposição compartilhada a uma prevalência mais alta de fatores de risco clássicos. Embora seja claro que a história familiar é importante determinante de risco, a complexa interação entre fatores genéticos, exposição ambiental e escolhas de estilo de vida muitas vezes torna impossível uma avaliação confiável do risco de um indivíduo.

Sabe-se que os lipídios desempenham papel fundamental na formação e consequente ruptura de uma placa coronária instável (LIBBY et al., 2019a; VIRMANI et al., 2006), porém a análise lipídica clínica pelas 4 medidas lipídicas tradicionais (HDL-C, LDL-C, colesterol total e triglicerídeos) incluídas nos exames laboratoriais de rotina não refletem a real complexidade das alterações no metabolismo lipídico (ALSHEHRY et al., 2016). Na verdade, o plasma humano compreende centenas de espécies de lipídios química e funcionalmente diversas (ORTIZ; SANCHEZ-NINÑO, 2012) e o perfil lipídico simples para medir o colesterol plasmático não explica a existência de número substancial de pacientes que desenvolveram DCV apesar de terem uma faixa normal de colesterol plasmáticos (LYDIC; GOO, 2018). Entre os indivíduos sem doença cardiovascular prévia ou diabetes, 72,1% apresentavam níveis de LDL na admissão hospitalar por SCA abaixo de 130 mg/dL, que é a meta atual

de colesterol LDL para essa população (SACHDEVA et al., 2009). Além disso, mesmo diferenças relativamente pequenas nos níveis de LDL-C e VLDL-C estão associadas a alterações no risco de eventos CV, conforme mostrado por estudos de variantes genéticas que influenciam os níveis de lipídios dessas lipoproteínas (FERENCE, 2015; VARBO, 2013). Os níveis de HDL-C e LDL-C tiveram, portanto, baixas correlações genéticas e fenotípicas com a maioria das espécies lipídicas. Em estudo de mistura de subclasses de LDL, Hua e Malinski (HAA et al. 2019) mostraram que das três subclasses que compõem o LDL, apenas uma causa danos significativos. Dentre as subclasses de LDL, a B é a mais suscetível a ser oxidada (HOOGEVEEN, 2014) e, em relação às concentrações das subclasses I e A, pode ser ferramenta muito valiosa no diagnóstico precoce da aterosclerose e do potencial risco de infarto. Outro estudo recente abordou esse assunto. Pesquisadores da Finlândia (TABASSUM et al. 2018) usaram a lipidômica *shotgun* baseada em espectrometria de massas para definir as impressões digitais de espécies moleculares de lipídios em DCV. Os resultados apontam para prováveis variantes de risco para doenças, destacando o potencial do uso de perfis lipídicos detalhados no mapeamento de genes de doenças. Os autores analisaram as medições do painel de lipídios *versus* a análise lipidômica no nível molecular para avaliar se eles fornecem o mesmo grau de informação sobre a previsão de risco cardiovascular. Os dados lipidômicos moleculares, em conclusão, superaram os dados do perfil lipídico em várias ordens de magnitude e produziram uma cobertura detalhada dos padrões moleculares de lipídios em mais do que apenas doenças cardiovasculares que antes não eram conhecidas. Assim, eles concluíram que apenas as medidas de lipídios que são tradicionalmente usadas na prática clínica de rotina falharam em capturar a associação com espécies de lipídios moleculares que são potenciais fatores de risco de doenças independentes.

Outro ponto a ser ponderado nessa discussão é a EMI. Embora a ultrassonografia da artéria carótida forneça uma visualização facilmente acessível da anatomia vascular sem radiação e de baixo custo, a EMI tem várias limitações na estratificação de risco. Uma vez que a aterosclerose é distribuída assimetricamente pela artéria carótida, medir seletivamente apenas um ângulo provavelmente ignora a natureza assimétrica da doença, e o ângulo de insonação é um importante preditor de espessura média intimal máxima (TAJIK et al., 2012). Além disso, o risco de eventos cardíacos associado à EMI também não é linear (CHAMBLESS et al., 1997) e os dados sobre a mudança na EMI induzida por terapias de modificação do nível de lipídios ou redução da pressão arterial são muito limitados (BOTS et al., 2016). Na verdade, a relevância do EMI no tratamento de pacientes individuais está sendo questionada por dados publicados recentemente. No momento, as evidências que apoiam um papel para a medição de EMI em pacientes individuais são pobres (SILLESEN, 2014) e o rastreamento de pacientes assintomáticos com EMI não é prognosticamente útil, mesmo em pacientes diabéticos. A melhora da adição da EMI ao modelo basal na previsão do risco de doença

cardiovascular foi estudada por Den Ruijter e colegas (DEN RUIJTER; PETERS; ANDERSON, 2012) em uma meta-análise que incluiu 14 coortes de base populacional que contribuíram com dados para 45.828 indivíduos, durante acompanhamento médio de 11 anos. Demonstrou-se que a adição de medições de EMI ao Escore de Risco de Framingham foi associada a uma pequena melhora na previsão de risco de 10 anos de IAM ou acidente vascular cerebral, mas essa melhora provavelmente não teve importância clínica. A melhoria de reclassificação líquida com a adição de EMI foi pequena (0,8%; IC de 95%, 0,1% -1,6%). Naqueles indivíduos de risco intermediário, a melhora de reclassificação líquida foi de 3,6% em todos os indivíduos (IC de 95%, 2,7% - 4,6%). A adição de EMI, portanto, não adiciona informações clinicamente significativas às modalidades de predição padrão.

O escore de cálcio coronariano (CAC), por sua vez, é um exame não invasivo, confiável e reprodutivo (BLAHA et al., 2017; SCHMERMUND et al., 2001). Não requer injeção de material de contraste, fornece discriminação superior e reclassificação de risco em comparação com outros marcadores de risco (GEPNER et al., 2014; YEBOAH et al., 2012) e, quando identifica aterosclerose coronariana, aumenta a probabilidade de início ou continuação de terapias farmacológicas e de estilo de vida para prevenção de doenças cardiovasculares (GUPTA et al., 2017). Entretanto, apesar de todas essas características, o exame tem limitações. Em primeiro lugar, existem preocupações com relação aos custos e à exposição à radiação. Por ser um exame que expõe o paciente à radiação, o CAC não é um exame inócuo e isso é particularmente problemático no rastreamento de pacientes assintomáticos. Em uma revisão publicada no *The New England Journal of Medicine*, Tepper et al. (TEPPER, 2008) discutiram sobre a tomografia computadorizada como uma fonte crescente de exposição à radiação. Nesta publicação, os autores alertaram que o aumento nas imagens de TC de 3 milhões de exames em 1980 para 62 milhões de exames em 2005 pode levar a até 3 milhões de casos adicionais de câncer nas próximas décadas. Na verdade, embora o risco de uma única varredura seja baixo, o efeito da exposição à radiação é cumulativo ao longo da vida e exposição significativa à radiação está associada a risco aumentado de câncer. Em segundo lugar, é imperioso lembrar que a calcificação se desenvolve tardiamente no processo aterosclerótico e não reflete necessariamente o estado atual da placa, porque a calcificação pode ser inativa, contínua ou incompleta (NEWBY, 2017). A calcificação não causa diretamente eventos de cardiopatia isquêmica e as placas rompidas da lesão culpada não são necessariamente as de maior quantidade de cálcio (Figura 16), nem se relacionam diretamente com o grau de estenose luminal ou funcional (STONE et al., 2011; VAN ROSENDAEL et al., 2020; VIRMANI et al., 2006).

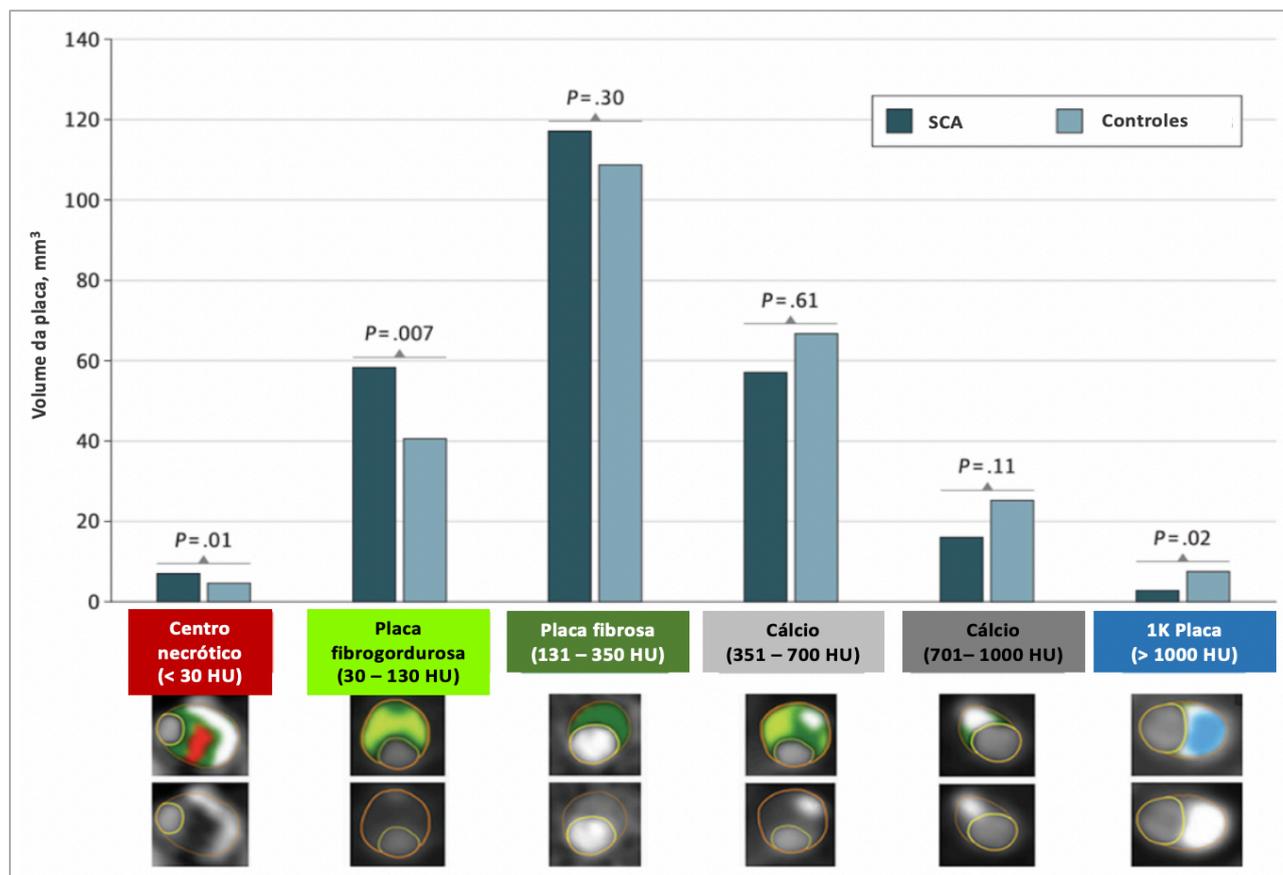


Figura 16. Volumes das placas ateroscleróticas. Volumes por paciente de núcleo necrótico (<30 unidades Hounsfield [HU]), fibro-graxo (30-130 HU), fibroso (131-350 HU), calcificado (351-700 HU), calcificado (701-1000 HU), e 1K (> 1000 HU) das placas são relatadas. Pacientes com SCA tem significativamente mais núcleo necrótico e placas fibrogordurosas e menos placa 1K em comparação com indivíduos de controle. Exemplos transversais de diferentes tipos de composição de placas são exibidos por cores diferentes. A placa 1K é mostrada em azul (Modificado de VAN ROSENDAEL et al., 2020).

Se, por um lado, um CAC alto pode às vezes ser seguido por outros testes de diagnóstico de doenças cardíacas que podem ou não fornecer resultados com valor clínico e podem estar associados a efeitos colaterais, por outro lado, a ausência de calcificação coronariana não exclui obstrução doença arterial coronariana (GOTTLIEB et al., 2010). Finalmente, uma limitação comumente declarada para a pontuação clínica do CAC é a ausência, até agora, de uma calculadora de risco para integrar essas informações na avaliação de risco cardiovascular global.

7. Biomarcadores e a estratégia translacional nas pesquisas médicas

Diversos são as estratégias e métodos utilizados nas pesquisas científicas que podem ser caracterizadas classicamente em dois pólos: pesquisas básicas e estudos aplicados. Apesar da multiplicidade conceitual, o principal objetivo da pesquisa básica é a adesão do conhecimento sem a obrigação de aplicá-lo a fins práticos. No que diz respeito aos estudos clínicos aplicados, estes são pesquisas orientadas para o paciente e podem ser epidemiológicas, comportamentais, podem analisar as manifestações das doenças, as intervenções terapêuticas, o desenvolvimento de novas tecnologias e se materializam classicamente nos ensaios clínicos (BUTLER, 2008; RUBIO et al., 2010). A pesquisa translacional, por sua vez, busca unir essas duas estratégias. Tenta encurtar a transmissão do conhecimento à medida que os resultados das pesquisas são transferidos da bancada laboratorial para a beira do leito, isto é, das pesquisas básicas para a clínica (RUBIO et al., 2010). De fato, a pesquisa translacional está invadindo as subespecialidades médicas com a promessa de ser uma evolução da chamada *Medicina Baseada em Evidências*, objetivando a aproximação cada vez mais de uma medicina personalizada e de precisão (LEMOS DA LUZ, 2018).

Ainda controverso na literatura, o termo biomarcador constitui uma característica que pode ser objetivamente quantificada, um indicador tanto de processos biológicos normais quanto de condições patológicas ou de respostas farmacológicas às intervenções terapêuticas (STRIMBU; TAVEL, 2010). Pode ainda se tratar de uma propriedade biológica cuja medida ou identificação é útil para a prevenção, diagnóstico, prognóstico, tratamento e acompanhamento das doenças (FUENTES-ARDERIU, 2013). Por conseguinte, sua elegibilidade se dá mediante caracterização objetiva, exatidão e reprodutibilidade. Seu uso em desfechos científicos tornou-se tão comum que normalmente é aceito sem maiores questionamentos (STRIMBU; TAVEL, 2010).

Especificadamente em relação ao escopo desta pesquisa, é reconhecido que a busca por um marcador biológico ou biomarcador circulante que seja reflexo de processos biológicos relevantes para a determinação e comportamento da placa aterosclerótica coronariana recebe, atualmente, grande foco da pesquisa médica na área cardiovascular. É fundamental lembrar que quando se fala em biomarcador "ideal", além de ser de fácil detecção (principalmente em relação à acurácia e ao custo), deve-se ter em mente os passos de sua validação. A correlação entre o fenótipo (doença) e biomarcador não deve ser puramente observacional, mas ser confirmada por métodos estatísticos, preferencialmente sendo utilizadas três grandes populações: (1) a piloto, onde se faz a primeira busca; (2) a população teste, onde se verifica se a hipótese é verdadeira ou não é nula e (3) a população confirmatória.

O primeiro estágio de validação de um biomarcador envolve estudos exploratórios pré-clínicos. Caracteriza-se por estratégias de detecção de biomoléculas (como proteômica e metabolômica) que permitam a descoberta de candidatos a biomarcadores, obtidos por meio de triagem de técnicas de imagem modernas e outras técnicas de alto rendimento. Esses marcadores identificados são priorizados com base no diagnóstico, características prognósticas, ou preditivas, que podem sugerir aplicabilidade clínica (A. F. SANTOS et al., 2020).

Biomarcadores têm, portanto, um catálogo cada vez maior de entidades biológicas endógenas (como proteínas/peptídeos, lipídios e metabólitos) sendo usados em ambientes clínicos, notadamente na Cardiologia. O uso de biomarcadores inclui testes de diagnósticos e de exclusão (por exemplo, troponina de alta sensibilidade para IAM, uma vez que as medições sensíveis da troponina cardíaca podem detectar níveis de dano isquêmico muito abaixo do limite clínico e transmitir informações de risco incrementais (THELIN; MELANDER; ÖHLIN, 2015), estratificação de risco/previsão do resultado do paciente (por exemplo, peptídeos natriuréticos na insuficiência cardíaca (VOLPE; RUBATTU; BURNETT, 2014) e monitoramento da resposta a medicamentos administrados (por exemplo, assinaturas de metabólitos pós intervenções farmacológicas (KADDURAH-DAOUK; WEINSHILBOUM, 2015).

O uso de biomarcadores e, posteriormente, seu sucesso em melhorar as informações clínicas personalizadas, depende da coleta, processamento e análise de amostras biológicas que devem ser feitas para um protocolo estabelecido. A espectrometria de massas, por exemplo, uma tecnologia analítica capaz de fazer medições com altos níveis de reprodutibilidade, precisão e exatidão, tem recebido interesse recente na pesquisa clínica por seu potencial para estender a corrente de descoberta, desenvolvimento e validação de biomarcadores (JANNETTO; FITZGERALD, 2016).

8. Uso da abordagem *multiômica* nos estudos de prospecção de biomarcadores

O exame clínico do paciente ainda representa a base de todo ato médico, especialmente quanto às considerações diagnósticas (CARNEIRO, 2017). É fácil, porém, imaginar que características biológicas mensuráveis podem não contemplar o estado clínico dos pacientes em sua completude: os sinais podem não necessariamente se correlacionarem com os sintomas da doença e vice-versa. Sendo assim, ampliar o estudo das vias fisiopatológicas é condição estratégica para o avanço do conhecimento médico. Nesse contexto, a avaliação de genes, seus transcritos e produtos está cada vez mais presente nas pesquisas médicas, corroborando com a compreensão molecular das mais diversas patologias.

As ciências “ômicas” buscam o entendimento do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas (CANUTO et al., 2018). Na era pós-genômica, os estudos biológicos são caracterizados pelo rápido desenvolvimento e ampla aplicação de tecnologias multi-ômicas, incluindo genômica, epigenômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica e lipidômica (ramo da metabolômica). São tecnologias muitas vezes baseadas no perfil "global" ou "direcionado" de amostras biológicas, como plasma, tecidos, urina, saliva, leite materno, cabelo, pele e excrementos. Analisar e integrar a grande escala dos dados gerados por análises “ômicas” são um grande desafio. Como a bioinformática cresceu nas últimas décadas, o campo desenvolveu uma série de novas metodologias para processamento, análise, interpretação e integração dos dados multi-ômicos de maneira eficiente.

As técnicas "ômicas" tratam das interações complexas dentro dos sistemas biológicos de um ponto de vista holístico, particularmente aquelas interações envolvidas na fisiopatologia da doença. Anteriormente, as abordagens reducionistas convencionais lidavam com cascatas de sinalização intracelular como modelos lineares, com as moléculas envolvidas confinadas a vias de sinal único. No entanto, diferentes vias se cruzam e são organizadas como redes, incluindo proteínas, bem como pequenas moléculas (HU; ZHANG, 2018).

Redes moleculares podem analisar dados multiômicos e revelam as relações entre várias moléculas funcionais, que é essencial para uma visualização abrangente dos processos biológicos de múltiplas perspectivas. Baseado em dados ômicos, bioinformática, rede molecular e bancos de dados públicos *online*, é possível visualizar processos biológicos em mapas de vias, interações de proteínas, ontologias funcionais, associações gene-doença, mecanismos de ação de drogas, medicina personalizada e biomarcadores e alvos potenciais, que também é um objetivo da biologia dos sistemas (SABIDÓ et al., 2012). A Figura 17 mostra o fluxo de trabalho dos estudos multiômicos.

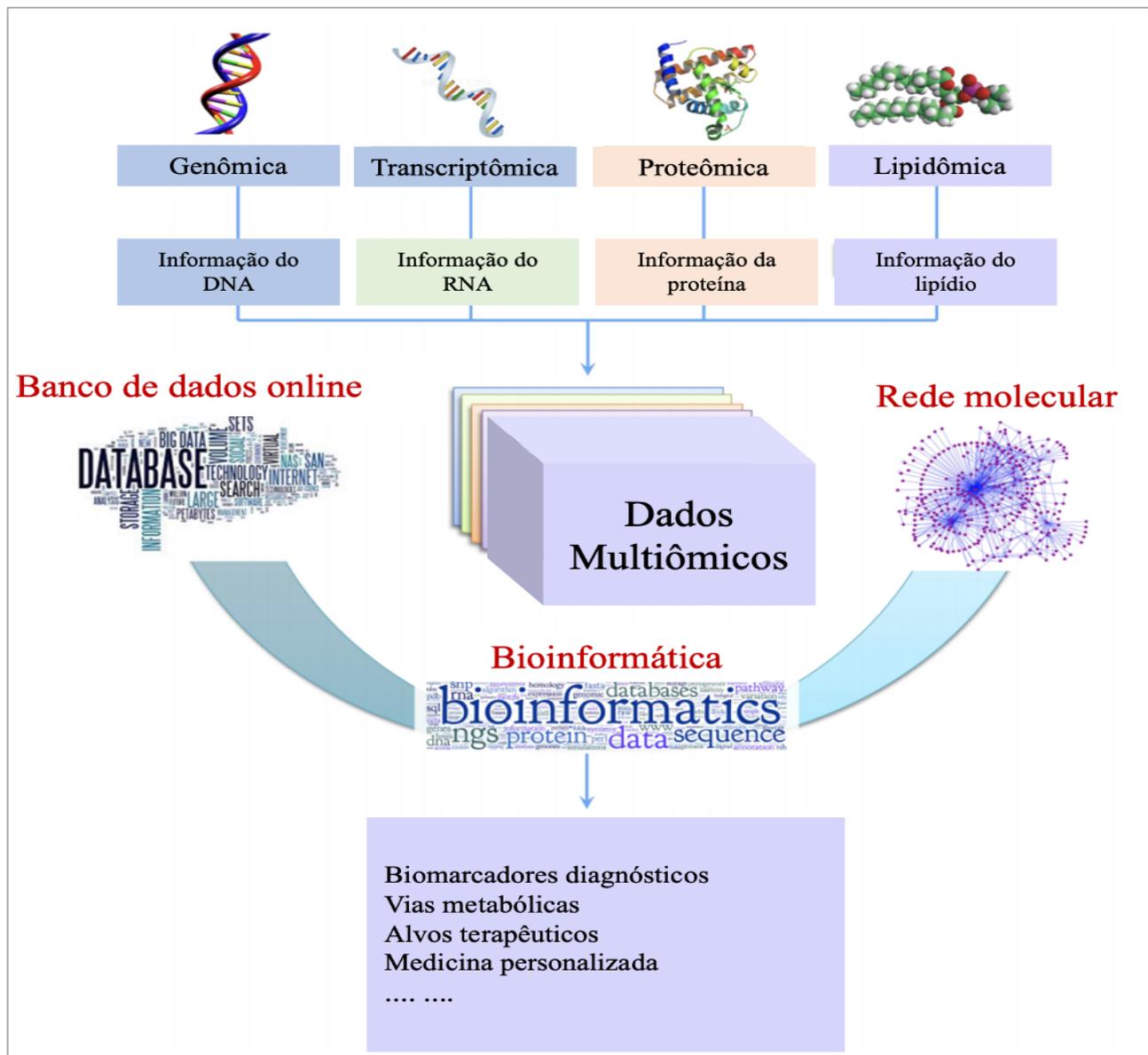


Figura 17. Os estudos multiômicos (modificado de HU; ZHANG, 2018).

Cobrir todo o metaboloma de um organismo biológico não é uma tarefa fácil, uma vez que existe uma grande diversidade química de metabólitos, com concentrações variadas. Não é possível, portanto, encontrar uma única técnica analítica capaz de fazê-lo. Assim, a aquisição dos dados dos estudos metabolômicos, vem sendo realizada com o uso de multiplataformas de análise, que proporcionam maior cobertura em termos de substâncias químicas detectadas e, conseqüentemente, proporcionam um maior entendimento biológico do organismo estudado (CANUTO et al., 2018).

8.1 Metabolômica

O termo metabolômica foi cunhado pela primeira vez no final da década de 1990 (OLIVER et al., 1998) e aumentou em popularidade e aplicabilidade desde então (KELL; OLIVER, 2016). A metabolômica, assim, não pode mais ser descrita como um novo conceito na arena clínica e agora é emergente.

Metabólitos são produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica (FIEHN, 2002). Metaboloma (do inglês, *metabolome*) é o conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular (até 1.500 Da), presentes ou alterados em um sistema biológico. Metabolômica (do inglês, *metabolomics*), por sua vez, termo introduzido em 2001 por Oliver Fiehn, é a análise abrangente e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico (FIEHN, 2001) que reflete o estado do organismo em determinado momento. Atualmente, tecnologias de alto rendimento permitem a quantificação de centenas de metabólitos circulantes em vários caminhos em uma única medição. Essa abordagem é vantajosa porque não se limita a uma única reação enzimática ou via; em vez disso, captura a complexidade das redes metabólicas. As análises metabolômicas buscam, em última instância, a resposta medida a nível molecular obtida a partir de uma visão integrada da bioquímica em organismos complexos (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

Entre as ciências “ômicas”, a metabolômica trouxe uma mudança de paradigma para a pesquisa metabólica, sendo a única que dá a idéia do fenótipo. A disponibilidade do sequenciamento do genoma humano não foi o suficiente para elucidar, por completo, o funcionamento biológico celular (PANDEY; MANN, 2000). Dessa forma, ratifica-se que a presença do genoma e mesmo do RNA na célula não é garantia de expressão fenotípica. O foco dos estudos não deve estar apenas no gene e em seus transcritos e, sim, também em seus principais agentes ativos: os metabólitos. Ao se comparar o metaboloma entre 2 ou mais grupos busca-se encontrar informações importantes no que diz respeito ao entendimento do fenótipo de um organismo, desempenhando um papel fundamental na biologia dos sistemas (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

Há duas abordagens para classificar as análises metabolômicas: metabolômica alvo (do inglês, *targeted metabolomics*), definida como a análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados de determinada classe química, ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas, e metabolômica global (do inglês, *untargeted metabolomics*), que está baseada na análise qualitativa do maior número de metabólitos possível, pertencentes a diversas classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo (CANUTO et al., 2018). O fluxograma de trabalho envolvido na análise metabolômica após definição do problema biológico inclui uma série de etapas, resumidos na Figura 18.

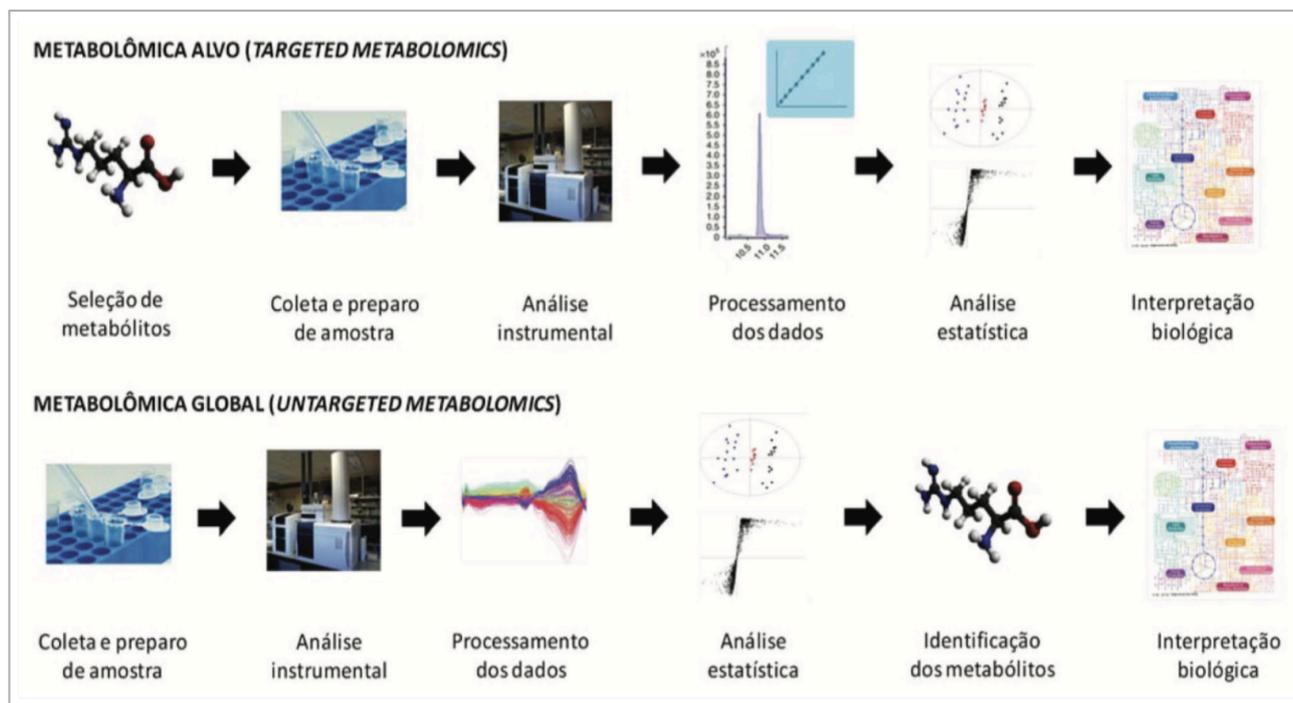


Figura 18. Fluxograma de trabalho na metabolômica. Esquema resumido do fluxograma de trabalho envolvido na análise metabolômica após definição do problema biológico (Modificado de CANUTO et al., 2018).

Há um número limitado de estudos longitudinais avaliando associações entre perfis metabolômicos abrangentes e risco de DCV. Sintetizar quantitativamente a literatura é um desafio por causa das ferramentas analíticas amplamente variadas e da diversidade de abordagens metodológicas e estatísticas. Embora alguns resultados sejam promissores, mais pesquisas são necessárias, principalmente para padronização de técnicas metabolômicas e abordagens estatísticas (RUIZ-CANELA et al., 2017).

8.2 Lipidômica: o ramo da metabolômica no cenário da aterosclerose

O lipidoma é a subdivisão lipossolúvel do metaboloma. A lipidômica, a análise abrangente do perfil lipídico de uma célula ou organismo, é, portanto, um subgrupo dentro do campo da metabolômica que estuda as vias e a interpretação do significado fisiológico dos lipídios com base na química analítica e análise estatística. Na pesquisa lipidômica, uma vasta quantidade de informações descreve (quantitativamente no tempo e espaço) as alterações na composição das espécies moleculares de lipídios acumuladas após perturbação por doenças, drogas, ambiente, etc. (HU; ZHANG, 2018). É o ponto final da cascata "ômica" e tornando-se, recentemente, alvo de pesquisas pós-genômicas.

Como previamente citado, dentro da faixa de "abordagens ômicas", o metaboloma é talvez o mais intimamente ligado ao fenótipo do indivíduo. Comparada com a genômica, por exemplo, que

está interessada nos genes que são quase fixos desde o nascimento, a lipidômica estuda os lipídios que são uma variante do metabolismo ou parte do metabolismo (EKROOS et al., 2010). Eles mudam continuamente, pois são influenciados por vários estados e podem relatar o estado da doença, bem como o efeito e a resposta a estímulos externos (por exemplo, terapia medicamentosa, nutrição, exercício, etc.). Mudanças na estrutura, função e expressão lipídicas podem induzir doenças como distúrbios metabólicos, câncer e doenças cardiovasculares. Esse não é um conhecimento novo. No entanto, as ferramentas avançadas para estudar e obter análises aprofundadas de lipídios em nível molecular simplesmente não estavam disponíveis. Agora, ao estudar a expressão e localização de todo o perfil lipídico, a lipidômica oferece uma compreensão completa das vias pelas quais os lipídios funcionam como parte de um sistema biológico. Existe o real potencial de se identificar biomarcadores de doenças até então desconhecidos, melhorar o diagnóstico de doenças relacionadas aos lipídios e desenvolver novas terapêuticas farmacológicas, abrindo ainda mais espaço para a medicina personalizada.

Nos últimos anos, os lipídios estão cada vez mais considerados não apenas como compostos de armazenamento de energia, mas também como atores interativos em vários ciclos de regulação celular e, assim, alcançam um interesse crescente na comunidade médica (KÖFELER et al., 2012). Lipídios não são simplesmente moléculas de gordura; são biomoléculas poliméricas complexas que contêm hidrocarbonetos e são estritamente hidrofóbicos. Desempenham papel chave na regulação metabólica - atuando no nível celular por meio do controle de energia de um organismo inteiro e das vias de sinalização. Exemplos de lipídios incluem óleos, gorduras, vitaminas solúveis em gordura, hormônios e lipoproteínas.

Moléculas lipídicas biogênicas se originam inteiramente ou em parte de dois tipos diferentes de blocos de construção bioquímicos: grupos cetoacil e isopreno. Com base nesta abordagem, os lipídios podem ser divididos em oito categorias: ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, esteróis lipídicos, prenol lípidos, sacarolipídios e policetidos (FAHY et al., 2005, 2009). As estruturas químicas que são representativas desses grupos são mostradas na Figura 19. Centenas e milhares de moléculas de lipídios estão contidas em cada categoria e são listadas em detalhes no banco de dados LIPID MAPS (<https://www.lipidmaps.org/>).

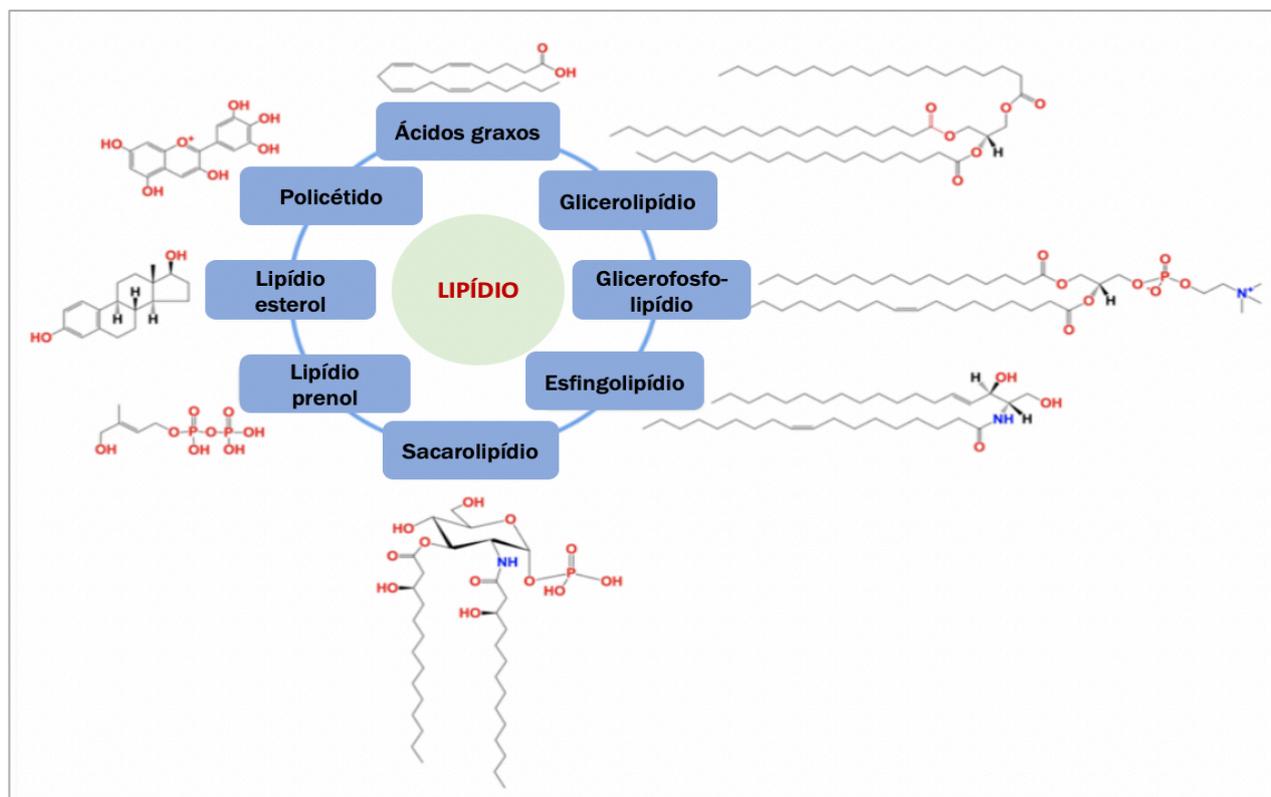


Figura 19. Oito categorias de lipídios com suas estruturas químicas representativas (modificado de HU; ZHANG, 2018).

9. Espectrometria de massas

9.1 Conceito de espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) é uma técnica analítica capaz de medir uma ampla gama de biomarcadores de pequenas moléculas (< 50 Da) a grandes estruturas macromoleculares (> 10.000 Da) em grande dinâmica de intervalos, colocando adequadamente seu uso para análise clínica de biomarcadores (HEANEY; JONES; SUZUKI, 2017). Em geral, pode ser usada para identificação de analitos desconhecidos, quantificação de compostos conhecidos (usando curvas de calibração e padrões analíticos) e determinação de propriedades estruturais e químicas de moléculas. Trata-se da técnica de análise mais usada na metabolômica, uma vez que proporciona análises rápidas, com alta sensibilidade e seletividade (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013).

Como toda molécula tem seu peso atômico, a relação carga x massa é a base da espectrometria de massas. Na MS, as moléculas de uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre carga (z), m/z. O espectro de massa é um gráfico que mostra a abundância (intensidade) relativa de cada íon que aparece como picos com m/z definidos, onde "m" é a massa molecular exata em Daltons e "z" é a carga do íon. Ou seja, o equipamento faz uma medida da razão massa sobre a carga (m/z) e não da massa em si. Por este motivo, a especificidade analítica é baseada

na capacidade de um espectrômetro de massa de “pesar na escala molecular”. Na forma mais simples, o espectrômetro de massas fornece algum tipo de impressão digital molecular do analito de interesse (JANNETTO; FITZGERALD, 2016). Desta maneira, moléculas e seus fragmentos são ionizados e cada uma destas unidades apresenta uma massa e uma carga específica, o que permite sua identificação precisa.

As características fundamentais de um espectrômetro de massas são: (1) produção de íons em fase gasosa; (2) aceleração dos íons a velocidades específicas em um campo elétrico; (3) separação dos íons por um analisador de massas; (4) detecção de cada íon em um m/z específico.

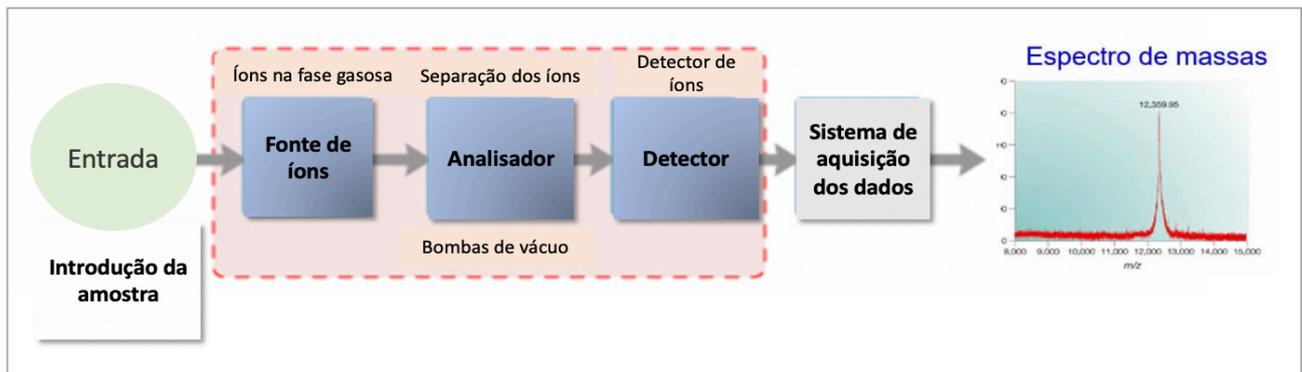


Figura 20. Componentes de um espectrômetro de massas. O sistema de entrada transfere a forma gasosa da amostra para o vácuo da câmara de geração de íons do espectrômetro de massas. Na câmara de geração de íons, as moléculas neutras da amostra são ionizadas e, em seguida, aceleradas para o tubo do analisador de massas. O tubo do analisador de massas é a parte mais importante da qual depende uma faixa do espectrômetro de massas. Este segmento separa os íons gerados, seja no espaço ou no tempo, de acordo com sua relação massa-carga (m/z). Uma vez que os íons são separados, eles são coletados e detectados na câmara do coletor de íons. Em seguida, o sinal é transferido para um sistema de coleta de dados para investigação dos dados. O alto vácuo é aplicado entre a câmara de geração de íons, tubo analisador e coletor de íons. O sistema de vácuo está mantendo a pressão baixa o que minimiza as chances de reação íon-molécula, espalhamento e neutralização dos íons (modificado de BAGHEL et al., 2017).

Nos experimentos de descoberta onde se busca investigar todo o perfil lipídico (*discovery lipidomic*), é comum a seleção de um conjunto de amostras com determinada afecção que será comparada com controles, usando espectrometria de massas, sendo possível identificar um conjunto amplo de lipídios presentes, incluindo aquelas pouco abundantes. Assim, ao invés de se procurar somente a presença, ausência ou até mesmo a quantidade de determinado lipídio, ampliam-se as possibilidades investigativas ao se encontrar o lipidoma daquela amostra. Fazendo-se, então, análises pertinentes às hipóteses, torna-se possível a busca por biomarcadores e/ou lipídios inéditos para aquela condição analisada, bem como, um maior entendimento das vias patogênicas de uma dada afecção.

Com o objetivo de se obter uma ferramenta analítica mais rápida e eficiente do que as técnicas isoladas, pode-se fazer o acoplamento da MS com outras técnicas. Dessa maneira, as técnicas MS-hifenadas fornecem maior utilidade por meio da separação de muitas centenas de

moléculas biológicas, reduzindo, portanto, a complexidade analítica (HEANEY; JONES; SUZUKI, 2017). Um exemplo dessa abordagem é extrair metabólitos de uma amostra e separá-los antes da análise de MS usando técnicas de cromatografia, como cromatografia gasosa (GC, do inglês, gas chromatography) ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, liquid chromatography). A cromatografia acoplada ao MS permite a detecção e separação de lipídios estruturalmente semelhantes e da mesma classe. Assim, o acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (VÉKEY, 2001).

O desenvolvimento de várias plataformas de analisador, como um espectrômetro de massas quadrupolo, permite a filtragem mais seletiva de moléculas, possibilitando detectar biomarcadores em concentrações cada vez mais baixas. Outra característica desta configuração é a capacidade de melhorar a identificação do analito por espectrometria de massas em tandem, comumente conhecida como MS/MS. Trata-se de uma técnica espectrométrica que, ao invés de utilizar apenas um analisador de massas para separar os íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas (MS_1 e MS_2), em que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida (KITSON, 1996). Essa técnica é amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, acoplada à cromatografia, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter (VÉKEY, 2001).

Portanto, a implementação de técnicas de alto rendimento analítico, como o é a espectrometria de massas, possibilita análises descritivas e comparativas, com alta precisão, não invasivas ou minimamente invasivas (KARTHIKKEYAN et al., 2018).

9.2 Papel de espectrometria de massas na cardiologia translacional

A espectrometria de massas é utilizada há várias décadas, especialmente na área da química, visto que identifica as mais variadas substâncias, conhecidas ou não. Na Medicina, historicamente, o sucesso da MS no laboratório clínico concentrou-se em confirmação de abuso de drogas, triagem neonatal (identificação de erros inatos do metabolismo) e análise de hormônios esteróides.

As aplicações clínicas da MS continuaram a se expandir, e, atualmente, a espectrometria de massas está sendo usada em quase todas as áreas da medicina laboratorial e de pesquisa clínica

(investigação, descobrimento e validação de novos biomarcadores); monitoramento de drogas terapêuticas; análise de hormônios/esteróides (endocrinologia); toxicologia; fármaco-genômica (p.ex.: melhoramento da dose terapêutica voltada para individualização (considerando o fenótipo), etc.

Na Oncologia, por exemplo, a análise molecular por MS de tecidos tumorais pôde incorporar biomarcadores específicos do tumor na tomada de decisão clínica para melhorar a detecção e diagnóstico da neoplasia, fazendo desta uma tecnologia clínica e intraoperatória potencial para diagnóstico *ex vivo* e *in vivo* (CALLIGARIS et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

Na Cardiologia, podem ser citadas recentes aplicações de biomarcadores presentes na insuficiência cardíaca, por exemplo, como N-óxido de trimetilamina (TMAO) (TANG et al., 2014) e peptídeo natriurético do tipo B (BNP) (NIEDERKOFER et al., 2008). Ambas são moléculas que mostraram interesse repetido da pesquisa usando técnicas baseadas em MS.

Com a crescente dependência da medicina personalizada, a MS tem uma capacidade inata de melhorar a tomada de decisão clínica por meio das medições de biomarcadores que podem não ser detectáveis por métodos alternativos. Para exemplo, imunoenaios atuais para medir BNP para doenças cardiovasculares sofrem de uma falta de especificidade para detectar a molécula BNP intacta, também medindo suas formas truncadas coexistentes na circulação (MILLER et al., 2011). Sabe-se hoje que a seleção das diferentes formas do BNP é útil na estratificação de risco de pacientes com insuficiência cardíaca aguda (SUZUKI et al., 2017) e que entender a distribuição dessas diferentes formas requer o uso de MS.

Recentemente, McGranaghan *et al.* (MCGRANAGHAN et al., 2020) publicaram uma revisão sistemática com as últimas publicações (de janeiro /2010 a julho/2019) descrevendo biomarcadores metabólicos de risco para doenças cardiovasculares. Noventa por cento (90%) das publicações selecionadas eram baseadas em MS, mostrando o progresso e a capacidade dessa técnica na busca de metabólitos marcadores de doenças. Um total de 39 biomarcadores foram significativamente associados a DCV fatal, dos quais 27 foram associados a um risco mais elevado e 12 foram associados a um risco inferior. O grupo de compostos com mais biomarcadores relatados foi de glicerofosfolipídios com 12 espécies diferentes em 6 estudos diferentes.

Da mesma forma, Floegel *et al.* (FLOEGEL et al., 2018) investigaram a associação de acilcarnitinas, aminoácidos, fosfolipídios e hexose, com o risco de IAM e acidente vascular cerebral isquêmico em duas grandes coortes prospectivas (Heidelberg e (EPIC) -Potsdam). Esfingomielinas (C16:0, C24:0 e C16:1), hidroxí-esfingomielina (C22:1), diacil-fosfatidilcolinas (C38:3 e C40:4) e acil-alquil-fosfatidilcolinas (C36:3, C38:3, C38:4 e C40:3) mostraram correlação positiva com o colesterol total e LDL e foram encontrados associados ao risco de IAM em adultos saudáveis em ambas as coortes. Quando ajustados adicionalmente para colesterol total, LDL e HDL, triglicérides e PCR-us,

os metabólitos glicerofosfolipídicos C38:3, C40:4 e C36:3 permaneceram associados ao risco de IAM. Em resumo, três metabólitos envolvidos na via do ácido araquidônico foram capazes de melhorar a previsão de DCV independentemente dos fatores de risco tradicionais e outros biomarcadores.

Paynter e colaboradores (PAYNTER et al., 2018) identificaram e validaram 33 metabólitos associados à DAC em mulheres pós-menopausa, 8 de cada permaneceram independentemente associados após o ajuste para fatores de risco tradicionais: glutamina, glutamato, monofosfato de citidina, hidroxi-PCs (C34: 2 e C36: 4) e derivados oxidados do ácido araquidônico (15-HETE, 5-HETE e 11-HETE) em ambos os conjuntos de dados de descoberta e validação. C34: 2 hidroxifosfatidilcolina foi identificada como o marcador mais forte. Usando abordagem diferente, um estudo de metabolômica não direcionada, Ganna *et al.* (GANNA et al., 2014) também encontraram quatro metabólitos relacionados a lipídios (LPC 18: 1, LPC 18: 2, MG 18: 2 e SM 28: 1) associados a DCV incidente independentemente dos principais fatores de risco CV em 1.028 indivíduos.

Outro grupo de compostos que deve ser destacado é a acilcarnitina, que apresentou efeitos combinados em diferentes estudos. Rizza *et al.* (RIZZA et al., 2014) mostraram que as acilcarnitinas de cadeia média e longa (acetil carnitina C2, C6, C8, C10, C10: 1, C12, C12: 1, C14, C14: 1, C14: 2, C16, C16: 1, C18: 1 e C18: 2) aumentam significativamente a precisão de predição do score de Framingham, sugerindo que esta classe de metabólitos está independentemente associada à ocorrência de eventos cardiovasculares subsequentes em idosos. Shah *et al.* (SHAH et al., 2012) realizaram o perfil de MS de 69 metabólitos e avaliações lipídicas em 2.023 pacientes submetidos a cateterismo cardíaco. Eles demonstraram que 5 de um total de 13 metabólitos fatores identificados pela análise multivariada estavam associados à mortalidade na análise univariada. Esses fatores incluem acilcarnitinas de cadeia média, dicarboxilacilcarnitinas de cadeia curta, dicarboxilacilcarnitinas de cadeia longa, aminoácidos de cadeia ramificada e ácidos graxos. Os mesmos autores também usaram a análise de reclassificação de risco para determinar se os níveis metabolômicos poderiam ajudar a estimar o risco do paciente de eventos cardiovasculares. O estudo se concentrou em pacientes classificados como de risco intermediário com base em preditores clínicos. No total, 27,5% dos pacientes foram reclassificados pelo modelo metabolômico para mortalidade: 19% dos pacientes foram reclassificados para baixo risco, enquanto 8,5% foram reclassificados corretamente para um nível de risco mais alto.

Ellims et al. (ELLIMS et al., 2014) avaliaram prospectivamente a placa da artéria coronária na CCTA em uma coorte de indivíduos assintomáticos que foram classificados como de risco intermediário de DAC pelo score de Framingham usando fatores de risco tradicionais, e determinaram se o perfil lipídico plasmático avaliado por MS e outros marcadores auxiliares de DAC poderiam prever a carga da placa e a composição da placa nesses indivíduos. Dezoito espécies de lipídios [monossilodihexosilgangliosídeo (GM3 18:0), fosfatidilcolina (PC 32:1), fosfatidiletanolamina

(PE 32:1, PE 36:4, PE 38:5, PE 38:6, PE 40:5, PE 40:6), fosfatidilinositol (PI 32:1, PI 34:1, PI 40:5, PI 40:6), éster de colesterol (CE 16:1, CE 16:2, CE 17:1, CE 18:1, CE 22:4), diacilglicerol (DG 16:1/18:0)] demonstraram associações significativas com carga de placa não calcificada, mas não com carga total de placa ou placa calcificada. Nenhum outro marcador de DAC foi encontrado para prever a carga da placa da artéria coronária. Seus achados sugerem que, em pacientes assintomáticos com risco intermediário de DAC, o perfil lipídico plasmático pode auxiliar na previsão da presença de placa coronariana não calcificada. Essa técnica poderia permitir a re-estratificação desses pacientes para uma categoria de maior ou menor risco e, assim, possibilitar estratégias de manejo de prevenção primária mais adequadas.

Também usando perfis de lipídios plasmáticos, o estudo de Meikle PJ *et al.* (MEIKLE *et al.*, 2011) demonstrou o potencial desta abordagem utilizando MS para a identificação de DAC instável. Um estudo de perfil lipídico plasmático de 220 indivíduos foi capaz de identificar 102 lipídios diferenciados entre pacientes com DAC estável e controles saudáveis e 50 lipídios entre DAC estável e instável. Modelos que incorporam lipídios e fatores de risco tradicionais forneceram classificação melhorada de DAC instável de DAC estável (estatística C = 0,875, IC de 95% 0,874–0,877) em comparação com modelos contendo apenas fatores de risco tradicionais (estatística C = 0,796, IC de 95% 0,795–0,798). Os autores assim concluíram que o perfil lipídico plasmático pode contribuir para uma nova abordagem de estratificação de risco para DAC.

10. Objetivos

10.1 Objetivo geral

Comparar, por espectrometria de massas utilizando GC-MS e LC-MS, a metabolômica entre pacientes com placas ateroscleróticas coronarianas na CCTA (classificadas pelo CT-LeSc) e sem placa (controle), utilizando-a como possível discriminante para re-estratificação de risco cardiovascular em pacientes de risco intermediário de Framingham.

10.2 Objetivos específicos

1. Abordar as alterações metabolômicas presentes na DAC subclínica que podem ajudar no diagnóstico, ainda que adjuvante, com foco naqueles cujos marcadores de risco tradicionais não foram capazes de prever a presença da aterosclerose coronariana;

2. Comparar a metabolômica entre pacientes com placas coronarianas classificados por CT-LeSc estratificados por grupos Alto e Baixo CT-LeSc, como também por tercís (T1, T2 e T3).

3. Encontrar, *in vivo*, potenciais biomarcadores envolvidos no processo de aterosclerose coronariana de pacientes assintomáticos que possam corroborar com a estratificação de risco de eventos coronarianos;

4. Aprofundar a investigação quanto à assinatura molecular de pacientes com escore CT-LeSc alto e aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na instabilidade da placa aterosclerótica.

11. Justificativa

Estima-se que mais da metade dos americanos morrerá de DCV, e muitos deles terão morte cardíaca súbita ou IAM como sua primeira manifestação. Portanto, a capacidade de rastrear a DAC precoce é atraente do ponto de vista preventivo da saúde (ARNETT et al., 2019).

A ruptura da placa coronária causando um evento cardiovascular agudo frequentemente ocorre em placas que não causam obstrução significativa e não são detectáveis por imagens de estresse, uma abordagem comumente usada para avaliação de risco. O teste de estresse para detectar uma estenose coronária limitante de fluxo entre indivíduos assintomáticos é improvável que identifique uma maioria significativa de indivíduos em risco porque quase 70% dos eventos coronários agudos resultam de lesões coronárias que não são hemodinamicamente significativas ou limitantes de fluxo antes do evento. A identificação da placa propensa à ruptura ou “vulnerável” pode agregar valor prognóstico e, portanto, tornou-se um foco importante no diagnóstico cardiovascular (LIBBY et al., 2019b).

Atualmente, observa-se na literatura médica a busca por critérios com maior sensibilidade e acurácia para pacientes que se encontram em estratificação de risco cardiovascular *borderline*, ou seja, entre os limites de classificações superiores (alto risco) ou inferiores (baixo risco). No contexto da prevenção da doença cardiovascular mais prevalente no mundo, o grupo de risco intermediário é justamente a categoria mais heterogênea, cujo manejo clínico ainda é desafiador e incerto.

Nesse sentido, a identificação prospectiva de pacientes de risco intermediário que desenvolverão SCA é o “Santo Graal” da Cardiologia Preventiva, pois permitiria uma intervenção focada e intensiva, provavelmente minimizando o desfecho sintomático dos pacientes. Se o modelo de risco clínico puder ser melhorado, o tratamento poderia ser mais bem direcionado, maximizando os benefícios do rastreamento e minimizando os danos. Entretanto, embora os últimos anos tenham visto um grande interesse na precisão das equações de predição de risco cardiovascular, permanece a incerteza sobre o uso de qualquer estimativa de risco cardiovascular na prática clínica que realmente melhore os resultados cardiovasculares (ARNETT et al., 2019). A avaliação de risco tradicional mostrou-se útil na previsão de resultados a longo prazo e em grandes populações.

Contudo, ela perde acurácia em predizer eventos do futuro próximo, particularmente na prática clínica individual. A oportunidade mais provável para melhorar o modelo é o uso de fatores de risco adicionais para reclassificar aqueles no grupo de risco intermediário para alto ou baixo risco.

Criticamente, o atual conhecimento sobre a vulnerabilidade da placa não se traduz em oficiais recomendações de diretrizes, ainda (KRUK, 2020). As diretrizes ESC de prevenção cardiovascular mencionam o CAC, provavelmente refletindo a carga geral da placa aterosclerótica coronariana, como um potencial modificador de risco (PIEPOLI et al., 2016). No entanto, o cálcio coronariano não é indicativo da presença de uma placa vulnerável, e seu papel no monitoramento da eficácia da terapia é um quebra-cabeça, uma vez que a conversão de placas não calcificadas em calcificadas marca sua estabilização e não progressão (BLAHA; SILVERMAN; BUDOFF, 2014; SANDFORT; LIMA; BLUEMKE, 2015). Soma-se a isso o fato de que nem todos os eventos coronarianos ocorrem em indivíduos com múltiplos fatores de risco tradicionais, como já debatido anteriormente.

Uma vez que os lipídios desempenham papel fundamental na formação e subsequente ruptura da placa aterosclerótica coronária, certas espécies de lipídios também poderiam ser marcadores úteis de DAC subclínica. O perfil lipídico do plasma, uma abordagem nova e rápida para a análise lipídica do plasma, já demonstrou discriminar entre pacientes com DAC estável e instável (MEIKLE et al., 2011).

Nesse árduo trabalho de identificar as melhores estratégias para implementar ferramentas na prática para combater a epidemia de doenças cardiovasculares na população, os estudos moleculares sobre a caracterização de placas vulneráveis e o entendimento deste evento, principalmente no grupo de indivíduos assintomáticos de risco intermediário, poderiam agregar informações mais precisas sobre o risco do evento clínico. Encontra-se nas áreas translacionais, portanto, a necessidade da busca pela caracterização de outros marcadores moleculares, como de uma assinatura lipídica, para o entendimento de sua relevância clínica. A perspectiva é de que este modelo translacional, que acopla a análise de candidatos a biomarcadores associada à detalhada avaliação anatômica da árvore coronariana por meio do escore de Leaman, possa aprofundar o conhecimento atual da aterosclerose e o fenótipo dos pacientes em um nível de detalhe não atingível com os métodos analíticos clássicos, objetivando, em última análise, atingir terapias mais personalizadas, ainda que adjuvantes, para esta doença tão prevalente e complexa.

Especificadamente em pacientes assintomáticos, estudos “ômicos” já descreveram alterações moleculares associadas à sua fisiopatologia da aterosclerose coronariana subclínica (ELLIMS et al., 2014), mas, pelo nosso conhecimento, esses estudos não reportam sua correlação especificadamente com escore tomográfico de Leaman como o fazemos nesta pesquisa, o que faz deste estudo pioneiro.

12. População do estudo

Participaram da pesquisa pacientes assintomáticos que preencheram critérios clínicos de risco intermediário do escore de Framingham atendidos em Clínica Cardiológica especializada *Cardioclínica* (Figura 4. Apêndice), na cidade de Brasília (DF), Brasil, e que tinham realizado nos últimos três meses CCTA por indicação de seus médicos assistentes e teste não invasivo (cintilografia de perfusão miocárdica) negativo para isquemia. Foram também avaliados para a entrada no projeto pacientes que realizaram CCTA no *Instituto de Cardiologia do Distrito Federal (ICDF)*, situado na mesma cidade, entre janeiro de 2018 e julho de 2019, selecionados por meio do banco de dados do Setor de Radiologia do ICDF e contactados por via telefônica (Figura 2. Apêndice).

O esforço amostral inicial, isto é, o número de pacientes convocados para compor a pesquisa foi de 598 pacientes. Os pacientes foram excluídos (n = 556) em função de (1) sintomas cardiovasculares atuais, (2) DAC conhecida, (3) teste não invasivo positivo para isquemia (cintilografia de perfusão miocárdica ou teste ergométrico) e (4) escore de Framingham baixo ou alto. Dos 43 indivíduos selecionados, 2 foram excluídos por desistência e 1 por uso crônico de corticosteróides em função de doença auto-imune (lúpus eritematoso sistêmico). Assim, devido ao crivo dos critérios de inclusão, critérios de exclusão e desistências, um total de 40 pacientes foram incluídos neste estudo, o que garantiu que todos os fenótipos (grupos) tivessem número suficiente para demonstrar robustez estatística na análise. A Figura 21 descreve a seleção dos indivíduos e o esforço amostral.

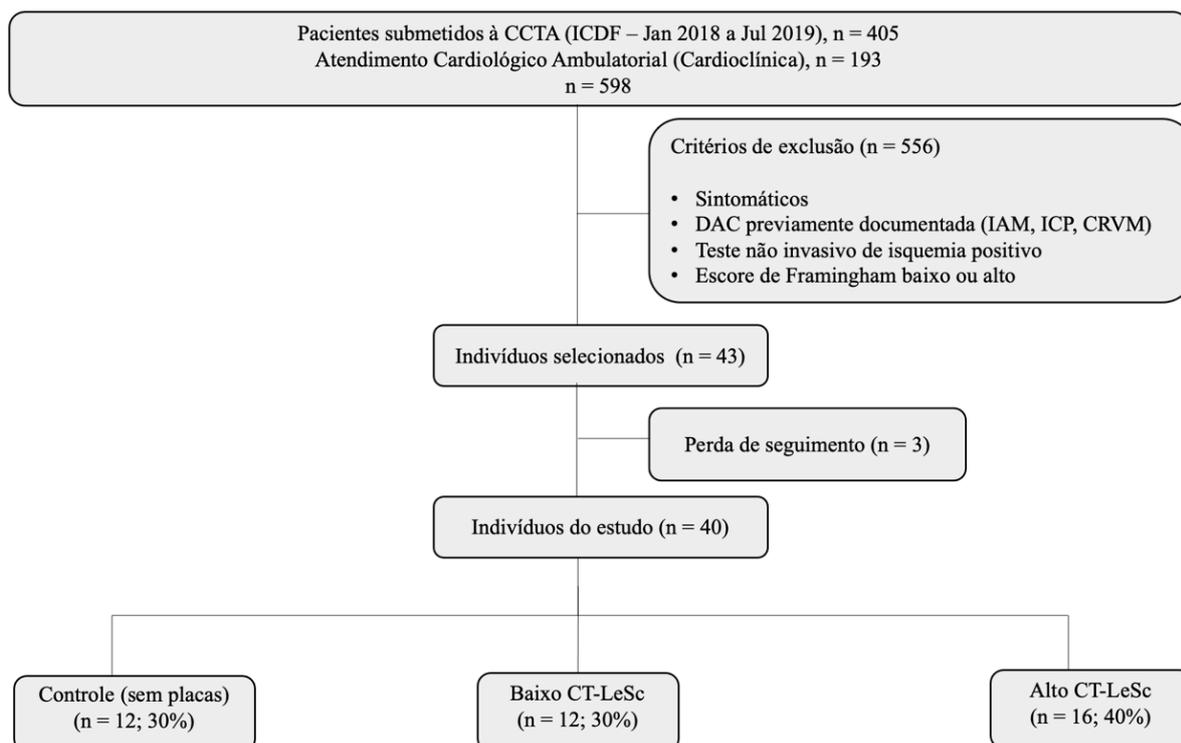


Figura 21: Esforço amostral. Um total de 40 pacientes assintomáticos com risco cardiovascular intermediário pelos critérios de Framingham (12 pacientes do grupo controle - sem placas - e 28 pacientes com placas, sendo 12 pacientes com CT-LeSc baixo e 16 pacientes com CT-LeSc) alto foram incluídos neste estudo. CCTA: do inglês, Coronary Computed Tomography Angiography - angiografia coronária por tomografia; ICDF: Instituto de Cardiologia do Distrito Federal; DAC: doença arterial coronariana; IAM: infarto agudo do miocárdio; ICP: intervenção coronariana percutânea; CRVM: cirurgia de revascularização miocárdica; CT-LeSc: escore de Leaman adaptado por tomografia computadorizada.

Os participantes da pesquisa, todos classificados como risco intermediário pelo escore de Framingham, foram separados em 4 grupos de acordo com o escore de Leaman adaptado. A metodologia para o CT-LeSc foi previamente descrita e é apresentada na Tabela 1. Resumidamente, para este escore, são usados 3 conjuntos de fatores de ponderação: (1) localização das placas coronárias, responsável pela dominância, (2) tipo de placa, com um fator de multiplicação de 1 para placas calcificadas e de 1,5 para placas não calcificadas e mistas, e (3) grau de estenose, com um fator de multiplicação de 0,615 para não obstrutivo (estenose < 50%) e de 1 para lesões obstrutivas (estenose ≥ 50%). O CT-LeSc para cada paciente foi calculado como a soma do CT-LeSc parcial de todos os segmentos coronários avaliáveis.

Desta forma, os grupos formaram a seguinte distribuição: (1) grupo controle, composto por pacientes sem placas nas artérias coronárias (n = 12); (2) grupo com placa (n = 28), subdividido em (3) alto risco (CT-LeSc > 5, n = 16) e (4) baixo risco (CT-LeSc ≤ 5, n = 12). Os participantes também foram categorizados em grupos baseados nos tercís de Leaman: (1) indivíduos com placas e escore de Leaman T1 (n = 9); (2) indivíduos com placas e escore de Leaman T2 (n = 10) e (3) indivíduos com placas e escore de Leaman T3 (n = 9).

Todos os pacientes foram convidados a realizar coleta de sangue periférico no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da Universidade de Brasília - UnB, Brasil – DF (LBQP/UnB), além dos seguintes exames (caso não tivessem sido realizados nos últimos 3 meses): (1) ecocardiograma transtorácico com Doppler colorido para análise estrutural cardíaca, com avaliação, entre várias medidas, do tamanho das câmaras cardíacas, das funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, e da contratilidade segmentar, e (2) ultrassonografia de artérias carótidas e vertebrais com medida da espessura médio-intimal (EMI) e análise da presença de placas de ateroma. Ambos os exames foram realizados na *Cardioclínica*.

Todos os pacientes foram submetidos à análise dos demais marcadores de risco para DAC além do escore de Framingham para serem comparados com o perfil molecular e com o escore de Leaman quanto à predição da presença de placa coronariana, assim descritos: (1) CAC; (2) EMI (3) PCR-us e (4) história familiar para DAC precoce. A estratificação dos pacientes quanto a esses marcadores de doença aterosclerótica subclínica seguiram as recomendações consolidadas na literatura. Dessa maneira, os seguintes valores reclassificaram o paciente de risco intermediário para alto risco: (1) CAC: acima de 100 ou do percentil 75 para a idade ou sexo; (2) EMI: acima de 1,0 mm;

(3) PCR-us > 2 mg/dl e (5) História familiar de DAC precoce: parentes de primeiro grau homens < 55 anos e mulheres < 65 anos.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília/Plataforma Brasil aprovou o estudo (Figura 1. Apêndice). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de forma voluntária e respeitando a Declaração de Helsinque. Uma entrevista estruturada foi conduzida e a história clínica adquirida, avaliando presença de sintomas cardiovasculares, terapia médica e os seguintes fatores de risco cardíaco: diabetes mellitus, hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica, história familiar positiva de DAC e tabagismo atual, e esses foram classificados de acordo com o escore de Framingham.

O sangue coletado por punção venosa periférica com agulha e seringa estéril num volume de 5 mL foi centrifugado na presença de EDTA para obtenção de plasma do sangue total e acondicionado em um *superfreezer* a -80°C no LBQP/UnB. Posteriormente, o material foi enviado para CEMBIO Facultad de Farmacia Universidad CEU San Pablo em Madri/Espanha (Figura 3. Apêndice) para análise metabólica utilizando técnicas analíticas de alto desempenho: a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS/MS) e a ultra cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (uPLC-MS/MS). A seleção dos pacientes e os métodos do estudo estão mostrados na Figura 22.

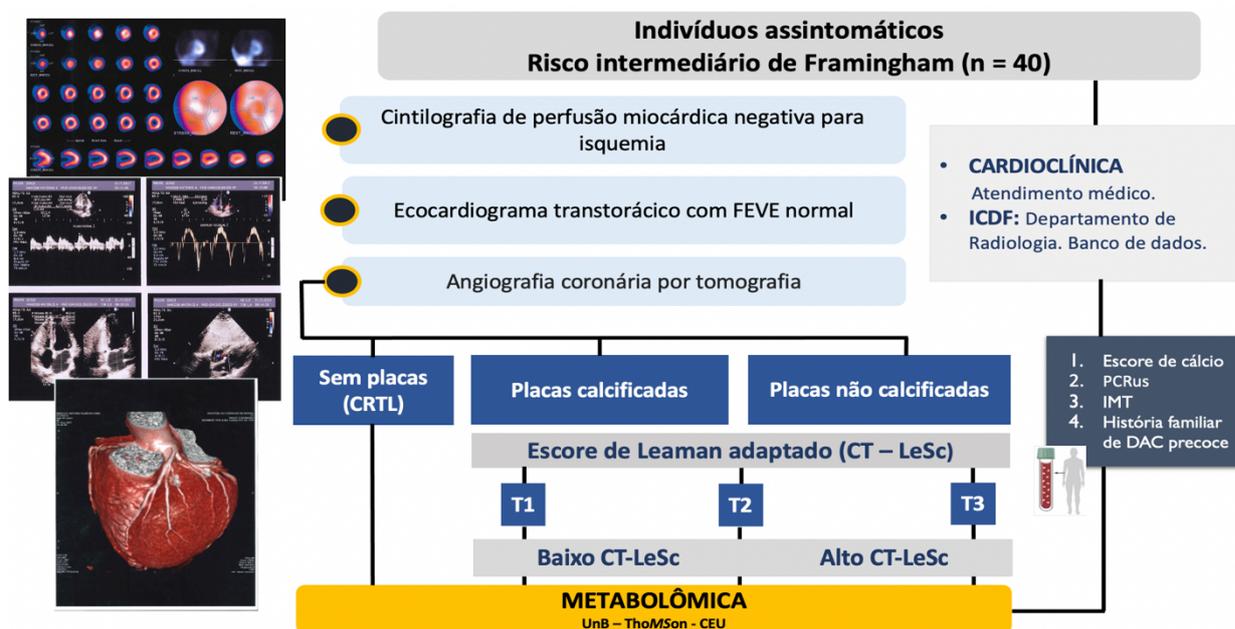


Figura 22. Seleção dos pacientes e métodos do estudo. Workflow do presente estudo. Em geral, 40 pacientes assintomáticos com risco cardiovascular intermediário pelos critérios de Framingham (12 pacientes do grupo controle, 12 pacientes com CT-LeSc baixo e 16 pacientes com CT-LeSc alto) foram incluídos neste estudo. Um estudo metabólico não direcionado foi aplicado às amostras de plasma desses indivíduos. Analisamos comparativamente o perfil metabólico plasmático dos 3 grupos para esclarecer as diferenças em pacientes com DAC subclínica do ponto de vista da metabolômica circulatória. FEVE: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; CRTL: Controle; CT-LeSc: Escore de Leaman adaptado por tomografia; ICDF: Instituto de Cardiologia do Distrito Federal; PCRus: Proteína C Reativa ultrasensível; IMT: Espessura média intimal, do inglês Intimal Media Thickness.

12.1 Critérios de inclusão

Para inclusão neste estudo, os indivíduos atenderam aos seguintes critérios: idade acima de 18 anos; ambos os sexos; ausência de sintomas de insuficiência coronariana; risco intermediário para eventos cardiovasculares pelo critério de Framingham; ausência de isquemia miocárdica em teste não invasivo de isquemia (teste ergométrico ou cintilografia de perfusão miocárdica); função ventricular esquerda normal sem alteração da contratilidade segmentar ao ecocardiograma; realização de angiotomografia de artérias coronárias dentro de um intervalo de 3 meses (anterior ou posterior) da coleta do plasma.

12.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão incluíram: antecedente documentado de evento cardiovascular, como infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral; fibrilação atrial permanente; disfunção ventricular esquerda com fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) < 50%; disfunção valvar de grau moderado e importante; contraindicação à CCTA, incluindo reação alérgica prévia ao contraste iodado e insuficiência renal crônica importante (taxa de filtração glomerular estimada < 30mL/min/1.73m²), gestantes, idosos extremos (> 80 anos), uso crônico de corticóide, doença psiquiátrica grave, dependência química, e má aderência às recomendações da equipe.

12.3 Riscos

Os exames de imagens cardíacas (ecocardiograma transtorácico com Doppler colorido e ultrassonografia de artérias carótidas e vertebrais) são exames não invasivos e seguros, sem necessidade de preparo especial, isento do uso de radiação ou contraste. Pode haver um pequeno desconforto torácico ao se pressionar o transdutor no tórax do paciente para a aquisição das imagens. Com relação à amostra de plasma para análise do perfil global dos lipídeos não se agregam riscos adicionais aos pacientes, uma vez que já se submeteriam à coleta de sangue de rotina solicitados pelos seus médicos assistentes.

12.4 Benefícios

No contexto de uma doença tão grave e prevalente como é a doença aterosclerótica coronariana (maior índice de óbito mundial e, não diferente, também no Distrito Federal), em que a triagem atual é limitada pelo poder preditivo dos testes disponíveis, pelo alto custo desses testes ou por uma combinação de ambos, este projeto busca encontrar potenciais biomarcadores que proporcionem informações diagnósticas e prognósticas aditivas aos fatores de risco tradicionais, com

o intuito de servir como ferramenta complementar na estratificação do risco de eventos cardiovasculares, possibilitando um tratamento mais personalizado e eficaz para atingir a meta terapêutica e reduzir desfechos clínicos adversos (isquemia miocárdica, infarto agudo do miocárdico, internação ou morte por doença cardiovascular).

12.5 Dados clínico-epidemiológicos

Um total de 40 pacientes assintomáticos classificados como risco intermediário por FRS (16 Alto CT-LeSc, 12 Baixo CT-LeSc e 12 controles) confirmados por CCTA serviram como a população do estudo. A Tabela 2 fornece as características dos participantes por grupos de estudo. Em comparação com a população controle e Baixo CT-LeSc, a subpopulação Alto CT-LeSc era discretamente mais velha ($51,7 \pm 8,2$ vs $57,0 \pm 8,79$ vs $59,4 \pm 10,3$, $p = 0,046$). Com exceção da idade e do IMC, os três grupos não foram diferenciáveis por quaisquer outras características demográficas importantes, como sexo, nível de pressão arterial, tabagismo, história familiar de DAC, achados laboratoriais (PCR-us, nível de colesterol), ultrassonografia carotídea ou ecocardiografia e medicamentos de uso regular. Portanto, os achados não podem ser atribuídos a fatores demográficos. A tabela com as características dos participantes classificados pelos tercis de Leaman encontra-se no material suplementar (Tabela Supl.1).

Tabela 2. Características clínicas dos participantes (Controle, CT-LeSc alto e CT-LeSc baixo)

Características	Controle n = 12	CT-LeSc Baixo n = 12	CT-LeSc Alto n = 16	P Value
Sexo, n (%) Masculino Feminino	5 (41.7) 7 (58.3)	5 (41.67) 7 (58.33)	9 (56.25) 7 (43.75)	0.664
Idade, anos	51.7 ± 8.2	57 ± 8.79	59.4 ± 10.3	0.046
Tabagismo, n (%)	4 (33.3)	1 (8.33)	3 (18.75)	0.306
História familiar de DAC, n (%)	4 (33.3)	6 (50)	9 (56.25)	0.475
Exame físico IMC, kg/m ² Pressão arterial sistólica, mmHg Pressão arterial diastólica, mmHg Frequência cardíaca em repouso, bpm	29 ± 5 132 ± 14 83 ± 15 70 ± 8	23.5 ± 6.1 131 ± 16.1 80 ± 13.3 67.4 ± 10.7	28.8 ± 4.2 133 ± 8.45 84 ± 6.94 69.8 ± 7.51	0.022 0.559 0.534 0.311
Achados laboratoriais, mg/dl PCR-us Colesterol total Colesterol LDL Colesterol HDL-C Triglicerídeos Creatinina	1.3 ± 1.4 216 ± 46 121 ± 33 44 ± 10 176 ± 106 0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.94 205 ± 50 114 ± 34.8 44.6 ± 10.6 212 ± 98.3 0.77 ± 0.13	1.7 ± 2 221 ± 52.6 134 ± 47 42.6 ± 6.65 185 ± 62.9 0.82 ± 0.18	0.594 0.679 0.568 0.909 0.499 0.946
Achados ecocardiográficos FEVE, % DDVE, mm Disfunção ventricular direita, n (%)	68 ± 3 48 ± 4 0 (0.0)	67 ± 3.3 46.1 ± 3.6 0 (0.0)	67 ± 3.7 48.1 ± 3.6 0 (0.0)	0.717 0.514
Achados no US de carótidas EMI direita, mm EMI esquerda, mm Placa na carótida, n (%)	0.8 ± 0.2 0.8 ± 0.1 5 (41.7)	0.79 ± 0.14 0.87 ± 0.16 13 (81.2)	0.85 ± 0.19 0.87 ± 0.18 6 (50)	0.549 0.649 0.075
Achados na Angiotomografia Coronária Escore de cálcio, Agatston Escore de CT-LeSc, mediana (SD)	4 ± 14 N/A	21.7 ± 38.8 2.99 ± 1.48	228 ± 318 9.88 ± 4.66	0.001 0.001
Drogas, n (%) Agentes antiplaquetários (s) Inibidores da ECA/BRA Betabloqueadores Antilipemiantes	3 (25.0) 7 (58.3) 1 (8.3) 4 (33.3)	5 (41.67) 6 (50) 2 (16.7) 8 (66.7)	8 (50) 10 (62.5) 1 (6.25) 12 (75)	0.405 0.801 0.644 0.071
Escore de risco de Framingham (Risco em 10 anos), %	12 ± 2	12 ± 1.3	13 ± 2.7	0.154

DAC: doença arterial coronariana; IMC: índice de massa corporal; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; LDL-C: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; US: Ultrassom. EMI: espessura média-intimal; CT-LeSc: escore de Leaman adaptado; ECA: enzima conversora de angiotensina; BRA: bloqueador do receptor de angiotensina.

13. Material suplementar

Tabela Supl. 1. Características clínicas dos participantes (Controle, T1, T2 e T3)

Características	Controle n = 12	T1 n = 9	T2 n = 10	T3 n = 9	P Value
Sexo, n (%)					
Masculino	5 (41.7)	3 (33.3)	6 (60.0)	4 (44.4)	0.626
Feminino	7 (58.3)	6 (66.7)	4 (40.0)	5 (55.6)	
Idade, anos	51.7 ± 7.8	58.6 ± 9.1	55.4 ± 10.6	61.6 ± 6.8	0.052
Tabagismo atual, n (%)	4 (33.3)	1 (11.1)	1 (10.0)	2 (22.2)	0.488
História familiar de DAC, n (%)	4 (33.3)	4 (44.4)	5 (50.0)	6 (66.7)	0.503
Exame físico					
IMC, kg/m ²	29.0 ± 4.8	25.2 ± 2.0	28.7 ± 4.3	27.7 ± 3.5	0.220
Pressão arterial sistólica, mmHg	132 ± 14	136 ± 16	130 ± 9	133 ± 10	0.807
Pressão arterial diastólica, mmHg	83 ± 15	83 ± 13	82 ± 9	85 ± 7	0.963
Frequência cardíaca em repouso, bpm	70 ± 8	65 ± 8	73 ± 10	68 ± 7	0.267
Achados laboratoriais, mg/dl					
PCR-us	1.3 ± 1.4	1.5 ± 0.8	1.5 ± 1.3	1.8 ± 2.2	0.780
Colesterol total	216 ± 46	208 ± 52	216 ± 47	219 ± 51	0.975
LDL-C	121 ± 33	113 ± 36	134 ± 43	128 ± 43	0.701
HDL-C	44 ± 10	41 ± 3	47 ± 11	43 ± 6	0.452
Triglicerídeos	176 ± 106	245 ± 80	150 ± 62	199 ± 59	0.079
Creatinina	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.119
Achados ecocardiográficos					
FEVE, %	68 ± 3	66 ± 3	69 ± 2	65 ± 3	0.024
DDVE, mm	48 ± 4	45 ± 4	48 ± 3	49 ± 3	0.260
Disfunção do ventrículo direito, n (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1
Achados no US de carótidas					
EMI direita, mm	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.826
EMI esquerda, mm	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.857
Placa carotídea, n (%)	5 (41.7)	5 (55.6)	6 (60.0)	8 (88.9)	0.181
Achados na AngioTomografia Coronária					
Escore CAC, Agatston	4 ± 14	9 ± 10	62 ± 60	356 ± 357	<0.001
Escore CT-LeSc, mediana (SD)	N/A	2.4 ± 1.1	5.6 ± 0.9	12.9 ± 4.1	<0.001
Drogas, n (%)					
Agente antiplaquetário	3 (25.0)	4 (44.4)	3 (30.0)	5 (55.6)	0.480
Inibidores da ECA/BRA	7 (58.3)	6 (66.7)	3 (30.0)	6 (66.7)	0.312
Betabloqueador	1 (8.3)	2 (22.2)	4 (40.0)	3 (33.3)	0.341
Hipolipemiante	4 (33.3)	7 (77.8)	5 (50.0)	7 (77.8)	0.106
Escore de Framingham (risco em 10 anos), %	12 ± 2	12 ± 1	12 ± 2	13 ± 2	0.309

DAC: doença arterial coronariana; IMC: índice de massa corporal; PCRus: proteína C reativa ultrasensível; LDL-C: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; US: Ultrassom. EMI: espessura média-intimal; T1: Tercil 1 do escore de Leaman adaptado; T2: Tercil 2 do escore de Leaman adaptado; T3: Tercil 3 do escore de Leaman adaptado. ECA: enzima conversora de angiotensina; BRA: bloqueador do receptor de angiotensina.

14. Referências

ACHENBACH, S.; RAGGI, P. Imaging of coronary atherosclerosis by computed tomography. **European Heart Journal**, v. 31, n. 12, p. 1442–1448, 2010.

AHMADI, A. et al. From Subclinical Atherosclerosis to Plaque Progression and Acute Coronary Events: JACC State-of-the-Art Review. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 12, p. 1608–1617, 2019.

AL-MALLAH, M. H. et al. Does coronary CT angiography improve risk stratification over coronary calcium scoring in symptomatic patients with suspected coronary artery disease? Results from the prospective multicenter international CONFIRM registry. **European Heart Journal Cardiovascular Imaging**, v. 15, n. 3, p. 267–274, 2014.

ALSHEHRY, Z. H. et al. Plasma Lipidomic Profiles Improve on Traditional Risk Factors for the Prediction of Cardiovascular Events in Type 2 Diabetes Mellitus. **Circulation**, v. 134, n. 21, p. 1637–1650, 2016.

AMBROSE, J. A. et al. Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 12, n. 1, p. 56–62, 1988.

ANDERSSON, C. et al. 70-year legacy of the Framingham Heart Study. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 11, p. 687–698, 2019.

ANDREINI, D. et al. A long-term prognostic value of coronary CT angiography in suspected coronary artery disease. **JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 5, n. 7, p. 690–701, 2012.

ARBAB-ZADEH, A.; FUSTER, V. From Detecting the Vulnerable Plaque to Managing the Vulnerable Patient: JACC State-of-the-Art Review. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 12, p. 1582–1593, 2019.

ARNETT, D. K. et al. **2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines**. [s.l: s.n.]. v. 140

BÄCK, M. et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 7, p. 389–406, 2019.

BAGHEL, U. S. et al. Application of Mass Spectroscopy in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **Spectroscopic Analyses - Developments and Applications**, 2017.

BITTENCOURT, M. S. et al. Prognostic value of nonobstructive and obstructive coronary artery disease detected by coronary computed tomography angiography to identify cardiovascular events. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 7, n. 2, p. 282–291, 2014.

BLAHA, M. J. et al. Coronary Artery Calcium Scoring: Is It Time for a Change in Methodology? **JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 10, n. 8, p. 923–937, 2017.

BLAHA, M. J.; SILVERMAN, M. G.; BUDOFF, M. J. Is There a Role for Coronary Artery Calcium Scoring for Management of Asymptomatic Patients at Risk for Coronary Artery Disease? Clinical Risk Scores Are Not Sufficient to Define Primary Prevention Treatment Strategies Among Asymptomatic Patients. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 7, n. 2, p. 398–408, 2014.

BOTS, M. L. et al. Carotid Intima-media Thickness Measurements: Relations with Atherosclerosis, Risk of Cardiovascular Disease and Application in Randomized Controlled Trials. **Chinese medical journal**, v. 129, n. 2, p. 215–226, 2016.

BROWN, A. J. et al. Plaque Structural Stress Estimations Improve Prediction of Future Major Adverse Cardiovascular Events after Intracoronary Imaging. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 9, n. 6, 2016.

BURKE, A. P. et al. Healed Plaque Ruptures and Sudden Coronary Death. **Circulation**, v. 103, n. 7, p. 934–940, 2001.

CALLIGARIS, D. et al. MALDI mass spectrometry imaging analysis of pituitary adenomas for near-real-time tumor delineation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 32, p. 9978–9983, 2015.

CANUTO, G. et al. Metabolômica: Definições, Estado-da-arte e Aplicações Representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CESAR, L. A. et al. Guideline for stable coronary artery disease | Diretriz de Doença Coronária Estável. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 103, n. 2, 2014.

CHAMBLESS, L. E. et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, 1987-1993. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 6, p. 483–494, 1997.

CHERUVU, P. K. et al. Frequency and Distribution of Thin-Cap Fibroatheroma and Ruptured Plaques in Human Coronary Arteries. A Pathologic Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 10, p. 940–949, 2007.

COSTOPOULOS, C. et al. Impact of combined plaque structural stress and wall shear stress on coronary plaque progression, regression, and changes in composition. **European Heart Journal**, v. 40, n. 18, p. 1411–1422, 2019.

CREA, F.; LIUZZO, G. Pathogenesis of acute coronary syndromes. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 61, n. 1, p. 1–11, 2013.

CROUSE, J. R. Effect of Rosuvastatin on Progression of Carotid Intima-Media Thickness in Low-Risk Individuals with Subclinical Atherosclerosis. **JAMA**, v. 297, n. 12, p. 1344–1353, 2007.

DE ARAÚJO GONÇALVES, P. et al. Coronary computed tomography angiography-Adapted Leaman score as a tool to noninvasively quantify total coronary atherosclerotic burden. **International Journal of Cardiovascular Imaging**, v. 29, n. 7, p. 1575–1584, 2013.

DEN RUIJTER, H. M.; PETERS, S. A.; ANDERSON, T. J. Common Carotid Intima-Media Thickness Measurements in Cardiovascular Risk Prediction: A Meta-Analysis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 56, n. 6, p. 1810, 2012.

DETRANO, R. et al. Coronary Calcium as a Predictor of Coronary Events in Four Racial or Ethnic Groups. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 13, p. 1336–1345, 2008.

EKROOS, K. et al. Lipidomics: A tool for studies of atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 12, n. 4, p. 273–281, 2010.

ELLIMS, A. H. et al. Plasma lipidomic analysis predicts non-calcified coronary artery plaque in asymptomatic patients at intermediate risk of coronary artery disease. **European Heart Journal Cardiovascular Imaging**, v. 15, n. 8, p. 908–916, 2014.

F. SANTOS, E. et al. Multi-omics: An Opportunity to Dive into Systems Biology. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, n. February, 2020.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 839–861, 2005.

FAHY, E. et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. SUPPL., p. 9–14, 2009.

FERES, F.; COSTA RA, SIQUEIRA D, COSTA JR, CHAMIÉ D, S. R. ET. A. Diretriz Sobre Intervenção Coronária Percutânea. **Arq Bras Cardiol**, v. 109, p. 1–81, 2017.

FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and Functional Genomics**, p. 155–168, 2001.

FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1–2, p. 155–171, 2002.

FINN, A. V. et al. Concept of vulnerable/unstable plaque. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 7, p. 1282–1292, 2010.

FLOEGEL, A. et al. Serum metabolites and risk of myocardial infarction and ischemic stroke: a targeted metabolomic approach in two German prospective cohorts. **European Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 1, p. 55–66, 2018.

FOLSOM, A. R. et al. An assessment of incremental coronary risk prediction using C-reactive protein and other novel risk markers: The atherosclerosis risk in communities study. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 13, p. 1368–1373, 2006.

FORD, E. S. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000: Commentary. **New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 2388–98, 2007.

GANNA, A. et al. Large-scale Metabolomic Profiling Identifies Novel Biomarkers for Incident Coronary Heart Disease. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 12, 2014.

GELUK, C. A. et al. C-reactive protein and angiographic characteristics of stable and unstable coronary artery disease: Data from the prospective PREVEND cohort. **Atherosclerosis**, v. 196, n. 1, p. 372–382, 2008.

GEPNER, A. D. et al. Comparison of coronary artery calcium presence, carotid plaque presence, and carotid intima-media thickness for cardiovascular disease prediction in the multi-ethnic study of atherosclerosis. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 8, n. 1, 2014.

GOTTLIEB, I. et al. The Absence of Coronary Calcification Does Not Exclude Obstructive Coronary Artery Disease or the Need for Revascularization in Patients Referred for Conventional Coronary Angiography. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 55, n. 7, p. 627–634, 2010.

GREENLAND, P.; SMITH, S. C.; GRUNDY, S. M. Improving coronary heart disease risk assessment in asymptomatic people: Role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests. **Circulation**, v. 104, n. 15, p. 1863–1867, 2001.

GUPTA, A. et al. The Identification of Calcified Coronary Plaque Is Associated with Initiation and Continuation of Pharmacological and Lifestyle Preventive Therapies: A Systematic Review and Meta-Analysis. **JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 10, n. 8, p. 833–842, 2017.

HANSSON, G. K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p. 1685–1695, 2005.

HAUSLEITER, J. et al. Prevalence of Noncalcified Coronary Plaques by 64-Slice Computed Tomography in Patients with an Intermediate Risk for Significant Coronary Artery Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 48, n. 2, p. 312–318, 2006.

HEANEY, L. M.; JONES, D. J.; SUZUKI, T. Mass spectrometry in medicine: A technology for the future? **Future Science OA**, v. 3, n. 3, 2017.

HU, T.; ZHANG, J. L. Mass-spectrometry-based lipidomics. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 1, p. 351–372, 2018.

JACOB, S. S.; HASSAN, M.; YACOUB, M. H. Utility of mass spectrometry for the diagnosis of the unstable coronary plaque. **Global Cardiology Science and Practice**, v. 2015, n. 2, p. 25, 2015.

JANNETTO, P. J.; FITZGERALD, R. L. Effective use of mass spectrometry in the clinical laboratory. **Clinical Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 92–98, 2016.

JOMINI, V. et al. Contribution of major cardiovascular risk factors to familial premature coronary artery disease the GENECARD project. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 4, p. 676–684, 2002.

KADDURAH-DAOUK, R.; WEINSHILBOUM, R. Metabolomic signatures for drug response phenotypes: Pharmacometabolomics enables precision medicine. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 98, n. 1, p. 71–75, 2015.

KELL, D. B.; OLIVER, S. G. The metabolome 18 years on: a concept comes of age. **Metabolomics**, v. 12, n. 10, p. 1–8, 2016.

KHAMBHATI, J. et al. The art of cardiovascular risk assessment. **Clinical Cardiology**, v. 41, n. 5, p. 677–684, 2018.

KHOT, U. N. et al. Prevalence of Conventional Risk Factors in Patients with Coronary Heart Disease. **Journal of the American Medical Association**, v. 290, n. 7, p. 898–904, 2003.

KIANOUSH, S. et al. An Update on the Utility of Coronary Artery Calcium Scoring for Coronary Heart Disease and Cardiovascular Disease Risk Prediction. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 18, n. 3, p. 1–11, 2016.

KÖFELER, H. C. et al. Mass spectrometry based lipidomics: An overview of technological platforms. **Metabolites**, v. 2, n. 1, p. 19–38, 2012.

- KRAMER, M. C. A. et al. Relationship of Thrombus Healing to Underlying Plaque Morphology in Sudden Coronary Death. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 55, n. 2, p. 122–132, 2010.
- KRISHNAN, S. et al. Molecular imaging of vulnerable coronary plaque: A pathophysiologic perspective. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 58, n. 3, p. 359–364, 2017.
- KRÖNER, E. S. J. et al. Positive remodeling on coronary computed tomography as a marker for plaque vulnerability on virtual histology intravascular ultrasound. **American Journal of Cardiology**, v. 107, n. 12, p. 1725–1729, 2011.
- KRUK, M. Imaging quest for vulnerable plaque: is coronary computed tomography angiography running out of steam? **European Heart Journal - Cardiovascular Imaging**, p. 1–3, 2020.
- KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics resolving. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2437–2468, 2013.
- LAUER, M. S. Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. v. 297, p. 1376–78, 2007.
- LEAMAN, D. M. et al. Coronary artery atherosclerosis: Severity of the disease, severity of angina pectoris and compromised left ventricular function. **Circulation**, v. 63, n. 2, p. 285–292, 1981.
- LEMONS DA LUZ, P. Medicina Translacional - Nova Fronteira. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 14–19, 2018.
- LIBBY, P. et al. Atherosclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1–18, 2019a.
- LIBBY, P. et al. Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 114, n. 12, p. 1141–1148, 2014.
- LIBBY, P. et al. Reassessing the Mechanisms of Acute Coronary Syndromes: The “vulnerable Plaque” and Superficial Erosion. **Circulation Research**, v. 124, n. 1, p. 150–160, 2019.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868–874, 2002.
- LIBBY, P. Superficial erosion and the precision management of acute coronary syndromes: Not one-size-fits-all. **European Heart Journal**, v. 38, n. 11, p. 801–803, 2017.
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Inflammation in Atherosclerosis: From Pathophysiology to Practice. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 23, p. 2129–2138, 2009.
- LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317–325, 2011.
- LLOYD-JONES, D. M. Cardiovascular risk prediction: Basic concepts, current status, and future directions. **Circulation**, v. 121, n. 15, p. 1768–1777, 2010.
- LLOYD-JONES, D. M. et al. Use of Risk Assessment Tools to Guide Decision-Making in the Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Special Report From the American Heart Association and American College of Cardiology. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 73, n. 24, p. 3153–3167, 2019.

LYDIC, T. A.; GOO, Y.-H. Lipidomics unveils the complexity of the lipidome in metabolic diseases. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 4, 2018.

MAHMOOD, S. S. et al. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: A historical perspective. **The Lancet**, v. 383, n. 9921, p. 999–1008, 2014.

MARWAN, M. et al. In vivo CT detection of lipid-rich coronary artery atherosclerotic plaques using quantitative histogram analysis: A head to head comparison with IVUS. **Atherosclerosis**, v. 215, n. 1, p. 110–115, 2011.

MAUROVICH-HORVAT, P. et al. The napkin-ring sign indicates advanced atherosclerotic lesions in coronary CT angiography. **JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 5, n. 12, p. 1243–1252, 2012.

MCGRANAGHAN, P. et al. Predictive value of metabolomic biomarkers for cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. **Biomarkers**, v. 25, n. 2, p. 101–111, 2020.

MEIKLE, P. J. et al. Plasma lipidomic analysis of stable and unstable coronary artery disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 11, p. 2723–2732, 2011.

MIHAILIDOU, A.; RITCHIE, R.; W., A. Sex Differences in Sudden Cardiac Death. **Ischemic Heart Disease**, 2013.

MILLER, W. L. et al. Comparison of mass spectrometry and clinical assay measurements of circulating fragments of B-Type natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. **Circulation: Heart Failure**, v. 4, n. 3, p. 355–360, 2011.

MONTALESCOT, G. et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. **European Heart Journal**, v. 34, n. 38, p. 2949–3003, 2013.

MORAN, A. E. et al. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: The global burden of disease 2010 study. **Circulation**, v. 129, n. 14, p. 1483–1492, 2014.

MORENO, P. R. **Placa vulnerável: definição, diagnóstico e tratamento.** [s.l: s.n.].

MORTENSEN, M. B. et al. A Simple Disease-Guided Approach to Personalize ACC/AHA-Recommended Statin Allocation in Elderly People: The BioImage Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 68, n. 9, p. 881–891, 2016.

MOTOYAMA, S. et al. Computed Tomographic Angiography Characteristics of Atherosclerotic Plaques Subsequently Resulting in Acute Coronary Syndrome. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 1, p. 49–57, 2009.

MOZAFFARIAN, D. et al. **Heart disease and stroke statistics - 2016 update a report from the American Heart Association.** [s.l: s.n.]. v. 133

MUSHTAQ, S. et al. Long-term prognostic effect of coronary atherosclerotic burden validation of the computed tomography-Leaman score. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 8, n. 2, 2015.

NAGHAVI, M. et al. From Vulnerable Plaque to Vulnerable Patient: A Call for New Definitions and Risk Assessment Strategies: Part II. **Circulation**, v. 108, n. 15, p. 1772–1778, 2003.

NAIR, D. et al. Association of Coronary Atherosclerosis Detected by Multislice Computed Tomography and Traditional Risk-Factor Assessment. **American Journal of Cardiology**, v. 102, n. 3, p. 316–320, 2008.

NEWBY, D. E. Computed tomography or functional stress testing for the prediction of risk: Can I have my cake and eat it? **Circulation**, v. 136, n. 21, p. 2006–2008, 2017.

NIEDERKOFER, E. E. et al. Detection of endogenous B-type natriuretic peptide at very low concentrations in patients with heart failure. **Circulation. Heart failure**, v. 1, n. 4, p. 258–264, 2008.

NOGUCHI, T. et al. Noninvasive coronary plaque imaging. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 25, n. 4, p. 281–293, 2018.

NORDESTGAARD, B. G.; VARBO, A. Triglycerides and cardiovascular disease. **The Lancet**, v. 384, n. 9943, p. 626–635, 2014.

OLIVER, S. G. et al. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 373–378, 1998.

ORTIZ, A.; SANCHEZ-NINÓ, M. D. The human plasma lipidome. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 7, p. 668–669, 2012.

OTSUKA, K. et al. Napkin-ring sign on coronary CT angiography for the prediction of acute coronary syndrome. **JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 6, n. 4, p. 448–457, 2013.

PARTIDA, R. A. et al. Plaque erosion: A new in vivo diagnosis and a potential major shift in the management of patients with acute coronary syndromes. **European Heart Journal**, v. 39, n. 22, p. 2070–2076, 2018.

PASTERNAK, R. C. et al. 34th Bethesda Conference: Task force #1--Identification of coronary heart disease risk: is there a detection gap? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, n. 11, p. 1863–1874, 2003.

PAYNTER, N. P. et al. Metabolic predictors of incident coronary heart disease in women. **Circulation**, v. 137, n. 8, p. 841–853, 2018.

PERSSON, M. et al. Novel and Conventional Biomarkers. v. 302, n. 1, p. 49–57, 2009.

PIEPOLI, M. F. et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. **European Heart Journal**, v. 37, n. 29, p. 2315–2381, 2016.

RAFF, G. L. et al. SCCT guidelines for the interpretation and reporting of coronary computed tomographic angiography. **Journal of Cardiovascular Computed Tomography**, v. 3, n. 2, p. 122–136, 2009.

RAO YETUKURI, L. **Bioinformatics approaches for the analysis of lipidomics data**. [s.l: s.n.].

RIDKER, P. M. et al. Comparison of C-Reactive Protein and Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in the Prediction of First Cardiovascular Events. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 58, n. 4, p. 261–262, 2003.

- RIGLA, J. et al. Atherosclerotic Plaque Progression and OCT/IVUS Assessment J. Rigla, in *Computing and Visualization for Intravascular Imaging and Computer-Assisted Stenting*, 2017.
- RIZZA, S. et al. Metabolomics signature improves the prediction of cardiovascular events in elderly subjects. **Atherosclerosis**, v. 232, n. 2, p. 260–264, 2014.
- RODRIGUEZ-GRANILLO, G. A. et al. Defining the non-vulnerable and vulnerable patients with computed tomography coronary angiography: Evaluation of atherosclerotic plaque burden and composition. **European Heart Journal Cardiovascular Imaging**, v. 17, n. 5, p. 481–491, 2016.
- ROSS, R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 27–31, 1999.
- ROTH, G. A. et al. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 14, p. 1333–1341, 2015a.
- ROTH, G. A. et al. Estimates of global and regional premature cardiovascular mortality in 2025. **Circulation**, v. 132, n. 13, p. 1270–1271, 2015b.
- RUIZ-CANELA, M. et al. Comprehensive metabolomic profiling and incident cardiovascular disease: A systematic review. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 10, p. 1–23, 2017.
- SABIDÓ, E. et al. Targeted proteomics of the eicosanoid biosynthetic pathway completes an integrated genomics-proteomics-metabolomics picture of cellular metabolism. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 11, n. 7, p. 1–9, 2012.
- SACHDEVA, A. et al. Lipid levels in patients hospitalized with coronary artery disease: An analysis of 136,905 hospitalizations in Get with The Guidelines. **American Heart Journal**, v. 157, n. 1, 2009.
- SANDFORT, V.; LIMA, J. A. C.; BLUEMKE, D. A. Noninvasive imaging of atherosclerotic plaque progression: Status of coronary computed tomography angiography. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 8, n. 7, p. 1–14, 2015.
- SCHMERMUND, A. et al. Natural history and topographic pattern of progression coronary calcification in symptomatic patients an electron-beam CT study. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 3, p. 421–426, 2001.
- SHAH, P. K. Screening Asymptomatic Subjects for Subclinical Atherosclerosis. Can We, Does It Matter, and Should We? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, n. 2, p. 98–105, 2010.
- SHAH, S. H. et al. Baseline metabolomic profiles predict cardiovascular events in patients at risk for coronary artery disease. **American Heart Journal**, v. 163, n. 5, p. 844- 850.e1, 2012.
- SHAW, J. A.; WARREN, J. Acute coronary syndromes: a success story but still a long way to go. **Heart**, v. 0, n. 0, p. 1–2, 2019.
- SILLESEN, H. Carotid intima-media thickness and/or carotid plaque: What is relevant? **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 48, n. 2, p. 115–117, 2014.
- STONE, G. W. et al. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 3, p. 226–235, 2011.

SUZUKI, T. et al. Prognostic role of molecular forms of B-type natriuretic peptide in acute heart failure. **Clinical Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 880–886, 2017.

TAJIK, P. et al. Asymmetrical distribution of atherosclerosis in the carotid artery: Identical patterns across age, race, and gender. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 19, n. 4, p. 687–697, 2012.

TANG, W. H. W. et al. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: Refining the gut hypothesis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 18, p. 1908–1914, 2014.

TARKIN, J. M. et al. Imaging Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, p. 750–769, 2016.

TAYLOR, A. J. et al. ACCF/SCCT/ACR/AHA/ASE/ASNC/NASCI/SCAI/SCMR 2010 appropriate use criteria for cardiac computed tomography. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, n. 22, p. 1864–1894, 2010.

TEPPER, S. J. Computed tomography - An increasing source of radiation exposure: Commentary. **Headache**, v. 48, n. 4, p. 657, 2008.

THELIN, J.; MELANDER, O.; ÖHLIN, B. Early rule-out of acute coronary syndrome using undetectable levels of high sensitivity troponin T. **European heart journal. Acute cardiovascular care**, v. 4, n. 5, p. 403–409, 2015.

U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE. Using nontraditional risk factors in coronary heart disease risk assessment. **Annals of internal medicine**, v. 151, n. 7, p. 511–61, 2009.

VAN ROSENDAEL, A. R. et al. Association of High-Density Calcified 1K Plaque with Risk of Acute Coronary Syndrome. **JAMA Cardiology**, v. 5, n. 3, p. 282–290, 2020.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227–36, 2001.

VERGALLO, R.; CREA, F. Atherosclerotic Plaque Healing. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 9, p. 846–857, 2020.

VIRMANI, R. et al. Pathology of the Vulnerable Plaque. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 8 SUPPL., p. 0–5, 2006.

VOLPE, M.; RUBATTU, S.; BURNETT, J. Natriuretic peptides in cardiovascular diseases: Current use and perspectives. **European Heart Journal**, v. 35, n. 7, p. 419–425, 2014.

WALLACE, M. L.; RICCO, J. A.; BARRETT, B. Screening strategies for cardiovascular disease in asymptomatic adults. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 41, n. 2, p. 371–397, 2014.

WANG, T. J. Assessing the role of circulating, genetic, and imaging biomarkers in cardiovascular risk prediction. **Circulation**, v. 123, n. 5, p. 551–565, 2011.

WILKINS. European Heart Statistics. **European Heart Network**, p. 8–15; 94, 118, 127, 149, 162, 174, 2017.

XIE, J. X. et al. The Coronary Artery Disease–Reporting and Data System (CAD-RADS): Prognostic and Clinical Implications Associated With Standardized Coronary Computed Tomography Angiography Reporting. **JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 11, n. 1, p. 78–89, 2018.

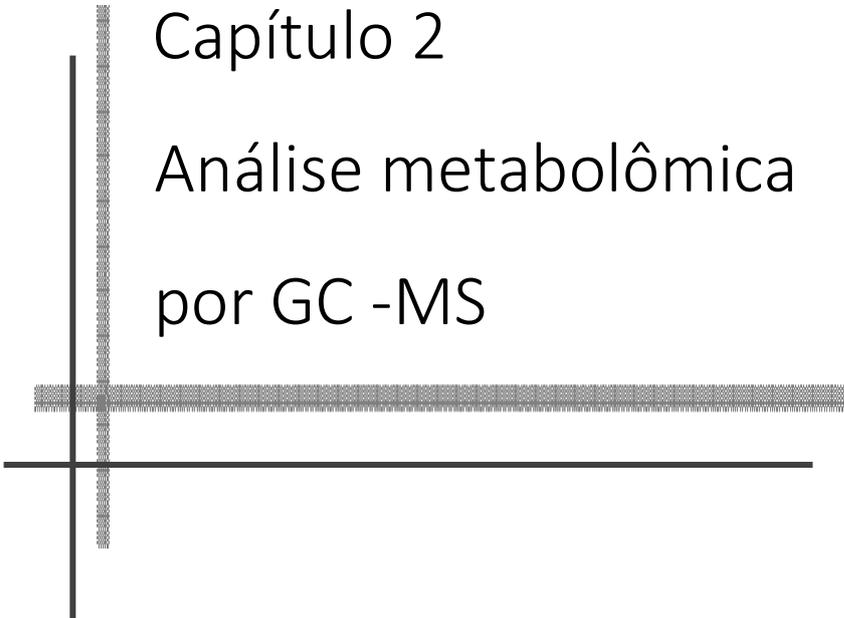
YANG, K.; HAN, X. Accurate quantification of lipid species by electrospray ionization mass spectrometry - Meets a key challenge in lipidomics. **Metabolites**, v. 1, n. 1, p. 21–40, 2011.

YEBOAH, J. et al. Comparison of novel risk markers for improvement in cardiovascular risk assessment in intermediate-risk individuals. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 308, n. 8, p. 788–795, 2012.

YEBOAH, J. et al. Utility of Nontraditional Risk Markers in Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk Assessment. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 2, p. 139–147, 2016.

YUSUF, S. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **The Lancet**, v. 364, p. 937–952, 2004.

ZHANG, J. et al. Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 406, 2017.



Capítulo 2

Análise metabolômica por GC -MS

“A verdade é uma, os caminhos são vários”

Mahatma Gandhi

1. Uso da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) na prospecção de biomarcadores de aterosclerose coronariana

Paralelamente à genômica, transcriptômica e proteômica, a aplicação de tecnologias metabolômicas no estudo das DCV pode aumentar nossa compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos e isso deve ajudar a identificar potenciais biomarcadores para desenvolver novas estratégias terapêuticas. De fato, a identificação e quantificação de moléculas de baixo peso molecular (por exemplo, ácidos graxos, ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares), como o faz o GC-MS (do inglês, "*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*"), pode elucidar o fenótipo de muitas doenças, incluindo a aterosclerose (WATERMAN; KIAN-KAI; GRIFFIN, 2010).

Do ponto de vista clínico, o estudo das alterações metabólicas que ocorrem em resposta a diferentes processos fisiológicos ajuda a estabelecer os mecanismos subjacentes à doença. GC-MS, apesar de suas limitações, fornece uma resolução extraordinária, permitindo a separação de compostos estruturalmente semelhantes que seriam muito dificilmente separadas por outras técnicas. Vários trabalhos usando GC-MS foram desenvolvidos objetivando estudar a aterosclerose. Estes estudos vão desde aqueles envolvendo pacientes com síndrome coronariana aguda (VALLEJO et al., 2009) a estudos de herdabilidade metabolômica (BERNSTEIN et al., 2004; SHAH et al., 2009) e de estratificação de risco cardiovascular (SUN et al., 2016).

Usando GC-MS, neste trabalho os pacientes assintomáticos classificados como de risco intermediário para DAC pelo escore de Framingham com cintilografia de perfusão miocárdica negativa para isquemia e fração ventricular esquerda normal foram inicialmente recrutados em três grupos conforme resultado da CCTA com base no CT-LeSc: grupo controle, composto por pacientes sem placas (CTRL, n=12), Alto Risco (CT-LeSc > 5, n = 16) ou Baixo Risco (CT-LeSc < ou = 5, n = 12), formando um *n* total de 40 pacientes. Além disso, foi realizada uma análise avaliando os valores de corte por tercís: grupo Tercil 1 (T1, n=9), grupo Tercil 2 (T2, n=10) e grupo Tercil 3 (T3, n=9).

A metodologia para o CT-LeSc foi previamente descrita no capítulo 1 (vide Tabela 1). Resumidamente, são usados 3 conjuntos de fatores de ponderação: (1) localização das placas coronárias; (2) tipo de placa, com um fator de multiplicação de 1 para placas calcificadas e de 1,5 para placas não calcificadas e mistas, e (3) grau de estenose, com um fator de multiplicação de 0,615 para não obstrutivo (<50% de estenose) e um fator de multiplicação de 1 para o obstrutivo (estenose ≥50%) lesões.

2. A técnica GC-MS

A técnica de GC-MS abriu novos caminhos para elucidar a estrutura da matéria. É denominada técnica híbrida, já que cada uma das suas partes realiza um determinado processo analítico: o analisador GC realiza a separação dos componentes de uma mistura gasosa a ser analisada e MS realiza a identificação dos componentes químicos gasosos separados pelo GC (Figura 23).

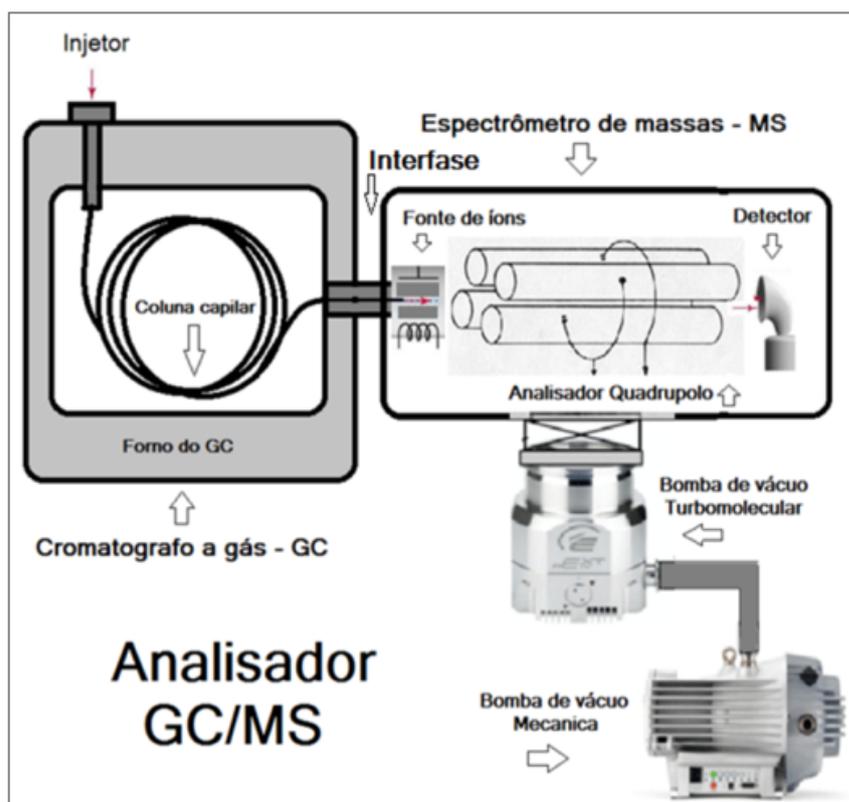


Figura 23. Analisador GC/MS (modificado de REDÍGOLO, 2002).

O GC é composto por injetor da amostra, coluna cromatográfica e forno resistivo programável, enquanto o espectrômetro de massas é formado por fonte de íons, analisador de massas quadrupolar e detector de íons. MS funciona sob alto vácuo obtida por meio de bomba turbomolecular e bomba mecânica de pré-vácuo. Assim, o analisador GC/MS funciona no modo tandem, onde os compostos químicos precursores de uma mistura gasosa são separados pelo GC e logo detectados e quantificados em seus produtos por MS. A separação é baseada na diferença de ponto de ebulição e polaridade das diferentes substâncias químicas e é alcançada executando-se um gradiente de temperatura, eluindo-se os compostos mais voláteis inicialmente.

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade)

(VÉKEY, 2001). Para que o acoplamento seja possível, idealmente, é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perda de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massas. A combinação da GC com MS é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas (KITSON, 1996).

Em razão do acoplamento do GC com MS utilizar uma fonte de ionização por impacto de elétrons com energia constante (geralmente -70 eV), as moléculas são fragmentadas diretamente na fonte, produzindo espectros de massa bastante reproduzíveis. Isso torna a identificação dos compostos facilitada, tornando possível a criação de bibliotecas de espectros. Após a deconvolução dos espectros de MS, realiza-se uma comparação dos padrões de fragmentação das substâncias contidas na biblioteca de espectros, que somada à confirmação pelo tempo de retenção, torna possível a identificação confiável dos metabólitos presentes nas matrizes biológicas (GARCIA, 2001).

A principal desvantagem do uso do GC/MS é ser incapaz de analisar compostos não voláteis, polares ou termicamente lábeis, sendo necessária a derivatização para aumentar a volatilidade e a estabilidade térmica desses compostos. Este processo de derivatização adiciona complexidade e introduz variabilidade da amostra que pode distorcer a análise quantitativa.

3. Análise metabolômica de amostras de plasma por GC-MS

3.1 Preparo da amostra

Inicialmente, as amostras de plasma foram descongeladas em gelo e homogeneizadas com auxílio de um agitador vórtex. Posteriormente, 50 μ L de plasma foi transferido para um eppendorf e 150 μ L de acetonitrila gelada contendo 15 ppm de padrão interno para controle de derivatização (ácido 4-nitrobenzóico) foi adicionada. Após, a mistura foi homogeneizada com auxílio de agitador vórtex por 2 minutos e mantida em repouso sob gelo por 5 minutos para facilitar a precipitação de proteínas. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 15400xg e 4°C. Em seguida, 100 mL do sobrenadante foi transferido para um *vial* equipado com *insert* próprio para análises por GC, e submetidos a evaporação (30°C) até completa secagem em um concentrador (SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher Scientific, USA). Após esse processo, 10 μ L de hidrocloreto de o-metoxiamina (15 ppm) em piridina foram adicionados e a mistura foi homogeneizada vigorosamente com auxílio de agitador vórtex e sonicador. O procedimento de homogeneização foi realizado em triplicata para garantir completa dissolução. As amostras foram então mantidas a temperatura ambiente no escuro por 16h para viabilizar completa metoximação.

No dia seguinte, foi finalizado o processo de derivatização adicionando 10 µL de BSTFA (A N, O-bistrifluoroacetamida) contendo 1% de TMCS (clorotrimetilsilano) em cada *vial*. As amostras foram agitadas por 5 minutos e mantidas em estufa por 1h a 70°C para viabilizar completa siliilação. Após incubação, as amostras foram mantidas em um ambiente escuro durante 1h a temperatura ambiente. 100 µL de heptano contendo 20 ppm de tricosano (padrão interno para controle de injeção) foram então adicionados. As amostras foram submetidas a agitação em vórtex por 2 minutos e centrifugadas por 15 minutos a 2500 rpm a 20°C antes de se proceder à análise. Quatro brancos de preparo de amostras também foram preparados. Para isso, uma mesma quantidade de água Milli-Q® (50 mL) foi transferida para um eppendorf e conduzida aos processos descritos (derivatização) como se fosse uma amostra do estudo. Vale citar que as amostras foram randomicamente preparadas de modo a evitar possíveis *bias*.

3.2 Preparo da amostra de controle de qualidade

As amostras de CQ foram preparadas a partir de uma mistura de 100 µL de cada amostra apresentada no estudo, seguida de homogeneização em agitador vortex. O tratamento das amostras de QC para injeção foi realizado como descrito no item 3.1.

3.3 Instrumentação e análise

As análises foram realizadas num cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 7890A), equipado com um amostrador automático (Agilent 7693) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo tempo-de-voo (Q-TOF, Agilent Technologies 7200). Resumidamente, 1 µL de amostra derivatizada foi injetada em uma coluna DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0.25 µm, filme 95% dimetil / 5% difenilpolisiloxano), acoplada a uma pré-coluna J&W 122-5532G com tamanho de 10 m (Agilent Technologies, USA). A porta de injeção foi mantida a 250°C, e o fluxo de gás de arraste (hélio) foi ajustado a 1,0 mL/min. A injeção foi realizada em modo *split*, na razão 1:10. O gradiente de temperatura foi programado da seguinte forma: a temperatura inicial do forno foi mantida a 60°C por um minuto, aquecida a 325°C a uma taxa de 10°C/min e mantida a 325°C por 10 minutos. A detecção por espectrometria de massas foi realizada utilizando fonte de ionização por elétrons operada a -70 eV. O espectrômetro de massas foi operado no modo *scan*, na faixa de *m/z* 50-500 e aquisição de 5 espectros/segundo. Uma mistura de n-alcenos (C₈-C₂₈) foi analisada no início do experimento para auxiliar na identificação dos compostos. Dados foram adquiridos usando o Agilent Software MSD ChemStation (Agilent Technologies).

3.4 *Worklist* da análise

A *worklist* de análise compreendeu a análise de duas amostras de branco (solvente de extração) para remoção de compostos de análises anteriores que possam estar retidos, seguido de cinco amostras de QC para equilibração do sistema, outra amostra de controle de qualidade (QC de análise) para checar a estabilidade do sistema, seguido por 5 amostras. A cada bloco de 5 amostras, um QC de análise era injetado até que todas as amostras fossem analisadas. Ao final da *worklist*, duas amostras de branco foram novamente analisadas para garantir que não tenha ocorrido acúmulo de analito (*carry-over*) no sistema. Vale citar que as amostras foram incluídas na *worklist* de forma randômica para evitar vieses.

3.5 Tratamento dos dados

Antes da realização do tratamento de dados, os cromatogramas das amostras em estudo, amostras de controle de qualidade (QC) e brancos foram cuidadosamente analisados para verificar a qualidade analítica dos dados adquiridos. O pico dos padrões internos em cada uma dessas amostras também foi avaliado para checar estabilidade analítica e qualidade de derivatização. O tratamento dos dados inicial em GC-MS compreendeu as etapas de deconvolução, alinhamento, identificação putativa e integração dos metabólitos e/ou entidades moleculares.

A deconvolução espectral foi realizada para identificar possíveis compostos coeluídos através do software Unknowns Analysis (Agilent Technologies). Posteriormente, os picos foram alinhados utilizando o software Mass Profile Professional (MPP, versão 14.9). A identificação putativa dos metabólitos foi realizada com o auxílio das bibliotecas Fiehn 2013, NIST17, e uma biblioteca in-house (PCDL). O software MassHunter Qualitative (versão B.10.00, Agilent Technologies) e NIST MS Search (Gaithersburg, MD, EUA) também foram utilizados para auxiliar na identificação putativa dos metabólitos.

Nesse processo, o espectro de fragmentação de cada pico deconvoluído foi comparado com padrão de fragmentação dos compostos presentes nas bibliotecas. Vale citar ainda que o tempo de retenção e *retention index* (RI) foram utilizados como parâmetros para anotação dos compostos. Para isso, um arquivo de calibração com o tempo de retenção e RI dos n-alcenos analisados no início do *workflow* analítico foi construído. Após esse procedimento, as áreas dos compostos foram integradas utilizando o software Mass Hunter Quantitative (versão B.08.00, Agilent Technologies), escolhendo um íon como quantificador e dois íons como qualificadores.

Finalmente, foi realizada a checagem e correção manual das áreas integradas, e uma tabela contendo os analitos identificados e/ou *entidades moleculares* com suas respectivas áreas em cada uma das amostras foi gerada e posteriormente analisada antes de se conduzir a análise estatística.

Nesse procedimento, a área média das amostras de branco de preparo foi subtraída de cada amostra para cada metabólito e/ou entidade molecular. Os dados foram então normalizados pelos padrões internos (ácido 4-nitrobenzóico e tricosano) e os analitos que possuíam variação no QC maior que 30% foram removidos, já que a qualidade dos dados adquiridos para esses analitos não pode ser garantida. Foram geradas nessa etapa três matrizes de dados, uma contendo o dado bruto e duas contendo os dados normalizados pelos padrões internos. Todas as matrizes foram conduzidas a análise multivariada não supervisionada (PCA, análise de componentes principais de modo a selecionar a mais apropriada para análise dos dados. Para encontrar os metabólitos discriminantes entre os grupos, análise multivariada supervisionada (PLS-DA, análise discriminante por mínimos quadrados parciais e sPLS-DA, análise discriminante por mínimos quadrados parciais esparso) foi realizada. Essas análises foram conduzidas na plataforma online Metaboanalyst 4.0. Análises univariadas também foram realizadas de modo a avaliar individualmente os metabólitos discriminantes entre os grupos. Inicialmente, os dados foram testados para normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Dados com distribuição normal (paramétrico) foram então testados para heterocedasticidade (teste F) e uma análise de variância (ANOVA) apropriada foi realizada de modo a avaliar a diferença entre os grupos. Dados não paramétricos foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis (KW). Finalmente, testes *post hoc* foram conduzidos de modo a avaliar todas as diferentes combinações pareadas de grupos estudados e encontrar onde as possíveis diferenças residem. Testes *post hoc* de Tukey e de Dunn foram empregados para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. As análises univariadas foram realizadas na plataforma R utilizando um script *in-house*.

4. Resultados

Um total de 40 pacientes assintomáticos classificados como de risco intermediário pelo FRS (16 CT-LeSc alto, 12 CT-LeSc baixo e 12 controles) confirmados por CCTA serviram como população do estudo. As características detalhadas dos dados clínicos estão listadas no Capítulo 1. Em comparação com a população controle e baixo CT-LeSc, a subpopulação de alto CT-LeSc era discretamente mais velha ($51,7 \pm 8,2$ vs $57,0 \pm 8,79$ vs $59,4 \pm 10,3$, $p = 0,046$). Exceto pela idade, os três grupos não foram diferenciados por outras características demográficas importantes, como sexo, IMC, nível de pressão arterial, tabagismo, HF precoce de DAC, achados laboratoriais (PCR-us, nível de colesterol), ultrassonografia de carótida, ecocardiograma ou medicamentos usados. Portanto, os achados encontrados não podem ser atribuídos a fatores clínico-demográficos.

Optamos por destacar os resultados quando utilizados o valor de corte de 5 de Leaman, dividindo os grupos em Alto CT-LeSc (maior que 5), Baixo CT-LeSc (menor ou igual a 5) e controle ao

invés dos tercís. A fundamentação desta escolha está embasada tanto na clínica quanto na técnica. Clinicamente, há maior facilidade de se aplicar na prática médica um escore com duas estratificações ao invés de três. Somado a isto, pesa a validação prognóstica já estabelecida com Alto e Baixo CT-LeSc (ANDREINI et al., 2015). Tecnicamente, a análise por multigrupos em metabolômica não é a ideal, sendo mais importante analisar par a par, além de ser mais difícil realizar estatística entre 3 grupos.

Análises multivariadas de PCA, PLS-DA e sparse PLS-DA também foram realizadas com os fenótipos classificados nos tercís de Leaman (T1, T2 e T3), cujos resultados de PCA e PLS-DA foram mostrados nas Fig. Supl. 1-7. A compilação dos metabólitos significativamente diferentes encontrados na análise univariada utilizada para avaliar individualmente os metabólitos responsáveis pelas diferenças entre os grupos classificados pelos tercís está no material suplementar (Fig. Supl. 12). Para a prospecção de biomarcadores em trabalhos *untargeted* como este, a análise multivariada é mais relevante, porque um biomarcador tem que ser discriminante. Em uma fase posterior, em experimento *targeted* para validação de um biomarcador, a análise univariada é mais importante, porque nos fornece os metabólitos significantes.

Foram necessárias as remoções de dois pacientes: MES (*outlier* analítico, uma vez que o afastamento atípico no gráfico de PCA foi devido a um problema no momento da aquisição dos dados) e MILB (*outlier* clínico, pois apesar de pertencer ao grupo controle, este paciente possui várias características de risco cardiovascular alto como altos níveis de proteína C reativa ultrasensível (> 2 mg/L), placas de aterosclerose nas artérias carótidas e obesidade grau 1.

4.1. Placa versus Controle

Buscando aprofundar o conhecimento sobre o estágio inicial de desenvolvimento da placa aterosclerótica coronariana, o primeiro objetivo do estudo foi comparar o perfil metabolômico de pacientes com placa (n = 28) e grupo controle sem placa (n = 12). Amostras QC no gráfico de PCA (Fig. Supl. 11) estão agrupadas no centro do plot, indicando boa reprodutibilidade do processamento da amostra e do sistema instrumental. A análise PCA e PLS-DA encontra-se na Fig. Supl. 8.

O sparse PLS-DA acessou as variáveis independentes e demonstrou uma boa separação entre os grupos quando 20 metabólitos foram selecionados. O modelo teve uma baixa taxa de erro de classificação (23,7%, ncomp=2), proporcionando agrupamento satisfatório (Fig. 24). Para avaliar a validade dos metabólitos para discriminação entre indivíduos Placa vs Controle, curvas ROC foram construídas para os 20 metabólitos selecionados. O melhor modelo foi obtido com 10 metabólicos com valor da Área Sob Curva (AUC) de 0,789 (IC 95%: 0,559-0,952) (Fig. 25), indicando que eles tinham boa capacidade de previsão, com acurácia de predição de 68,8% (Fig. 26). A importância média de cada composto para a separação dos grupos é mostrada na Fig. 27.

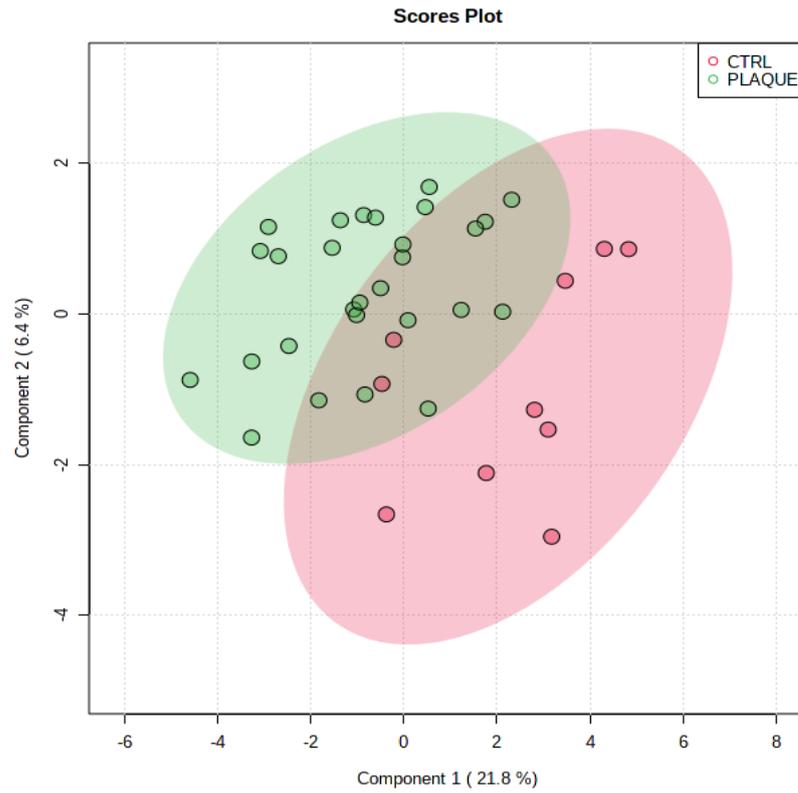


Figura 24. Análise discriminante de mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) na comparação Placa vs Controle. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

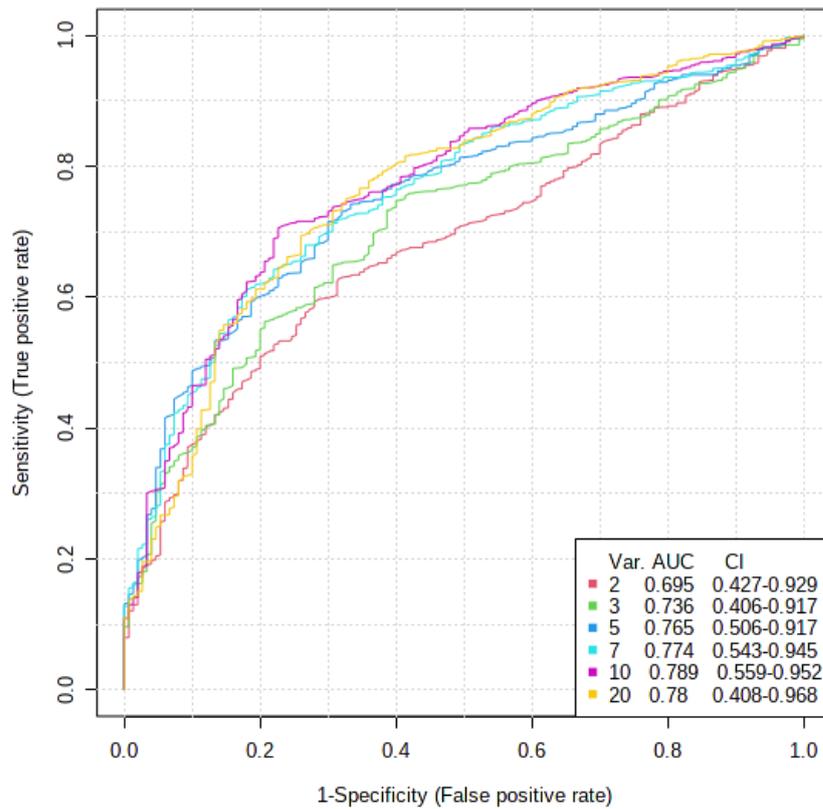


Figura 25. Curvas ROC obtidas com metabólitos selecionados (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA na comparação Placa vs Controle. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

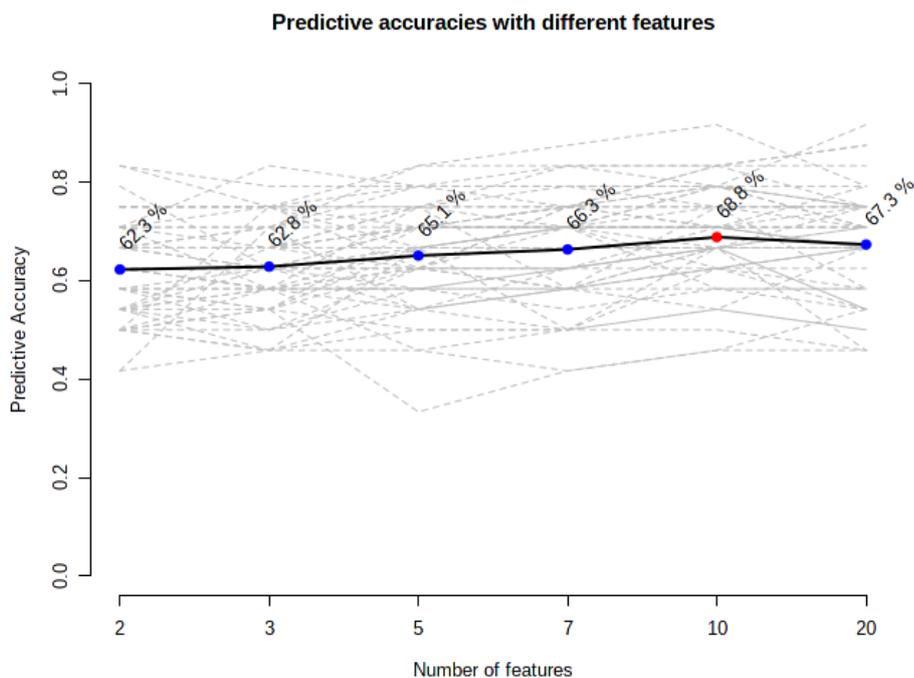


Figura 26. Acurácia de predição pelo modelo sPLS-DA na comparação Placa vs Controle. O melhor modelo foi obtido com 10 metabólicos com valor da AUC de 0,789 (IC 95%: 0,559-0,952), indicando que eles tinham boa capacidade de previsão, com acurácia de predição de 68,8%. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

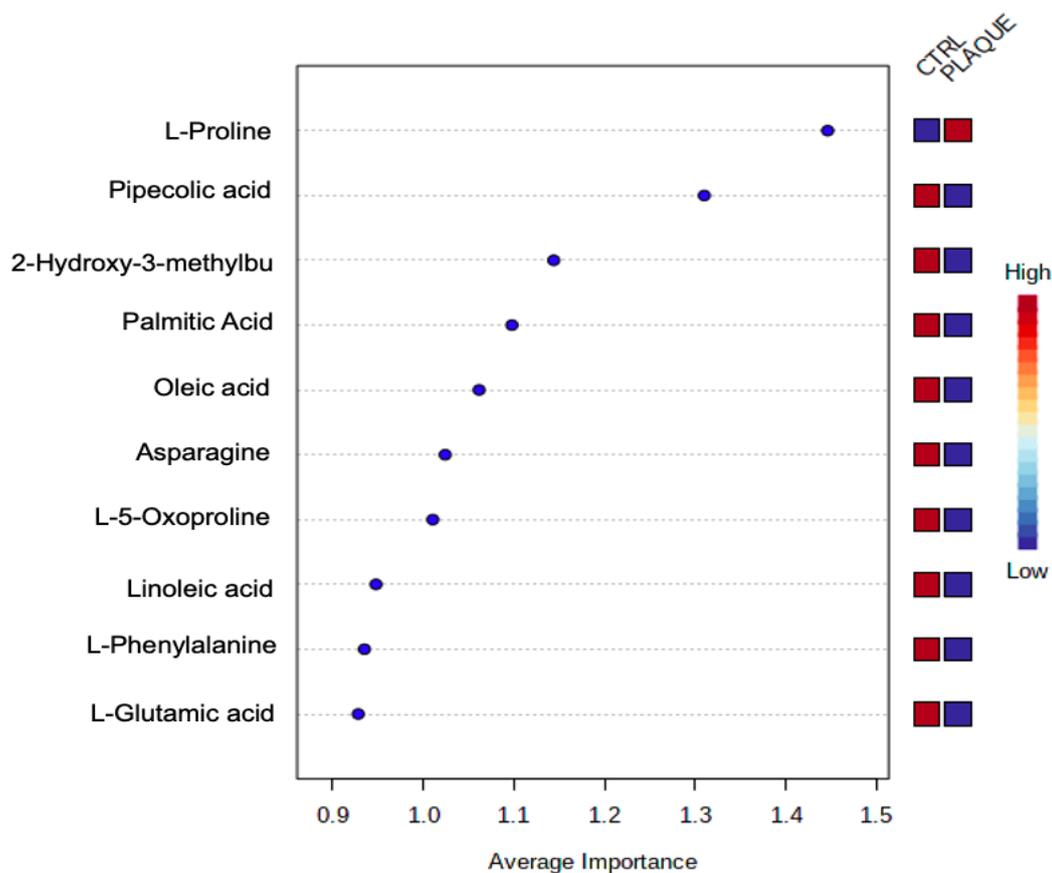


Figura 27. Metabólitos discriminantes validados pela curva ROC na comparação Placa vs Controle. As amostras são organizadas de acordo com a variável de pontuação de importância e o cenário de maior contribuição de cada metabólito é apresentado em uma escala de cores. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

4.2. Alto CT-LeSc versus Controle

Para investigar possíveis diferenças metabólicas entre indivíduos com fenótipos extremos opostos, as amostras Alto CT-LeSc e Controle foram confrontadas diretamente. A análise PCA e PLS-DA encontra-se na Fig. Supl. 9. O sPLS-DA acessou as variáveis independentes e demonstrou uma boa separação entre os grupos quando 20 metabólitos foram selecionados. O modelo teve uma baixa taxa de erro de classificação incorreta (26,9%, ncomp=2), proporcionando agrupamento satisfatório (Fig. 28). Para avaliar a validade dos metabólitos para discriminação entre indivíduos com CT-LeSc alto *versus* Controle, curvas ROC foram construídas para os 20 metabólitos selecionados. A AUC alcançada foi de 0,734 (IC de 95%: 0,424-0,955) (Fig. 29) para 20 metabólitos, indicando que eles tinham boa capacidade de predição, com acurácia de 67% (Fig. 30). A importância média de cada composto para a separação dos grupos é mostrada na Fig. 31.

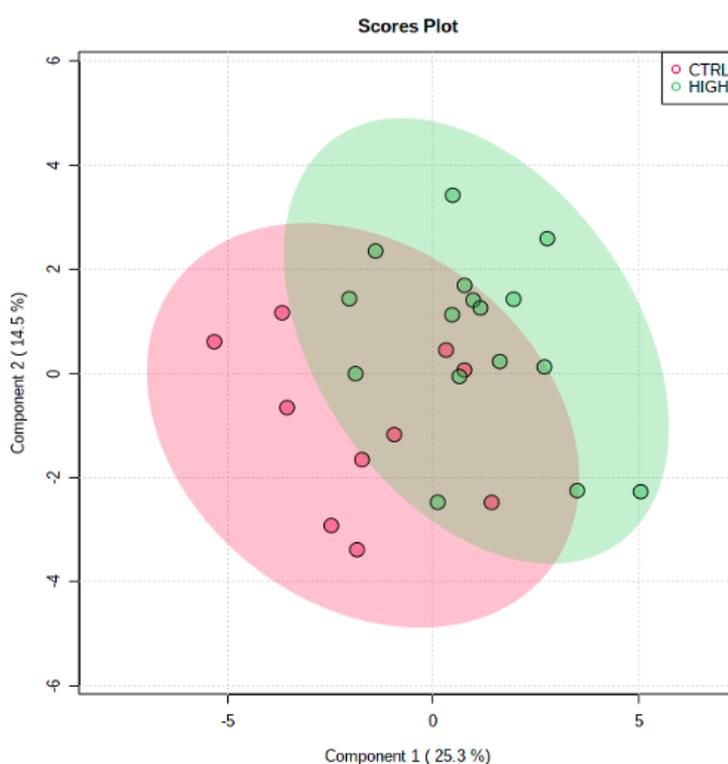


Figura 28. Análise discriminante de mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) na comparação Alto CT-LeSc vs Controle. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

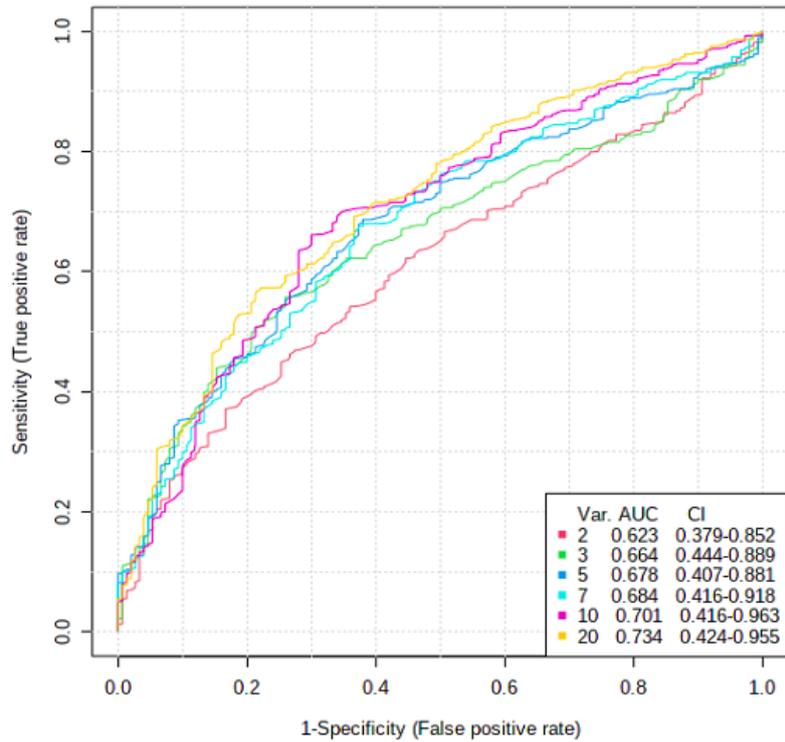


Figura 29. Curvas ROC obtidas com metabólitos selecionados (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA na comparação Alto CT-LeSc vs Controle. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

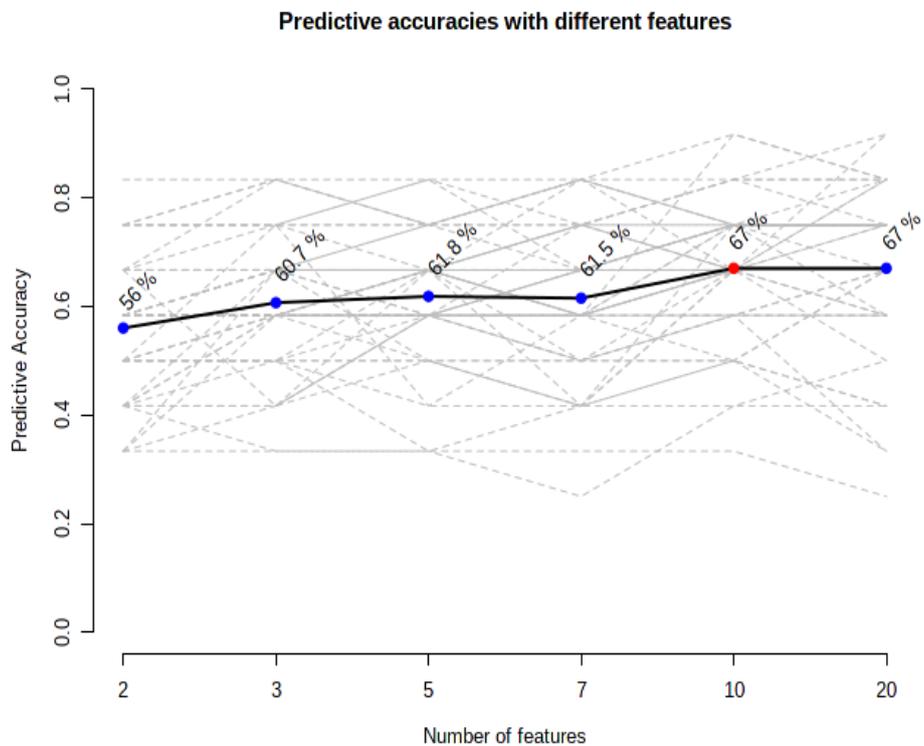


Figura 30. Acurácia de predição pelo modelo sPLS-DA na comparação Alto CT-LeSc vs Controle. O melhor modelo foi obtido com 10 metabólitos com valor da AUC de 0,701 (IC 95%: 0,416-0,963), indicando que eles tinham boa capacidade de previsão, com acurácia de predição de 67%. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

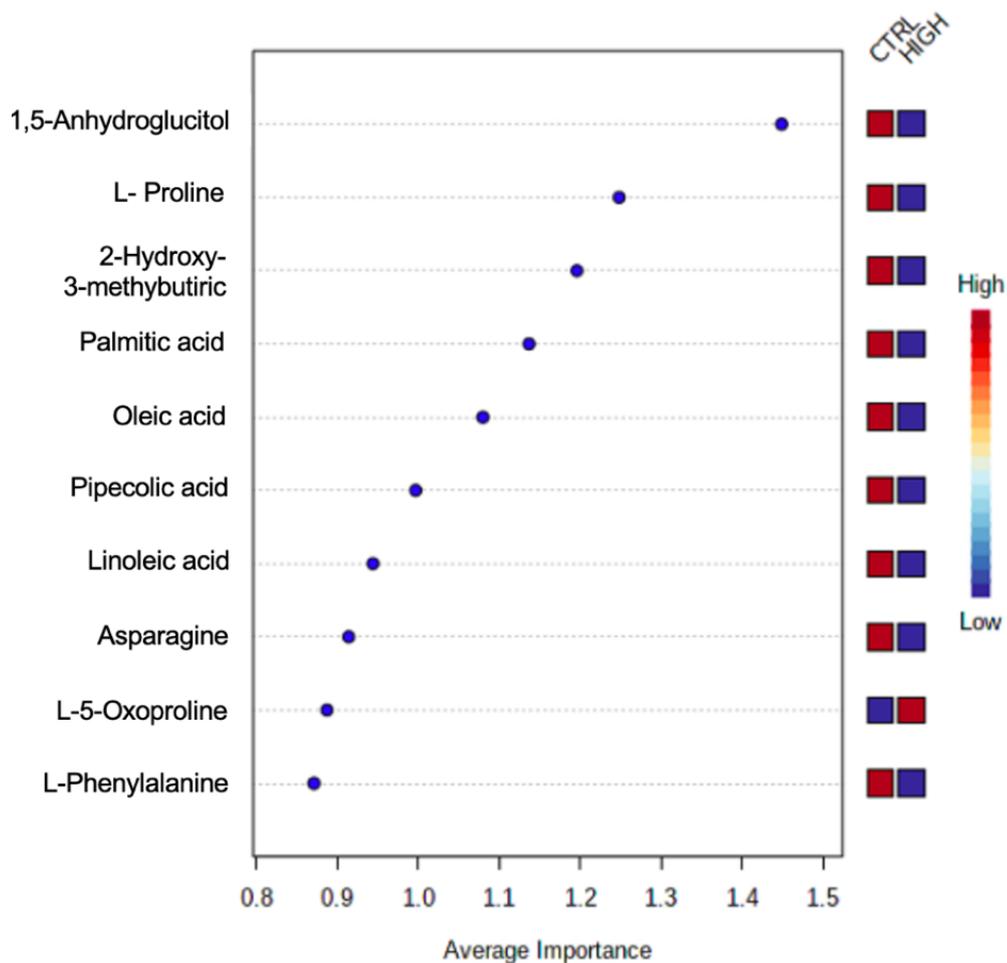


Figura 31. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Alto CT-LeSc vs Controle. As amostras são organizadas de acordo com a variável de pontuação de importância e o cenário de maior contribuição de cada metabólito é apresentado em uma escala de cores. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

4.3. Alto CT-LeSc versus Baixo CT-LeSc

Sequencialmente, investigamos dentro do grupo com placa, as possíveis diferenças metabólicas entre indivíduos com fenótipos CT-LeSc alto vs CT-LeSc baixo. A análise PCA e PLS-DA encontra-se na Fig. Supl. 10. O sPLS-DA acessou as variáveis independentes e demonstrou uma boa separação entre os grupos quando 20 metabólitos foram selecionados. O modelo teve taxa de erro de classificação de 42,9% (ncomp=2), proporcionando agrupamento visualizado na Fig. 32. Para avaliar a validade dos metabólitos para discriminação entre indivíduos com CT-LeSc alto versus controle, curvas ROC foram construídas para os 20 metabólitos selecionados. A AUC alcançada foi de 0,654 (IC de 95%: 0,389-0,837) (Fig. 33) para 20 metabólitos, indicando uma acurácia de 57,2% (Fig. 34). A importância média de cada composto para a separação dos grupos é mostrada na Fig. 35.

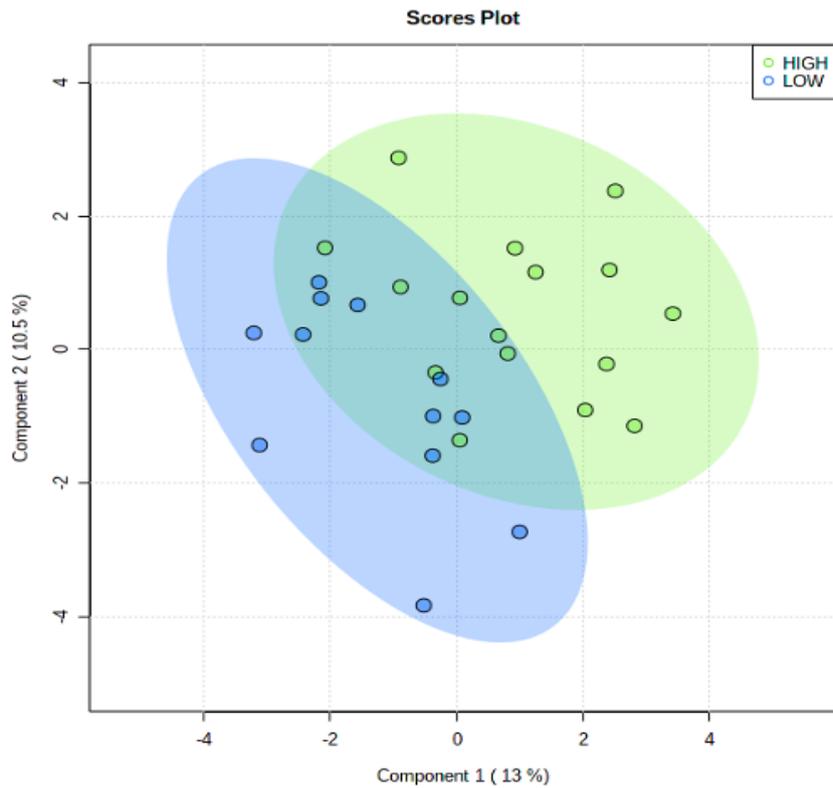


Figura 32. Análise discriminante de mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

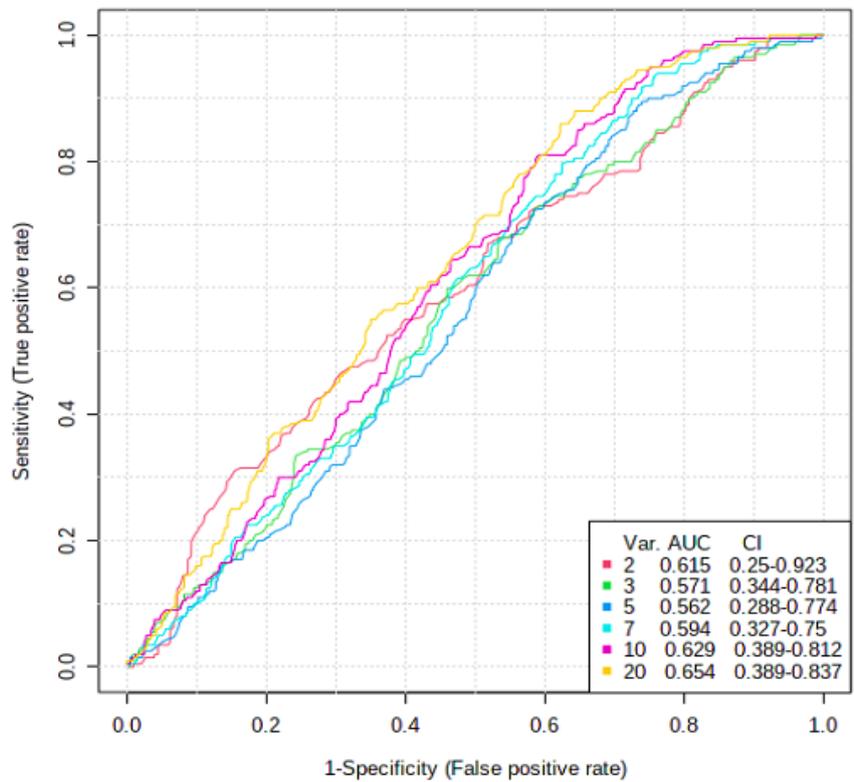


Figura 33. Curva ROC obtida com características selecionadas (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

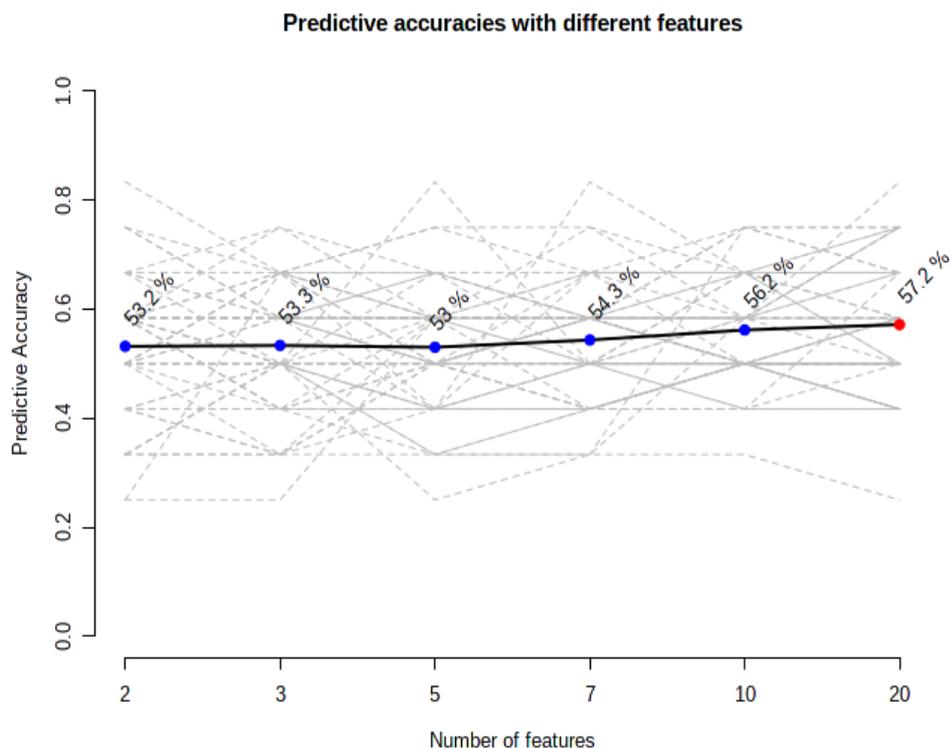


Figura 34. Acurácia de predição pelo modelo sPLS-DA na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc. O melhor modelo foi obtido com 10 metabólicos com valor da AUC de 0,654 (IC 95%: 0,389-0,837), indicando que eles tinham boa capacidade de previsão, com acurácia de predição de 57,2%. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

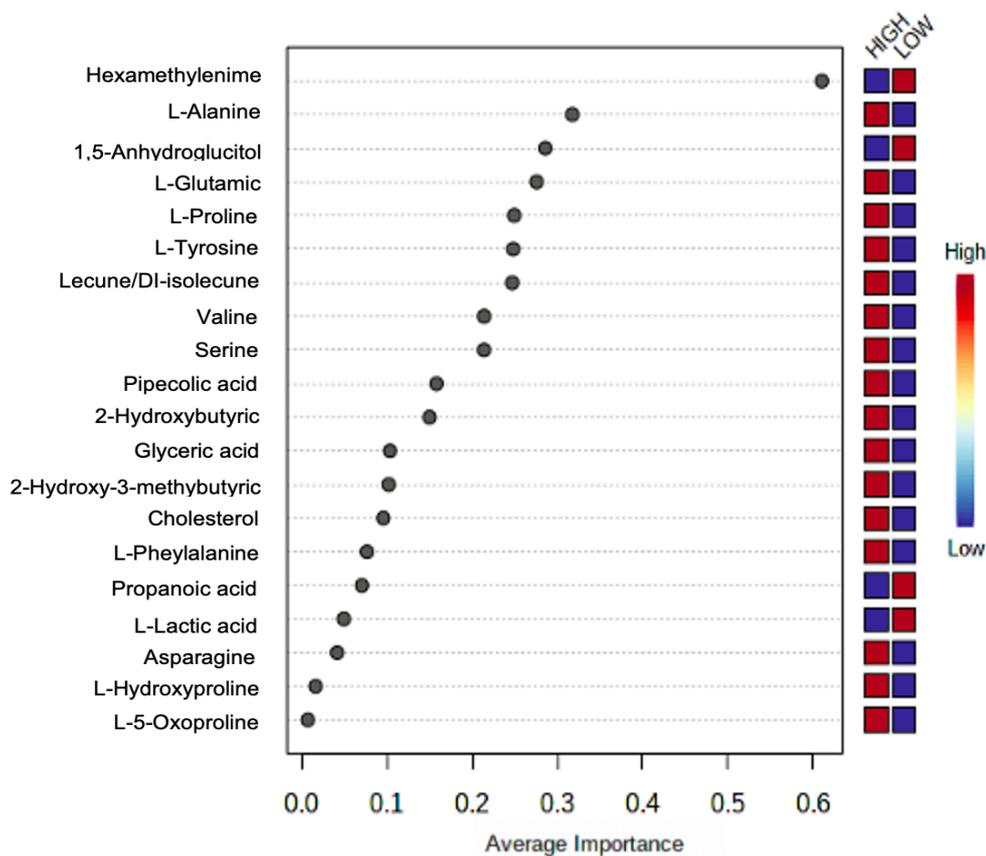


Figura 35. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc. As amostras são organizadas de acordo com a variável de pontuação de importância e o cenário de maior contribuição de cada metabólito é apresentado em uma escala de cores. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

5. Discussão

Em contraste com o genoma, que fornece informações sobre o futuro (a probabilidade de sofrer uma doença), o metaboloma é uma representação relevante do fenótipo porque reflete o que realmente está acontecendo com o sistema (está doente?). Há grande interesse em se determinar a existência de metabólitos capazes de identificar indivíduos com DAC, principalmente com aterosclerose subclínica. Portanto, o uso de perfis metabolômicos como uma impressão digital única associada a uma DAC subclínica pode servir como uma ferramenta significativa no diagnóstico precoce.

Diferenças no metabolismo primário entre pacientes assintomáticos com risco intermediário de FRS com placas ateroscleróticas coronárias (classificadas por CT-LeSc) e sem placas (controle) foram interrogadas usando perfis metabólicos. A principal descoberta deste trabalho é que a metabolômica por GC-MS pode ter o potencial de melhorar o desempenho diagnóstico da CCTA não invasiva na detecção e caracterização da DAC nesta população específica, fundamentalmente por discriminar pacientes controle dos com placas de alto risco e, portanto, de pior prognóstico. Neste estudo, descobrimos que metabólitos dentro da via catabólica de aminoácidos, açúcares e ácidos graxos estão associados a diferentes fenótipos de CCTA nos pacientes de grupo intermediário. Esses resultados dão suporte à hipótese de que esses metabólitos podem participar do desenvolvimento da DAC.

5.1. Associação de aminoácidos e DAC

Existe uma forte relação entre as alterações no metabolismo dos aminoácidos (AA) e o desenvolvimento da aterosclerose. Alguns AA se destacam no estresse oxidativo e nas vias inflamatórias presentes no desenvolvimento de placas ateroscleróticas mais vulneráveis à ruptura. Estudos recentes indicam claramente que certos aminoácidos são marcadores precoces do desenvolvimento de DAC aterosclerótica (LYNCH et al., 2014; YOON et al., 2016; YANG et al., 2014).

Neste trabalho, a L-5-oxoprolina foi expressa de forma mais intensa no grupo Alto CT-LeSc quando comparada aos grupos Baixo CT-LeSc e Controle. Este AA está envolvido tanto na síntese quanto na degradação da glutathione. A deficiência de glutathione, por sua vez, contribui para o estresse oxidativo, que desempenha um papel fundamental na patogênese da aterosclerose (TZOULAKI et al., 2019). Corroborando com nossos achados, van der Pol e colaboradores (VAN DER POL et al., 2017) documentaram que o aumento da 5-oxoprolina plasmática estava associado a piores desfechos clínicos em pacientes com insuficiência cardíaca. Para elucidar seu potencial como biomarcador circulante, os autores testaram o potencial prognóstico da 5-oxoprolina em uma coorte de 535 pacientes hospitalizados por insuficiência cardíaca aguda (IC), acompanhados por 18 meses.

O desfecho primário do estudo foi mortalidade por todas as causas e hospitalização por insuficiência cardíaca. Pacientes com níveis mais elevados de 5-oxoprolina tiveram maior incidência de fibrilação atrial e níveis mais elevados de peptídeo natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP) e glutamato. Além disso, a 5-oxoprolina tem sido associada a biomarcadores conhecidos para remodelação cardíaca e estresse oxidativo. Em análises multivariadas, corrigidas para idade, sexo, função renal, história de fibrilação atrial, concentração de NT-proBNP, o tercil mais alto de 5-oxoprolina permaneceu significativamente associado a um maior risco de atingir o desfecho primário combinado em comparação com o nadir do risco [risco razão (HR), 1,54; Intervalo de confiança (IC) de 95%, 1,09 a 2,17; P = 0,013; bem como para os dois tercils mais baixos (HR, 1,42; IC 95%, 1,09 a 1,85; P = 0,009). Assim, os resultados deste estudo sugerem que a 5-oxoprolina circulante é um marcador de estresse oxidativo com possível potencial diagnóstico e prognóstico em pacientes com IC.

Também observamos que leucina, valina e isoleucina, todos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), foram mais intensos nos pacientes do grupo Alto CT-LeSc do que no grupo Baixo CT- LeSc. Um estudo recente (ZARIC et al., 2020) relatou correlações positivas entre os níveis plasmáticos de BCAA e a ocorrência de distúrbios metabólicos, com níveis séricos elevados indicando alto risco cardiometabólico. Os autores descrevem que níveis cronicamente elevados associados à desregulação de seu catabolismo podem afetar o metabolismo da glicose por meio da supressão do complexo piruvato desidrogenase e levar à doença arterial coronariana isquêmica. Bhattacharya et al. (BHATTACHARYA et al, 2014) também encontraram associação entre os BCAAs, seus metabólitos e a DAC. Os autores conduziram perfis baseados em espectrometria de massa de 63 metabólitos no plasma em jejum de 1.983 pacientes sequenciais submetidos a cateterismo cardíaco. Eles validaram a associação de metabólitos envolvidos no metabolismo de BCAA com extremos de DAC, independente de resistência à insulina e diabetes, conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento de DAC. Usando LC-MS direcionado para traçar o perfil de 69 metabólitos em indivíduos com e sem DAC que foram encaminhados a um laboratório acadêmico de cateterismo cardíaco, Shah et al. (SHAH et al., 2010) descobriram que os BCAAs foram positivamente e independentemente associados à presença de DAC (OR, 1,36; P = 0,02). Finalmente, no estudo transversal realizado em indivíduos chineses, Yang et al. (YANG, et al, 2014) investigaram se os AAs poderiam ser usados para identificar indivíduos com aterosclerose subclínica em risco de desenvolver DAC causada por aterosclerose, já que os níveis de BCAA já haviam sido correlacionados com dislipidemia aterogênica. Com base na imagem da artéria carótida e nos níveis séricos de BCAA, eles determinaram uma correlação positiva significativa e independente entre os BCAAs e o aumento da cIMT. Essa relação ainda estava presente na análise de regressão linear multivariada, que controlou os fatores de risco tradicionais de DAC.

Além disso, na comparação direta entre controle e grupo de alto risco, também demonstramos que o ácido L-glutâmico foi mais intenso no controle. Está bem estabelecido que a glutamina desempenha um importante papel regulador inibindo a progressão de lesões ateroscleróticas e beneficiando a estabilidade das placas. Essa molécula está envolvida na síntese da glutathione, que exerce forte efeito antioxidante contra os danos causados pelo estresse (HARTMANN et al., 2017). Durante a aterogênese, os monócitos migram da corrente sanguínea para a sub-íntima e se diferenciam em macrófagos, que então passam por diferentes estados de polarização. Os estados de ativação dos macrófagos são divididos em polarizações M1 (pró-inflamatória) e M2 (anti-inflamatória). Tavakoli et al. (TAVAKOLI et al., 2017) revelaram que a alta captação de glutamina pelo macrófago indica uma alta população de macrófagos anti-inflamatórios. Jha et al. (JHA et al., 2015) mostraram que um terço da fonte de carbono e >50% do nitrogênio nos metabólitos do ácido tricarbóxico dos macrófagos M2 são derivados da glutamina e a privação ou inibição da N-glicosilação pela glutamina reduz a polarização dos macrófagos M2. Recentemente, Chen et al. (CHEN et al., 2020) apresentaram uma visão geral das evidências atuais e dos papéis funcionais da glutamina na DCV aterosclerótica. Os autores relataram que a privação de glutamina aumentou a expressão de genes marcadores de macrófagos do tipo M1. Por outro lado, sua presença protege contra a lesão de isquemia-reperfusão por meio da via antioxidante e bloqueia a lesão por estresse oxidativo induzida por espécies reativas de oxigênio. Tomados em conjunto, esses estudos indicam claramente que a glutamina está inversamente relacionada com a progressão das lesões ateroscleróticas.

Notavelmente, a fenilalanina foi observada com cargas muito altas nos controles. Nossos dados são consistentes com o estudo de Heikal et al. (HEIKAL et al., 2018). Os autores mostraram que a administração de L-fenilalanina foi capaz de aumentar a biossíntese de tetra-hidrobiopterina endógena (um cofator essencial para a sintase do óxido nítrico), elevar os níveis de nitrito, reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio vascular e melhorar o endotélio relaxamento vascular dependente em um modelo animal de hipertensão essencial. Além disso, também é descrito um possível papel da fenilalanina na inibição da agregação, adesão e formação de coágulos sanguíneos (KARAVAY et al., 2020).

5.2. Associação de outros ácidos orgânicos e DAC

Neste estudo, o 2-hidroxi-3-metilbutírico, conhecido como um ácido graxo de cadeia curta ramificada derivado principalmente de proteínas e aminoácidos, foi expresso de forma mais intensa no grupo Controle quando comparado ao grupo Placa e ao grupo Alto CT-LeSc. É descrito que os estes ácidos graxos exibem um efeito protetor da aterosclerose, impedindo a proliferação de células musculares lisas vasculares (MATHEW et al., 2010). Por outro lado, sabe-se que as lesões vasculares calcificadas associadas à aterosclerose, diabetes e doença renal crônica são enriquecidas em ligantes

de proteína morfogenética óssea (BMP). Em uma coorte de hemodiálise, Wu et al. (WU et al., 2019) investigaram associações entre o ácido 2-metilbutírico com um grande número de proteínas CV específicas circulantes e descobriram que os níveis circulantes de ácido 2-metilbutírico estavam negativamente associados à proteína morfogenética óssea 6 (BMP-6).

Os níveis de ácido pipecólico também foram maiores nos controles do que no grupo de placa. O ácido pipecólico é uma molécula originária da via de degradação da lisina, possivelmente do metabolismo de enzimas bacterianas intestinais. Um estudo publicado por Razquin et al. (RAZQUIN et al.; 2019) encontrou associação de lisina com risco de DCV, mas não com ácido pipecólico. Por outro lado, outros estudos mostraram que os níveis plasmáticos de ácido pipecólico estavam elevados em pacientes com DAC/fatores de alto risco (DEIDDA et al., 2022) e em estroma corneano diabético humano (PRIYADARSINI et al, 2016). O controle mais intensivo dos fatores de risco na presença de DAC pode explicar, a nosso ver, essa aparente contradição de nosso achado.

5.3. Associação de açúcares e DAC

O grupo Controle foi caracterizado por maiores concentrações de 1,5-anidroglicitol em comparação com o grupo placa. É um monossacarídeo que se mantém estável no sangue em níveis normais de glicose no sangue, mas em estados de hiperglicemia sua excreção é aumentada na urina e, conseqüentemente, sua concentração é menor no sangue. Nossa descoberta é consistente com dados de estudos que demonstram evidências crescentes de que em concentrações muito baixas o 1,5-AG agrega valor prognóstico para risco aumentado de diabetes diagnosticado incidente, doença renal crônica, doença cardiovascular e mortalidade por todas as causas (SELVIN et al., 2016; WARREN et al., 2020).

5.4. Associação de ácidos graxos e DAC

Dois ácidos graxos, ácido linoleico (LA) e ácido oleico (OA), foram altamente representados no grupo Controle quando comparado ao grupo placa. De acordo com um estudo prospectivo recente (OLIVERAS et al., 2022) com pacientes na fase aguda do infarto do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST, os autores determinaram os ácidos graxos nos fosfolipídios séricos por CG-MS. Eles mostraram que os pacientes que desenvolveram fibrilação ventricular (FV) primária tinham menor nível de AL circulante em comparação com pacientes infartados sem essa arritmia maligna. Em um modelo de regressão logística condicional, cada aumento do desvio padrão na proporção de LA foi relacionado a uma prevalência 42% menor de FV (odds ratio=0,58; intervalo de confiança de 95%, 0,37, 0,90; P=0,02). Em relação ao ácido oleico, na literatura (PERDOMO et al., 2015) tem sido descrito que o oleato pode contribuir para uma melhora do processo aterosclerótico e sua estabilidade através da inibição da via NF-κB e JNK-1/2 e também melhora a trombogênese

promovendo a fibrinólise por inibição do inibidor do ativador do plasminogênio -1. Além disso, o OA protege contra a resistência cardiovascular à insulina, melhora a disfunção endotelial, a inflamação e, finalmente, reduz a proliferação e a apoptose nas células musculares lisas vasculares. Curiosamente, nosso achado de uma associação negativa de ácido palmítico e grupos de controle contrasta com o descrito na literatura, onde foi associado a efeitos cardiovasculares adversos (PERDOMO et al., 2015; SHEN et al., 2013; HARVEY et al., 2010). O pano de fundo fisiopatológico deste nosso achado ainda precisa ser elucidado.

Constatamos que o modelo de predição na comparação entre os grupos Alto CT-LeSc Alto vs. Baixo CT-LeSc teve menor capacidade discriminatória em relação aos demais cenários confrontados (Controle vs. Placa e Controle vs. Alto CT-LeSc), o que impacta na sua interpretação clínica. Como ciência é mais sobre formulação de perguntas do que encontro de respostas, algumas hipóteses foram formuladas.

Dentre as considerações levantadas, a primeira diz respeito à complexidade humana inerente aos estudos de metabolômica clínica. Quando mudamos o perfil do grupo de estudo e paramos de comparar doentes (placas) x saudáveis (controle) e passamos a estudar exclusivamente dentro do grupo com placa, nos deparamos com grupos mais semelhantes. De fato, Alto CT-LeSc e Baixo CT-LeSc são fenótipos claramente mais próximos entre si dentro de toda a população do estudo. Assim, fica mais difícil encontrar diferenças porque a complexidade aumenta, principalmente em razão dos participantes do estudo serem de risco intermediário para eventos cardiovasculares e não de alto risco.

O que vemos na prática em estudos de metabolômica clínica é que análises não supervisionadas, como PCA, não discriminam grupos. E, cada vez mais, modelos supervisionados como PLS-DA e OPLS-DA também são limitados em fazê-lo. As justificativas levantadas para isso são: (1) Mudança nos perfis de estudo (grupos cada vez mais semelhantes) e (2) Geração de dados cada vez mais complexos, em que ao mesmo tempo que temos equipamentos de alta resolução, por outro lado há a produção de maior volume de dados, e, conseqüentemente, com maior volume de ruído. Acreditamos que a busca para encontrar as respostas que procuramos passa por alguns pontos, como: (1) Aumento do número amostral; (2) Análise multiplataforma (conexão entre as diferentes “ômicas”) para criação de *painéis* metabólicos que cubram todo o metaboloma; (3) Monitoramento de um conjunto de metabólitos; (4) Associação de resultados de diferentes estudos e (5) Uso de ferramentas estatísticas cada vez mais precisas, incluindo curvas ROC e aplicação de inteligência artificial.

Uma interpretação biológica aventada para explicar a menor discriminação entre Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc na metabolômica por GC-MS está ancorada na ideia já descrita no Capítulo 1 sobre a relevância também de outros comemorativos no “microambiente” da placa, como a inflamação e

a pró-trombogenicidade do meio no processo de aterogênese coronariana. De fato, nosso conhecimento sobre a DAC está em transição e uma abordagem focada na lesão está sendo substituída, cada vez mais, por uma abordagem mais abrangente. A visão mais atual que busca explicar o desenvolvimento da aterosclerose coronariana entende que o processo de desenvolvimento da placa aterosclerótica é dinâmico e em etapas, e não contínuo e previsível.

As placas podem alternar entre estado estável e instável durante todo o processo da doença (MUSHTAQ et al., 2015). De forma análoga a um pequeno “vulcão”, os ateromas entram em períodos de “ebulição” que podem ser limitados e clinicamente imperceptíveis, seguidos por períodos de relativa inatividade. Quando a ruptura ou erosão da placa ocorre em um meio pró-trombótico, o resultado é a trombose suboclusiva ou oclusiva, causando um evento coronariano agudo sintomático; mas, caso contrário, se fatores resistentes à trombose prevalecem, a formação de trombos é contida e ocorre a cura da placa (LIBBY, 2013). O que se sabe é que vias inflamatórias distintas estão envolvidas nestes dois processos (instabilidade da placa vs cura da placa). Ou seja, uma hipótese é que de que estes “fatores resistentes” à trombose estejam presentes e ativados no grupo de Alto CT-LeSc e no de Baixo CT-LeSc, que são fenótipos muito próximos, razão pela qual todos estes pacientes estão, de fato, assintomáticos.

Dito isto, é fundamental destacar que o metaboloma é, dentro da faixa de “abordagens ômicas”, o mais intimamente ligado ao fenótipo do indivíduo. Os metabólitos mudam continuamente e são influenciados por vários estados; podem, inclusive, relatar o estado da doença. Diferentemente, portanto, da genômica, por exemplo, que está interessada nos genes que são quase fixos desde o nascimento. É imperioso destacar que este resultado foi fornecido por GC-MS, que é uma técnica que não consegue englobar uma vasta classe de compostos, restringindo-se aos metabólitos. Da mesma forma, é importante lembrar que a análise dos nossos dados clínicos e demográficos confirmou que os grupos são homogêneos do ponto de vista clínico. Ambos, por exemplo, não diferiram quando ao uso de estatina ou quanto ao nível de colesterol LDL. Em outras palavras, este grupo de pacientes de Alto CT-LeSc pode não estar em meio pró-trombótico, uma vez que outros marcadores de risco para DAC (tabagismo, IMC, PCRus, níveis de CT, LDL, HDL, triglicerídeos, IMT das artérias carótidas, nível de pressão arterial sistêmica) não apresentaram p valor < 0.05 quando comparado aos grupos com CT-LeSc menor e mesmo com o grupo controle.

Nossos achados são relevantes porque fornecem novas evidências metabolômicas de caracterização de placas ateroscleróticas em pacientes de risco intermediário, um grupo tão abrangente, em uma fase pré-clínica. As alterações metabólicas a nível de metabolismo primário na aterosclerose coronariana são bastante complexas e os resultados obtidos nesta avaliação *untarget* são preliminares, por enquanto especulativos e, portanto, estudos complementares se fazem necessários. Assim, estes resultados demonstram que é imperioso aprofundar o conhecimento das

rotas metabólicas envolvendo estes pequenos metabólitos na aterogênese coronariana e a importância de se complementar as informações obtidas pela técnica de GC-MS e de se trabalhar com mais de uma técnica para alcançar uma cobertura mais ampla do metaboloma. Isso é particularmente importante no estudo da aterosclerose, que tem nos lipídios (que não são avaliados por GC-MS) um papel fundamental em sua gênese.

6. Limitações

Este estudo atual tem limitações. Primeiro, reconhecemos que os níveis de metabólitos nas placas podem não se correlacionar com os níveis de metabólitos no sangue. Segundo, como previamente discutido, a detecção limitada de pequenos metabólitos polares pode estar relacionada à escolha da ferramenta analítica. Mesmo com a derivatização da amostra, o limite de peso molecular da cromatografia gasosa é < 650 daltons. Uma vez derivatizados, muitos compostos produzidos na DAC são maiores do que isso e podem não ser resolvidos por GC-MS (FIEHN et al., 2016). Notavelmente, isso inclui as moléculas lipídicas (alto peso molecular) consideradas a pedra angular da formação da placa aterosclerótica. Terceiro, como algumas possíveis variáveis de confusão relacionadas à saúde (ou seja, status socioeconômico, nível educacional, adesão à dieta mediterrânea) não estavam disponíveis, não poderíamos excluir a possibilidade de que fatores ambientais não capturados possam ter influenciado ou causado a associação observada. Finalmente, o tamanho da amostra do presente estudo foi relativamente pequeno e uma população maior de pacientes precisa ser estudada para confirmar nossos achados.

7. Conclusão

Este estudo foi o primeiro, até onde sabemos, a estudar as ligações entre metabolismo celular primário alterado correlacionado com fenótipos tomográficos de Leaman em pacientes assintomáticos de risco intermediário de Framingham. A análise de GC-MS dos dados de abundância de metabólitos diferenciou com sucesso entre controles de pacientes com coronárias afetadas por placas de aterosclerose e entre controle e o fenótipo tomográfico de Alto risco de Leaman com boa predição, embora quando os grupos patológicos de Leaman foram confrontados (Alto vs Baixo CT-LeSc) esta predição tenha sido modesta. A assinatura metabólica encontrada no plasma de pacientes com alto CT-LeSc oferece um salto em nossa compreensão do desenvolvimento de placas de alto risco mais vulneráveis à ruptura. Ainda há muito trabalho a ser feito para aprofundar este tema e novos estudos devem ser realizados para determinar e avaliar os mecanismos por trás dessas relações, mas este estudo forneceu uma pequena prova de conceito de que essa correlação expande o novo campo de pesquisa no mecanismo da compreensão e avaliação na prática clínica da presença de DAC em pacientes assintomáticos de risco intermediário para eventos cardiovasculares.

8. Material Suplementar

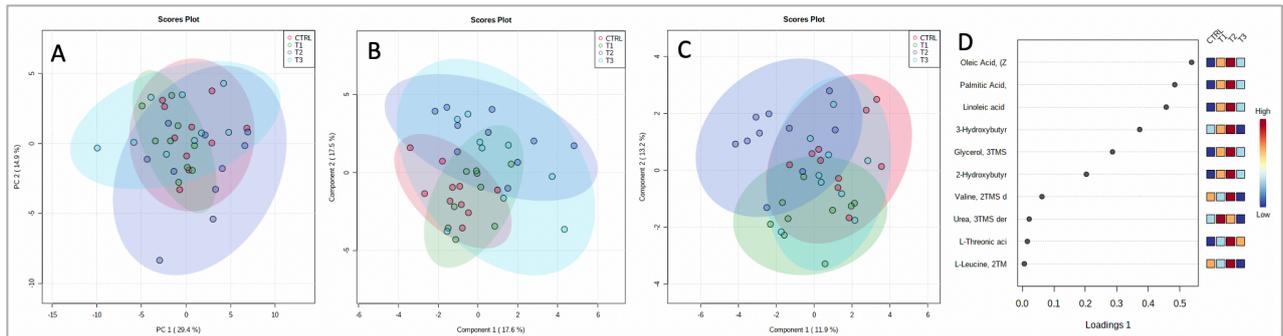


Figura Supl. 1. Gráficos de escores dos Tercis 1 (T1) vs Tercil 2 (T2) vs Tercil 3 (T3) de Leaman vs controle (CTRL). (A) PCA; (B) PLS-DA, com $R^2 = 0,7$ e $Q^2 = -0,4$; (C) sPLS-DA, com erro de classificação de 50%; (D) Loadings dos metabólitos discriminantes. Nesta comparação entre os quatro fenótipos não houve boa discriminação entre os cenários. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

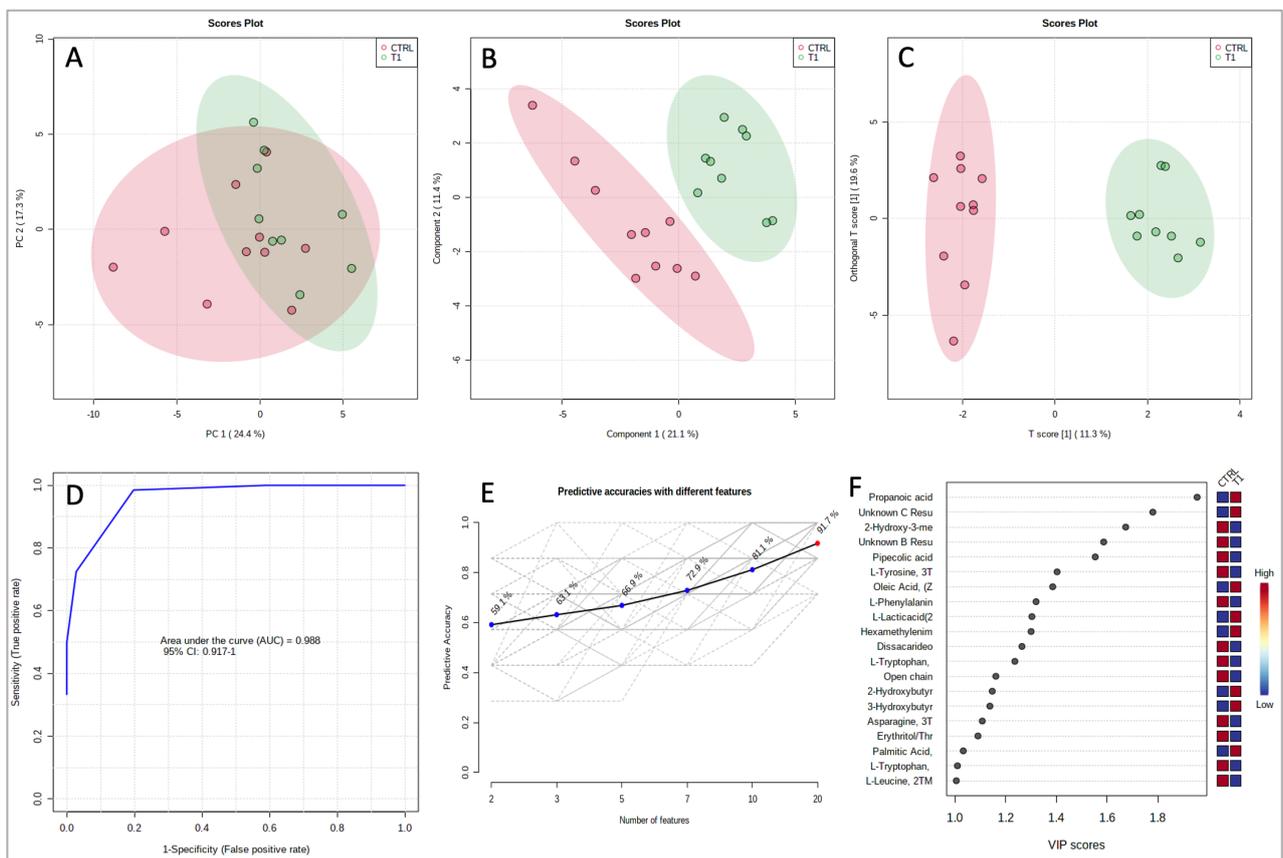


Figura Supl. 2. Gráficos de escores do Tercil 1 de Leaman (T1) vs controle (CTRL). (A) PCA; (B) PLS-DA; (C) oPLS-DA; (D) Curva ROC obtida com os features selecionados (VIP) pelo modelo OPLS-DA com AUC = 0,988; (E) Acurácia de predição de 91,7%; (F) Loadings dos metabólitos discriminantes. Em T1 vs CTRL, PLS-DA apresentou bom ajuste do modelo ($R^2 = 0,97$) e boa capacidade de predição ($Q^2 = 0,61$), porém o p valor do teste de permutação foi maior o que 0.05 (p-valor = 0,97). No modelo oPLS-DA, o S-plot auxilia na identificação de MF potencialmente significantes no sistema, baseado nas contribuições do modelo (correlação) e sua confiança (covariância) (SUGIMOTO et al., 2012). No oPLS-DA foram observadas separações entre as amostras dos dois grupos, com $R^2 = 0,97$, $Q^2 = 0,63$ e p-valor igual a 0,02. Portanto, nesta comparação T1 vs CTRL houve discriminação entre os cenários. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

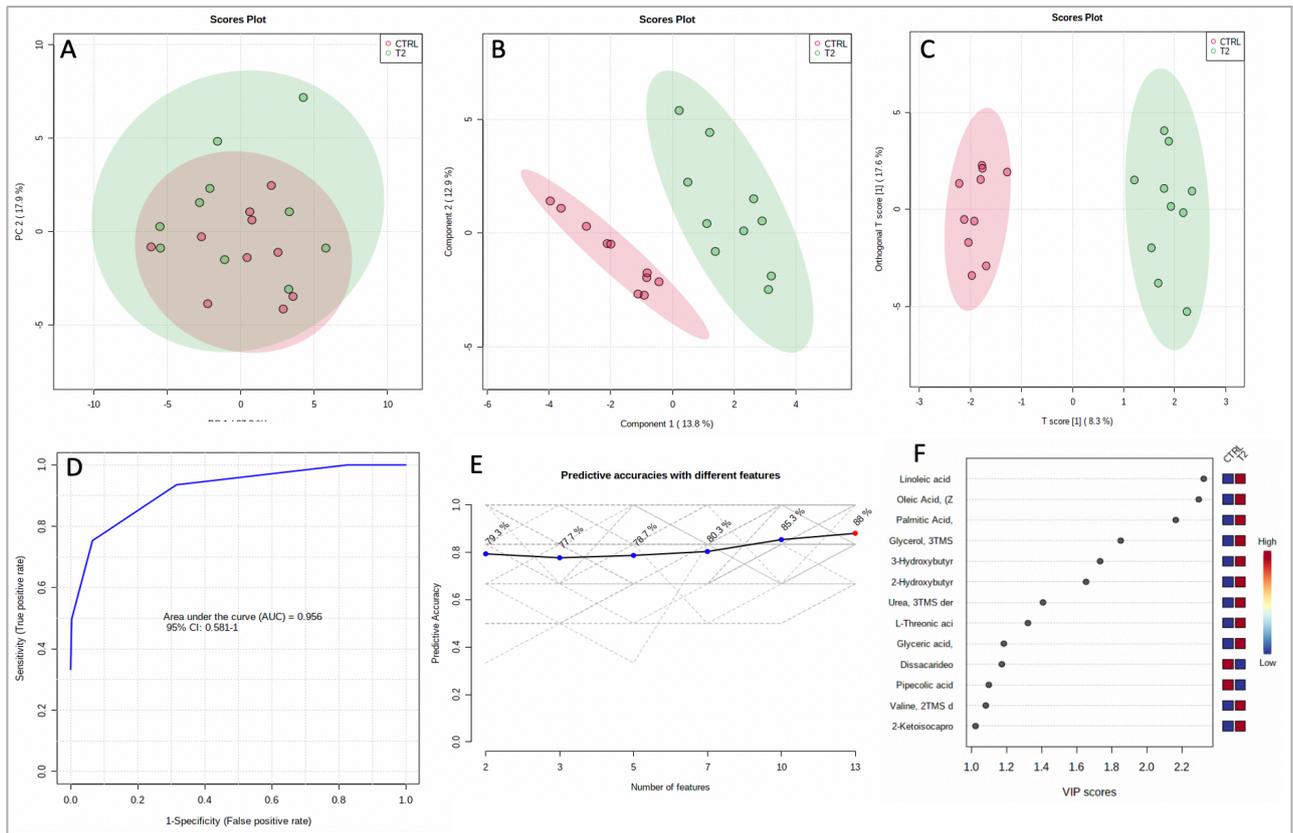


Figura Supl. 3. Gráficos de escores do Terçil 2 de Leaman (T2) vs controle (CTRL). (A) PCA; (B) PLS-DA; (C) oPLS-DA; (D) Curva ROC obtida com os features selecionados (VIP) pelo modelo OPLS-DA; (E) Acurácia de predição de 88%; (F) Loadings dos metabólitos discriminantes. Em T2 vs CTRL, PLS-DA apresentou bom ajuste do modelo ($R^2 = 0,97$) e boa capacidade de predição ($Q^2 = 0,63$), porém o p valor do teste de permutação = p-valor = 0,16. No oPLS-DA foram observadas separações entre as amostras dos dois grupos, com $R^2 = 0,97$, $Q^2 = 0,61$ e p-valor igual a 0,003. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

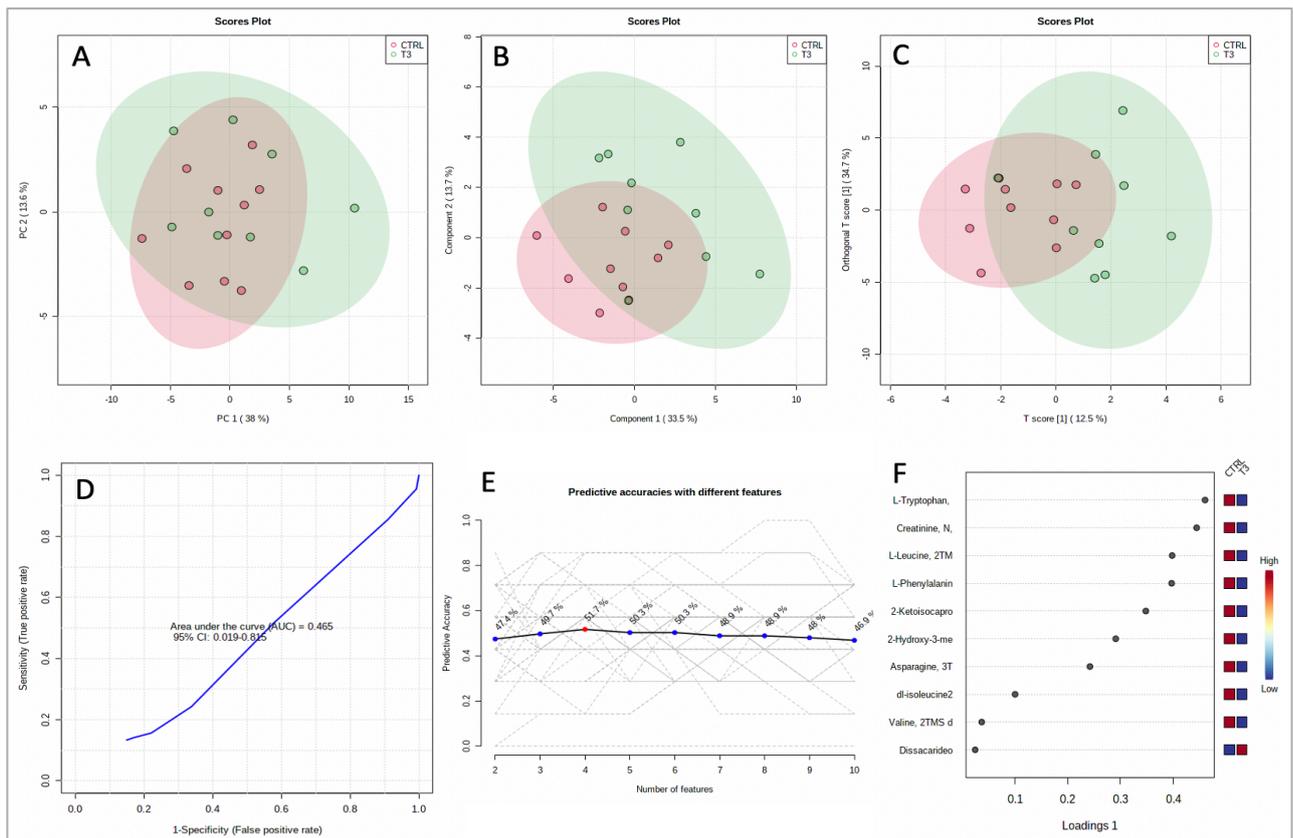


Figura Supl. 4. Gráficos de escores do Tercil 3 de Leaman (T3) vs controle (CTRL). (A) PCA; (B) PLS-DA; (C) oPLS-DA; (D) Curva ROC obtida com os features selecionados (VIP) pelo modelo OPLS-DA; (E) Acurácia de predição de 51,7%; (F) Loadings dos metabólitos discriminantes. Em T3 vs CTRL, PLS-DA apresentou má capacidade de predição ($Q^2 = -0,21$), com p valor do teste de permutação foi maior o que 0.05 (p -valor = 0,98). No sPLS-DA, o erro de classificação foi de 42,1% ($ncomp=1$). Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

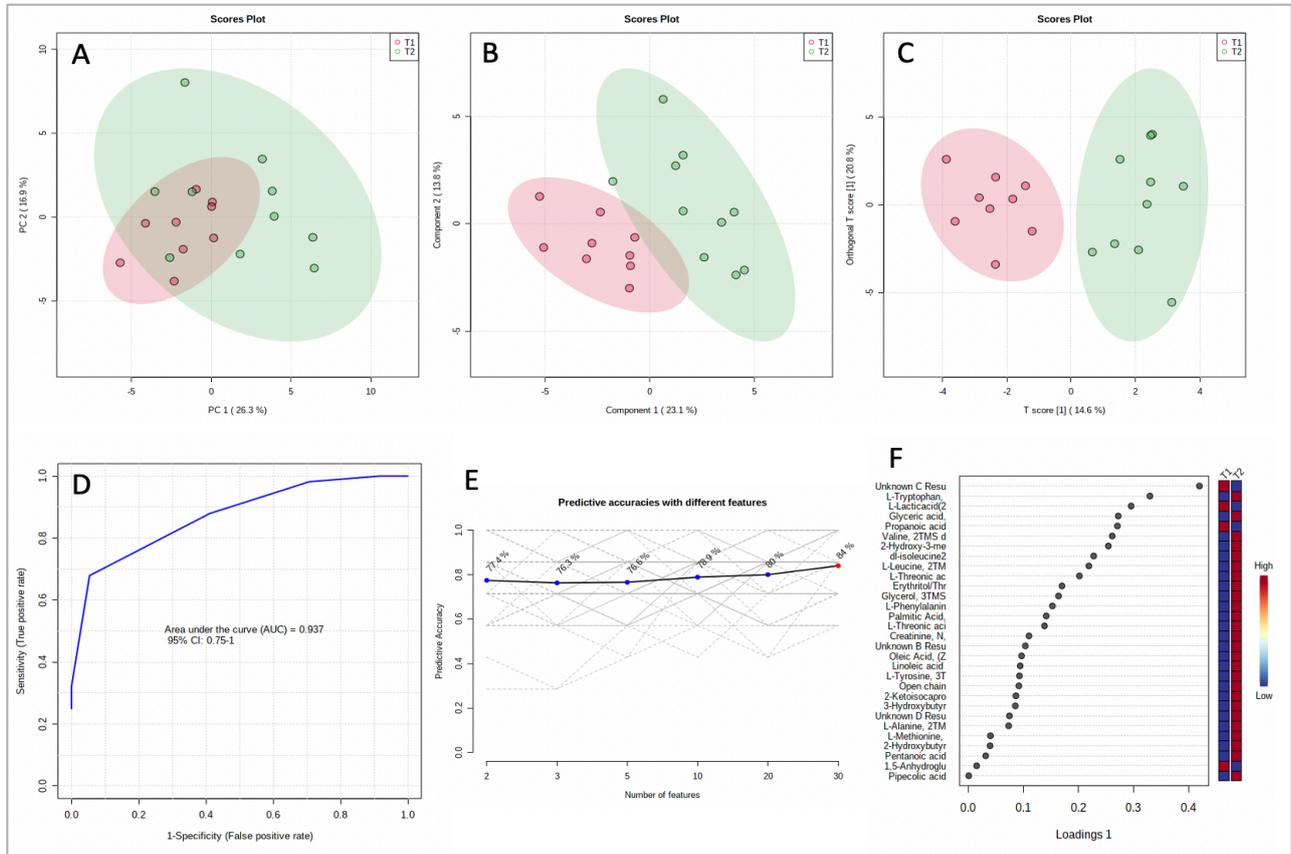


Figura Supl. 5. Gráficos de escores do Tercil 1 de Leaman (T1) vs Tercil 2 de Leaman (T2). (A) PCA; (B) PLS-DA; (C) oPLS-DA; (D) Curva ROC obtida com os features selecionados (VIP) pelo modelo OPLS-DA; (E) Acurácia de predição de 84%; (F) Loadings dos metabólitos discriminantes. Em T1 vs T2, PLS-DA apresentou modelo com $R^2 = 0,88$, $Q^2 = 0,40$ e p valor do teste de permutação foi maior o que 0.05 (p -valor = 0,66). No oPLS-DA, $R^2 = 0,88$, $Q^2 = 0,331$ e p -valor igual a 0,05. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

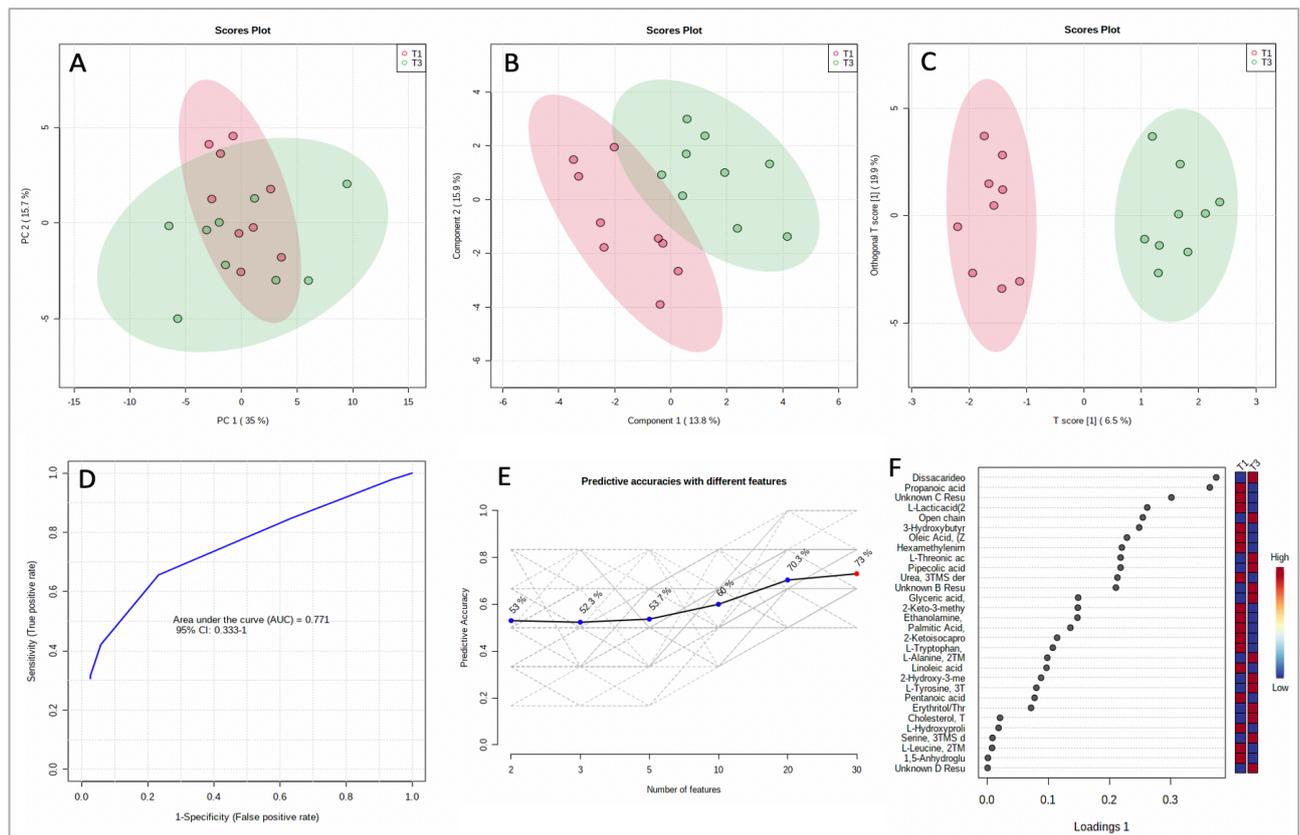


Figura Supl. 6. Gráficos de escores do Tercil 1 de Leaman (T1) vs Tercil 3 de Leaman (T3). (A) PCA; (B) PLS-DA; (C) oPLS-DA; (D) Curva ROC obtida com os features selecionados (VIP) pelo modelo OPLS-DA; (E) Acurácia de predição de 73%; (F) Loadings dos metabólitos discriminantes. Em T1 vs T3, PLS-DA apresentou modelo com $R^2 = 0,95$, $Q^2 = 0,26$ e p valor do teste de permutação foi maior o que 0.05 (p -valor = 0,9). No oPLS-DA, $R^2 = 0,95$, $Q^2 = 0,28$ e p -valor igual a 0,08. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

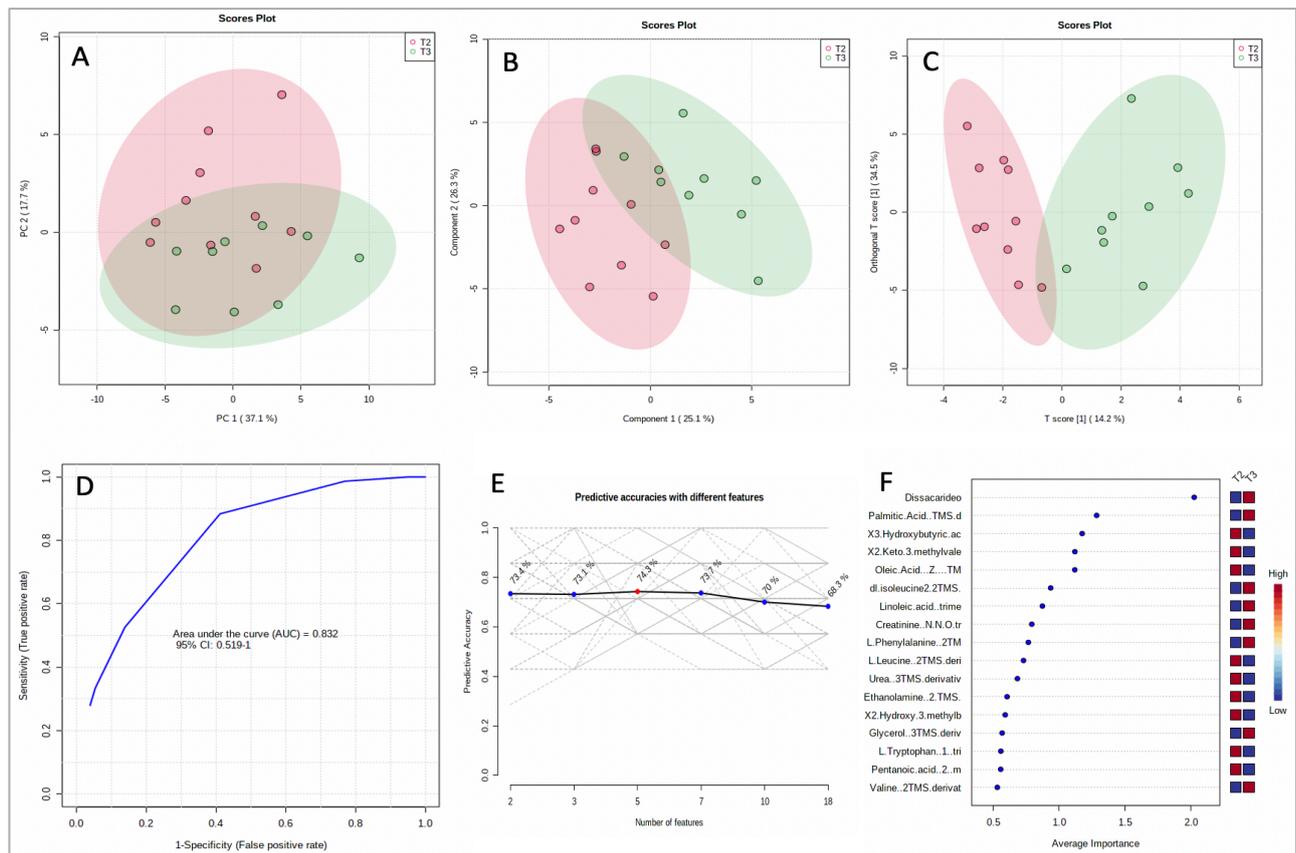


Figura Supl. 7. Gráficos de escores do Tercil 2 de Leaman (T2) vs Tercil 3 de Leaman (T3). (A) PCA; (B) PLS-DA; (C) oPLS-DA; (D) Curva ROC obtida com os features selecionados (VIP) pelo modelo OPLS-DA; (E) Acurácia de predição de 68,3%; (F) Loadings dos metabólitos discriminantes. Em T2 vs T3, PLS-DA apresentou modelo com $R^2 = 0,95$, $Q^2 = 0,63$ e p valor do teste de permutação foi maior o que 0.05 (p -valor = 0,16). No oPLS-DA, $R^2 = 0,97$, $Q^2 = 0,61$ e p -valor igual a 0,003. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

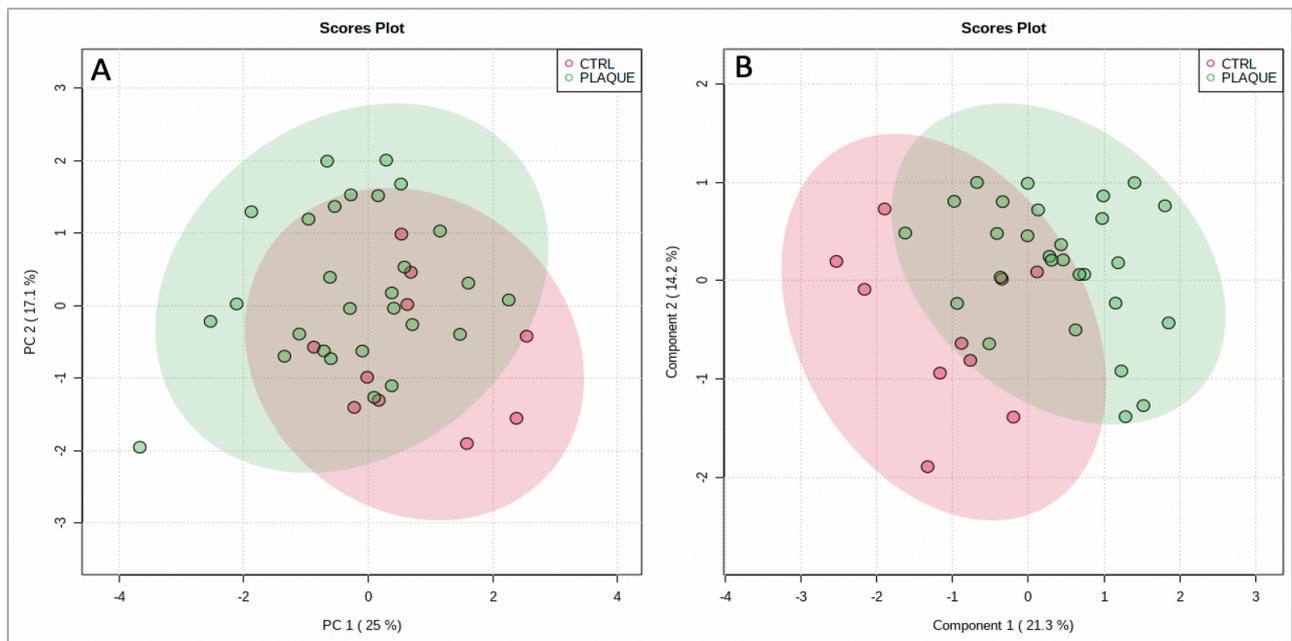


Figura Supl. 8. Análise de PCA e PLS-DA de pacientes com placa e controle (CTRL). A porcentagem de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção plotada e as regiões elípticas correspondem ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada ponto no gráfico corresponde a um paciente ou amostra. No PLS-DA, $Q^2 = -0.13$, $R^2 = 0.69$ e o p valor do teste de permutação > 0.05 , mostrando que o modelo não foi validado. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

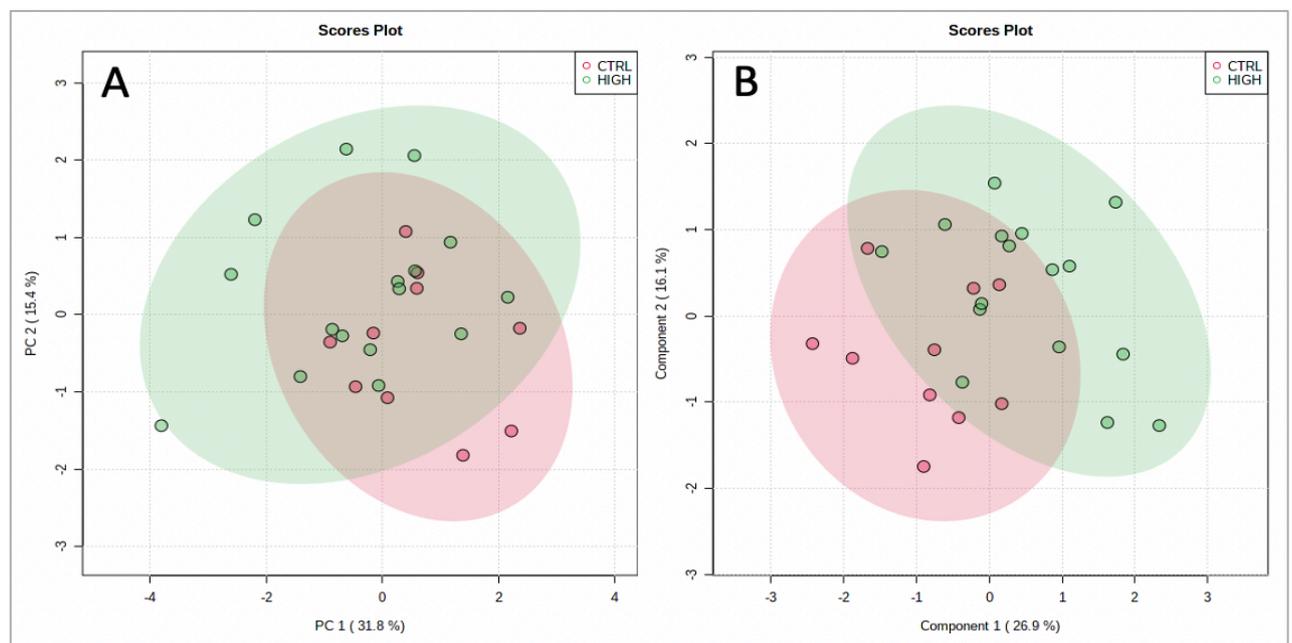


Figura Supl. 9. Análise de PCA e PLS-DA de pacientes com Alto CT-LeSc (HIGH) e controle (CTRL). A porcentagem de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção plotada e as regiões elípticas correspondem ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada ponto no gráfico corresponde a um paciente ou amostra. No PLS-DA, $Q^2 = -0.3$, $R^2 = 0.62$ e o p valor do teste de permutação > 0.05 , mostrando que o modelo não foi validado. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

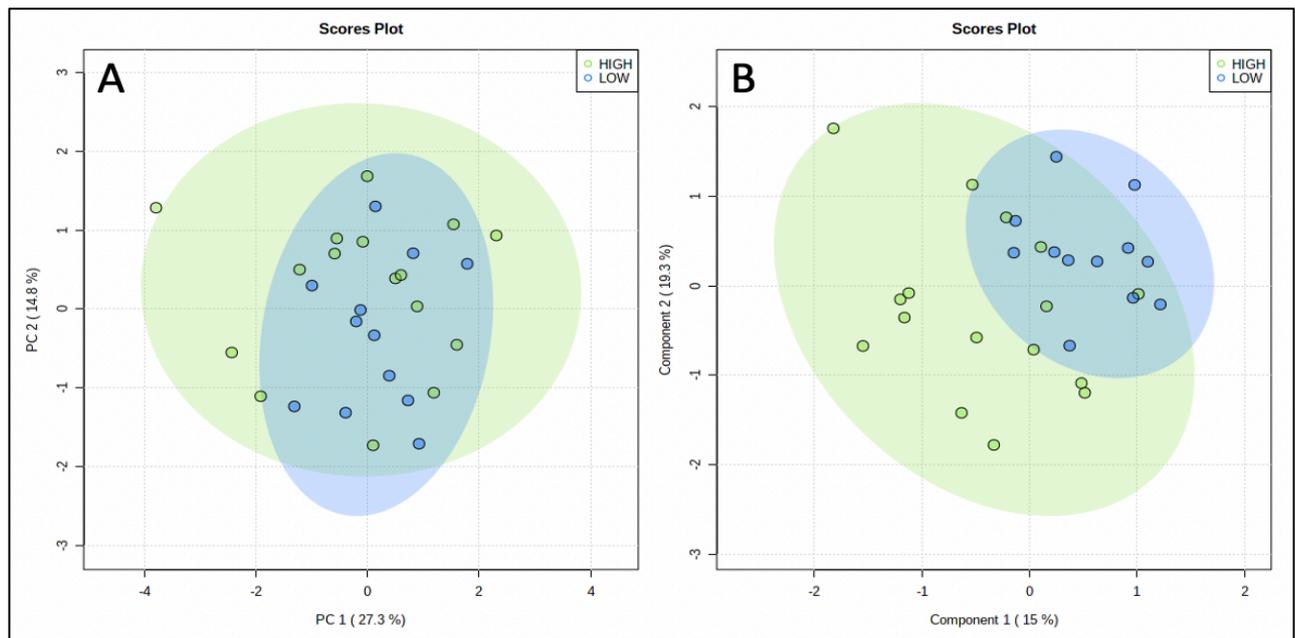


Figura Supl. 10. Análise de PCA e PLS-DA de pacientes com Alto CT-LeSc (HIGH) e Baixo CT-LeSc (LOW). A porcentagem de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção plotada e as regiões elípticas correspondem ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada ponto no gráfico corresponde a um paciente ou amostra. No PLS-DA, $Q^2 = -0,7$, $R^2 = 0,64$ e o p valor do teste de permutação $> 0,05$, mostrando que o modelo não foi validado. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

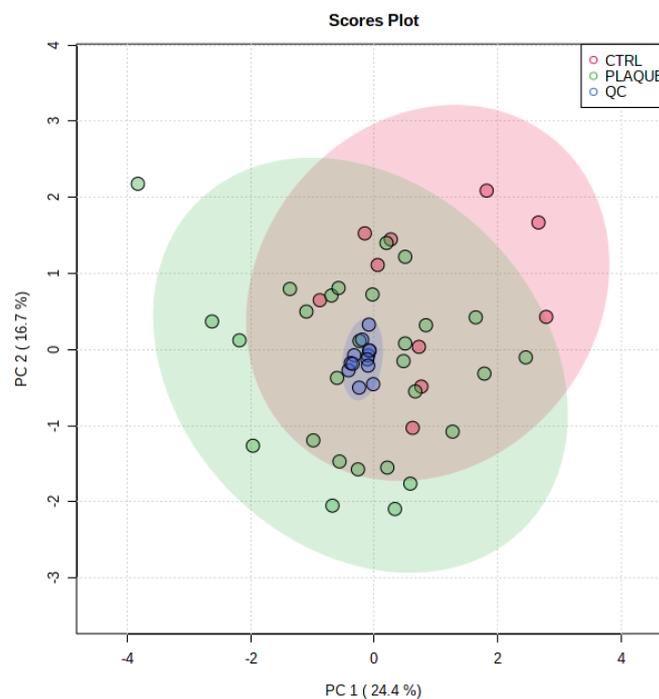


Figura Supl. 11. Análise de PCA das amostras do QC. O eixo X é PC1 e o eixo Y é PC2. Os círculos azuis no centro do plot representam as amostras do QC, indicando boa reprodutibilidade do processamento da amostra e do sistema instrumental. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

Composto	T3 vs T1 P-valor [% variação]	T2 vs T1 P-valor [% variação]	T2 vs CTRL P-valor [% variação]	T1 vs CTRL P-valor [% variação]
Unknown C	-	0.003 [-45.8]	-	-
Propanoic acid	-	0.02 [51.7]	-	-
Threonic acid	0.01 [32.3]	-	-	-
Proline	-	-	-	0.05 [-40.9]
Oleic acid	-	-	0.02 [115.0]	-

Figura Supl. 12. Metabólitos discriminantes na análise univariada pelo teste T de Student. Apenas os compostos que apresentaram diferença estatística são mostrados. Na análise univariada, nosso estudo mostrou que o ácido oleico foi um metabólito discriminante ($T2 > CTRL$, $p = 0,02$), assim como na análise multivariada também tinha sido discriminador ($T1 > CTRL$), conforme discutido previamente. A prolina é um aminoácido não essencial sintetizado pelo ácido glutâmico, responsável por aproximadamente 10% do total de aminoácidos do colágeno. Nosso estudo mostrou que este metabólito foi mais encontrado no grupo controle comparado ao grupo T1 ($p = 0,05$). Há descrição na literatura que corrobora este achado. Wang et al. documentaram que a prolina alivia o estresse oxidativo e a apoptose de cardiomiócitos induzida por IAM, além de melhorar o remodelamento cardíaco (WANG et al., 2020). É descrito que o triptofano tem seu aumento de degradação associado à inflamação. A depleção deste aminoácido essencial está associado à aterosclerose, doença que tem a inflamação como sua parte integral (NITZ; LACY; ATZLER, 2019; WIRLEITNER et al., 2003). Interessantemente, na análise univariada nenhum metabólito foi identificado na comparação entre os extremos do fenótipo (T3 vs CTRL), demonstrando a importância de se complementar as informações obtidas e trabalhar com mais de uma técnica para alcançar uma cobertura mais ampla do metaboloma. Isso é particularmente importante no estudo da aterosclerose, que tem nos lipídios não avaliados por GC um papel fundamental em sua gênese.

9. Referências

ANDREINI, D. et al. Long-term prognostic impact of CT-Leaman score in patients with non-obstructive CAD: Results from the COronary CT Angiography Evaluation For Clinical Outcomes InteRnational Multicenter (CONFIRM) study. **Intern Jour of Cardiol**, v.231, p.18–25, 2017.

BERNSTEIN, A. M. et al. First autopsy study of an Okinawan centenarian: Absence of many age-related diseases. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 59, n. 11, p. 1195–1199, 2004.

BHATTACHARYA, S; GRANGER, CB; CRAIG, D, et al. Validation of the association between a branched chain amino acid metabolite profile and extremes of coronary artery disease in patients referred for cardiac catheterization. **Atherosclerosis**. 2014;232(1):191-196.

CHEN, J; ZHANG, S; WU, J; WU, S; XU, G; WEI, D. Essential role of nonessential amino acid glutamine in atherosclerotic cardiovascular disease. **DNA Cell Biol**. 2020;39(1):8-15.

CHENG, S. et al. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. **Circulation**, v. 125, n. 18, p. 2222–2231, 2012.

DEIDDA, M; NOTO, A; CADEDDU, DC, et al. Why do high-risk patients develop or not develop coronary artery disease? Metabolic insights from the CAPIRE study. **Metabolites**. 2022;12(2):123.

ÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227–36, 2001.

ERGALLO, R.; CREA, F. Atherosclerotic Plaque Healing. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 9, p. 846–857, 2020.

FIEHN, O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling. **Curr Protoc Mol Biol**. 2016;114(1):30.4.1-30.4.32.

GARCIA, A., Barbas, C. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Based Metabolomics In. Metz, T. O. (Ed.). **Metabolic Profiling: Methods in Molecular Biology**. Nova York: Humana Press Inc., 191, 2011.

HARTMANN, R; LICKS, F; SCHEMITT, EG, et al.. Effect of glutamine on liver injuries induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. **Nutr Hosp**. 2017;34(3):548.

HARVEY, KA; WALKER, CL; PAVLINA, TM; XU, Z; ZALOGA, GP; SIDDIQUI, RA. Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth. **Clin Nutr**. 2010;29(4):492-500.

HEIKAL, L; STARR, A; HUSSEIN, et al. L-phenylalanine restores vascular function in spontaneously hypertensive rats through activation of the GCH1-GFRP complex. **JACC Basic to Transl Sci.** 2018;3(3):366-377.

JHA, AK; HUANG, SCC; SERGUSHICHEV, A, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. **Immunity.** 2015;42(3):419-430.

KARAVAY, PA; NEFYODOV, LI; KARAVAY, NL. Amino acid imbalance in atherosclerosis. Ajayi G, ed. **Int J Nutr.** 2020;5(2):15-23.

KITSON, F. et al. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry - A Practical Guide*, Academic: London, 1996.

LIBBY, P. Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 21, p. 2004–2013, 2013.

LYNCH CJ, ADAMS SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. **Nat Rev Endocrinol.** 2014;10(12):723-736.

MAS, S. et al. Local non-esterified fatty acids correlate with inflammation in atheroma plaques of patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 6, p. 1292–1301, 2010.

MATHEW, OP; RANGANNA, K; YATSU, FM; Butyrate, an HDAC inhibitor, stimulates interplay between different posttranslational modifications of histone H3 and differently alters G1-specific cell cycle proteins in vascular smooth muscle cells. **Biomed Pharmacother.** 2010;64(10):733-740.

NITZ, K.; LACY, M.; ATZLER, D. Amino acids and their metabolism in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 3, p. 319–330, 2019.

OLIVERAS, T; LÁZARO, I; RUEDA, F, et al. Circulating linoleic acid at the time of myocardial infarction and risk of primary ventricular fibrillation. **Sci Rep.** 2022;12(1):4377.

PERDOMO, L; BENEIT, N; OTERO, YF, et al. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. **Cardiovasc Diabetol.** 2015;14(1):75.

PRIYADARSINI, S; MCKAY, TB, SARKER-NAG, A, et al. Complete metabolome and lipidome analysis reveals novel biomarkers in the human diabetic corneal stroma. **Exp Eye Res.** 2016;153:90-100.

RAZQUIN, C; RUIZ-CANELA, M; CLISH, CB, et al. Lysine pathway metabolites and the risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in the PREDIMED study: results from two case-cohort studies. **Cardiovasc Diabetol.** 2019;18(1):151.

REDÍGOLO, M.M.; Costa, I.; Vega, O. “Cadernos de ciência da conservação Volume 1. Tintas brasileiras”. Ed. Scortecci. 1ª Ed. 2002.

SELVIN, E; RAWLINGS, A; LUTSEY, P, et al. Association of 1,5-anhydroglucitol with cardiovascular disease and mortality. **Diabetes**. 2016;65(1):201-208.

SHAH, S. H. et al. Baseline metabolomic profiles predict cardiovascular events in patients at risk for coronary artery disease. **American Heart Journal**, v. 163, n. 5, p. 844- 850.e1, 2012.

SHAH, S. H. et al. High heritability of metabolomic profiles in families burdened with premature cardiovascular disease. **Molecular Systems Biology**, v. 5, n. 258, 2009.

SHAH, S. H.; KRAUS, W. E.; NEWGARD, C. B. Metabolomic profiling for the identification of novel biomarkers and mechanisms related to common cardiovascular diseases form and function. **Circulation**, v. 126, n. 9, p. 1110–1120, 2012.

SHAH, SH; BBAIN, JR; MUEHLBAUER, MJ, et al. Association of a peripheral blood metabolic profile with coronary artery disease and risk of subsequent cardiovascular events. **Circ Cardiovasc Genet**. 2010;3(2):207-214.

SHEN, H; EGUCHI, K; KONO, N, et al. Saturated fatty acid palmitate aggravates neointima formation by promoting smooth muscle phenotypic modulation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2013;33(11):2596-2607.

STEFFEN, B. T. et al. Circulating oleic acid levels are related to greater risks of cardiovascular events and all-cause mortality: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 12, n. 6, p. 1404–1412, 2018.

SUGIMOTO, M. et al. Bioinformatics tools for mass spectrometry-based metabolomic data processing and analysis. **Current Bioinformatics**, n. 7, p. 96–108, 2012.

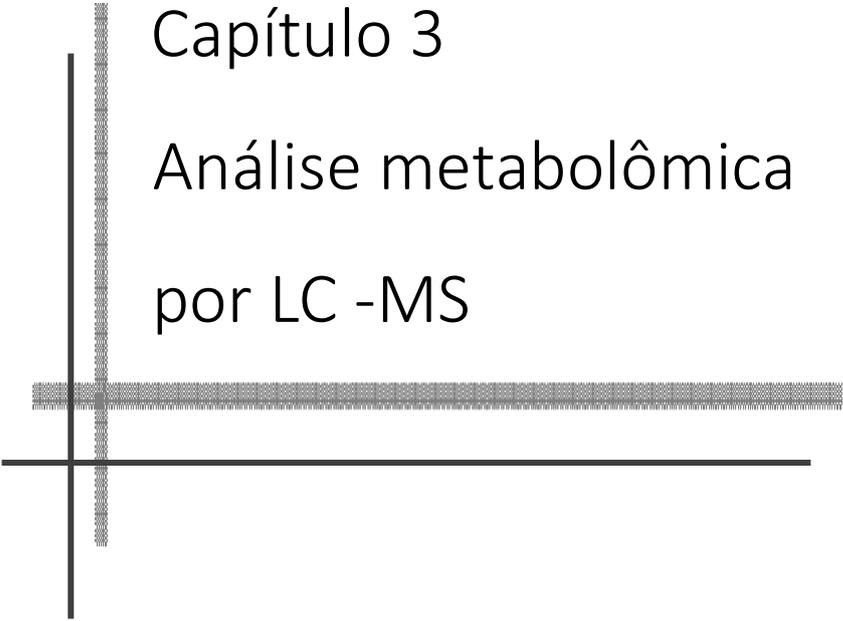
SUN, Y. et al. Plasma fatty acids, oxylipins, and risk of myocardial infarction: The Singapore Chinese Health Study. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 7, p. 1300–1307, 2016.

SUNNY, N. E. et al. Cross-talk between branched-chain amino acids and hepatic mitochondria is compromised in nonalcoholic fatty liver disease. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 309, n. 4, p. E311–E319, 2015.

TAVAKOLI, S; DOWNS, K; SHORT, JD, et al. Characterization of macrophage polarization states using combined measurement of 2-deoxyglucose and glutamine accumulation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2017;37(10):1840-1848.

TZOULAKI, I; CASTAGNÉ, R; BOULANGÉ, CL, et al. Serum metabolic signatures of coronary and carotid atherosclerosis and subsequent cardiovascular disease. **Eur Heart J**. 2019;40(34):2883-2896.

- VALLEJO, M. et al. Plasma fingerprinting with GC-MS in acute coronary syndrome. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 6, p. 1517–1524, 2009.
- VAN DER POL, A; GIL, A; SILLJÉ, HHW, et al. Accumulation of 5-oxoproline in myocardial dysfunction and the protective effects of OPLAH. **Sci Transl Med**. 2017;9(415):eaam8574.
- WANG, J. et al. Proline improves cardiac remodeling following myocardial infarction and attenuates cardiomyocyte apoptosis via redox regulation. **Biochemical Pharmacology**, v. 178, p. 114065, 2020.
- WARREN, B; LEE, AK; BALLANTYNE, C, et al. Associations of 1,5-anhydroglucitol and 2-hour glucose with major clinical outcomes in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **J Appl Lab Med**. 2020;5(6):1296-1306.
- WATERMAN, C. L.; KIAN-KAI, C.; GRIFFIN, J. L. Metabolomic strategies to study lipotoxicity in cardiovascular disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 3, p. 230–234, 2010.
- WIRLEITNER, B. et al. Immune activation and degradation of tryptophan in coronary heart disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, n. 7, p. 550–554, 2003.
- WU, P-H, CHIU, Y-W; ZOU, H-B, et al. Exploring the benefit of 2-methylbutyric acid in patients undergoing hemodialysis using a cardiovascular proteomics approach. **Nutrients**. 2019;11(12):3033.
- YANG, R; DONG, J, ZHAO H, et al. Association of branched-chain amino acids with carotid intima-media thickness and coronary artery disease risk factors. Zhang Y, ed. **PLoS One**. 2014;9(6):e99598.
- YOON M-S. The emerging role of branched-chain amino acids in insulin resistance and metabolism. **Nutrients**. 2016;8(7):405.
- ZARIC, BL; RADOVANOVIC, JN; GLUVIC Z, et al. Atherosclerosis linked to aberrant amino acid metabolism and immunosuppressive amino acid catabolizing enzymes. **Front Immunol**. 2020;11:551758.



Capítulo 3

Análise metabolômica por LC -MS

“A verdade é raramente pura, e nunca é simples”

Oscar Wild

1. Uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) na prospecção de biomarcadores de aterosclerose coronariana

Os fundamentos que respaldam a realização deste projeto com metabolômica utilizando a técnica de LC-MS (do inglês, *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*) justificam-se pela proposição e magnitude do assunto em questão. No contexto da prevenção da doença cardiovascular mais prevalente no mundo, direcionado para o grupo de risco intermediário que é a categoria mais heterogênea cujo manejo clínico é desafiador e incerto, este projeto busca, em síntese, a resposta a uma pergunta: seria uma boa estratégia avaliar o risco de DAC através de dados moleculares usando a metabolômica acoplada aos dados angiotomográficos do escore CT-LeSc?

Já debatida no capítulo 1, a escolha por utilizar o CT-LeSc se justifica por ser uma técnica não invasiva que bem caracteriza a carga aterosclerótica da árvore coronariana, mais robusta e refinada do que a simplista caracterização da placa quanto à presença ou ausência de cálcio (placas calcificadas vs placas não calcificadas). Corroborando ainda mais esta escolha, o CT-LeSc foi recentemente validado como um independente preditor prognóstico de eventos cardiovasculares a longo prazo, discriminando, com mais acurácia e de forma quantitativa, a carga aterosclerótica total em relação à vulnerabilidade da placa (ANDREINI et al., 2017).

A escolha de se estudar lipidômica por LC-MS, por sua vez, se justifica pelos lipídios terem papel chave na fisiopatologia da aterosclerose e por esta técnica ser capaz de identificar centenas de diferentes espécies lipídicas moleculares com vários papéis estruturais e funcionais. A perspectiva é de que este modelo translacional, que acopla a análise de candidatos a biomarcadores associada à detalhada avaliação anatômica da árvore coronariana, possa aprofundar o conhecimento atual da aterosclerose em um nível de detalhe não atingível com os métodos analíticos clássicos, objetivando, em última análise, à predição mais acurada do risco de desenvolvimento desta doença tão prevalente e complexa.

É notório que os lipídios desempenham um papel central na aterosclerose. Acredita-se que a dislipidemia e a aterosclerose resultante derivem do desequilíbrio dos metabólitos lipídicos no organismo afetado. Apesar da implementação bem-sucedida de estratégias baseadas em evidências para redução de risco de eventos cardiovasculares, muitos indivíduos não são devidamente identificados antes de seu primeiro evento ou continuam a experimentar desfechos sintomáticos, apesar de níveis “ótimos” de CT e LDL, sabidamente estabelecidos como fatores de risco para aterosclerose e suas complicações. Assim, embora estejamos acostumados a pensar em lipídios no contexto da aterosclerose como LDL, esta é uma grande simplificação, porque vários

pacientes com DAC apresentam níveis de LDL dentro da faixa recomendada, sugerindo a necessidade de medidas diagnósticas adicionais de risco (ROSENSON, 2010).

A fração lipídica do plasma sanguíneo tem um efeito profundo no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, uma evidência de que os metabólitos aquosos *in vivo* também têm um papel no acompanhamento dos efeitos do IAM e no monitoramento do desenvolvimento da aterosclerose. Avanços recentes em química analítica e biologia molecular prepararam o terreno para o perfil de metabólitos nos ajudar a entender processos moleculares complexos e fisiologia.

A lipidômica, ramo da metabolômica, é uma ferramenta que pode ser usada para diferenciar pacientes com base em seus perfis moleculares de lipídios (EKROOS et al., 2010). Como um fenótipo intermediário, as assinaturas de metabólitos capturam um aspecto único da dinâmica celular que não é tipicamente interrogado, fornecendo uma perspectiva distinta sobre a homeostase celular.

Usar LC-MS para abordagem da lipidômica em DCV tem muito respaldo na literatura. O número de estudos sobre este tema está crescendo rapidamente e a busca por novos biomarcadores para prever a progressão e o prognóstico das DCV usando esta técnica é uma realidade (Figura 36).

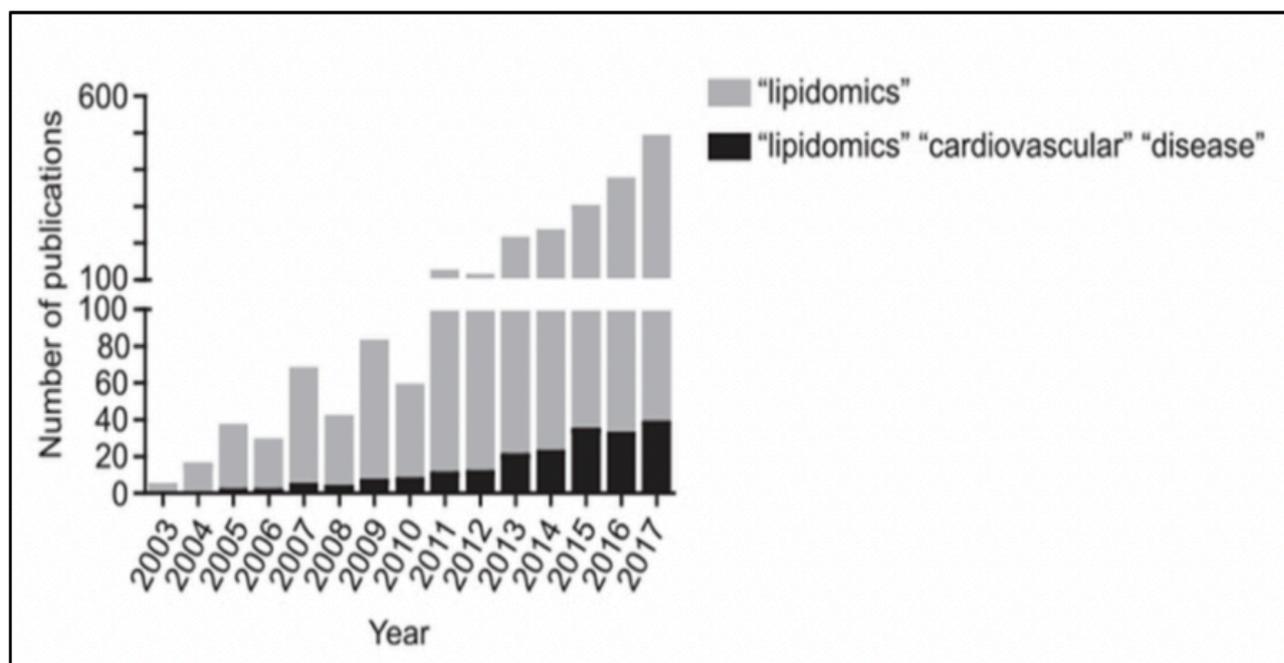


Figura 36. Expansão rápida da lipidômica na pesquisa de DCV. O histograma representa o número de publicações usando lipidômica. Os números foram obtidos usando "lipidomics" ou "lipidomics cardiovascular disease" como termo de busca no PubMed (modificado de KOHNO et al., 2018).

Por meio da técnica de LC-MS várias classes de lipídios foram propostas como biomarcadores úteis para prever a DCV incidente (KOHNO et al., 2018). Em 2011, Meikle relatou diferenças nos lipídios do plasma entre pacientes com DAC instável e estável, e entre aqueles com DAC estável e indivíduos saudáveis controle usando exatamente a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS, do inglês *High Performance Liquid Chromatographic-Mass Spectrometry*) (MEIKLE et al., 2011).

Lu *et al.* realizaram uma análise metabolômica abrangente em amostras de plasma humano de 28 indivíduos humanos com angina estável, IAM ou controles saudáveis (LU et al., 2017). A metabolômica com amostras de plasma demonstrou que 36 metabólitos estavam associados ao IAM. Os autores também realizaram a extração de lipídios do plasma seguida por LC-MS/MS. Esta análise revelou que os lipídios associados às vias de peroxidação lipídica, incluindo fosfolipídio oxidado e isoprostanos, e isômeros de prostaglandinas, estavam significativamente elevados no plasma de pacientes com IAM. Esses resultados sugerem que a oxidação lipídica é uma característica única ou um mecanismo patológico associado à DCV incidente.

Turer *et al.* examinaram o uso de substrato miocárdico em uma coorte de 37 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca, estratificada pela presença de DAC e disfunção ventricular esquerda (TURER et al., 2009). Eles realizaram perfis metabólicos usando LC-MS/MS para medir 63 metabólitos em amostras de plasma emparelhadas (artéria periférica e seio coronário). Os autores observaram supressão significativa da captação de combustível pelo miocárdio nos pacientes com função ventricular prejudicada no início do estudo e após isquemia/reperfusão. Tomados em conjunto, estes estudos destacam a importância do metabolismo energético do miocárdio na doença isquêmica coronariana e apontam para novos caminhos de pesquisa.

Um sumário dos principais estudos em doenças cardiovasculares utilizando lipidômica e LC-MS encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Compilação de trabalhos com abordagem lipidômica e LC-MS.

SUMÁRIO DE ESTUDOS DE LIPIDÔMICA COM LC-MS EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES				
DOENÇA/ESTUDO	Amostra (número)	Método	Maiores achados	Referências
DAC	Plasma (220)	LC-MS/MS	10 espécies de PE foram negativamente associadas com DAC instável	Meikle et al. 2011
DCV INCIDENTE	Plasma (685)	Shotgun-MS/MS	TG-54:2, CE-16:1, e PC-36:5 foram consistentemente relacionados à DCV incidente	Stegemann et al. 2014
DCV INCIDENTE	Plasma (3668)	LC-TOF-MS	LPC-18:1, LPC-18:2, e SM-28:1 foram positivamente associados à DCV incidente	Ganna et al. 2014
DCV INCIDENTE	Soro (8101)	LC-MS/MS	CM-d18:1 / 18:0 tiveram forte associação com DCV incidente	Havulinna et al. 2016
DAC	HDL (67)	LC-MS/MS	PC-33:3 associada a HDL, PC-35:2, e PC-34:2 foram mais baixos em DAC	Sutter et al. 2015
DCV INCIDENTE EM DIABÉTICOS TIPO 2	Plasma (3154)	LC-ESI-MS/MS	Adição de 7 espécies lipídicas além dos fatores de risco tradicionais melhorou a predição de DCV incidente	Alshehry et al. 2017
IAM	Plasma (28)	LC-ESI-MS/MS	Rotas de peroxidação lipídica incluindo oxPL e isoprostanos, isômeros de prostaglandinas, foram elevados no IAM	Lu et al. 2017
DCV INCIDENTE	Plasma (688)	LC-MRM MS/MS	Lipoproteínas ricas em TG com positiva correlação com risco DCV	Pechlaner et al. 2017
ATEROSCLEROSE	Placas (26)	Shotgun-MS/MS	24 espécies lipídicas foram identificadas nas placas	Stegemann et al. 2011
DAC CALCIFICADA	Soro (70)	LC-MS	Metabolismo de PC e SM foram desregulados em DAC calcificada	Vorkas et al. 2015
ATEROSCLEROSE	Soro (124)	LC-FIA-MS/MS	PC-diacil-28:1, PC-diacil-30:0, PC-diacil-32:2, LPC-aciL-18:2 foram associados com aterosclerose	Paapstel et al. 2017
RISCO DCV EM JOVENS	Soro (990)	LC-ESI-MS	PC-16:0/2:0 foi negativamente associada e PC-14:1/0:0 positivamente associada a fatores de risco CV.	Syme et al. 2016

DAC: doença arterial coronariana; DCV: doença cardiovascular; IAM: infarto agudo do miocárdio; LC: cromatografia líquida; MS: espectrometria de massas; MS/MS: espectrometria de massas in tandem; TOF: time of flight (tempo de voo); MRM: monitoramento de reações múltipla; LC-ESI-MS/MS: espectrometria de massas in tandem com ionização por eletrospray; LC-FIA-MS/MS: espectrometria de massa in tandem por análise de injeção de fluxo (modificado de KOHNO et al., 2018).

De nosso conhecimento, este estudo é pioneiro em correlacionar achados metabólicos por LC-MS com dados da CCTA usando o CT-LeSc adaptado em pacientes assintomáticos de risco intermediário de Framingham.

2. A técnica LC-MS

A LC-MS apresenta-se como uma ferramenta muito versátil para realizar a maioria das tarefas de análise em estudos de perfis metabólicos, apresentando alta robustez, sensibilidade e seletividade, sendo de fácil operação (LI; LEGIDO-QUIGLEY, 2008). Atualmente, é a técnica analítica mais empregada em metabolômica devido à sua habilidade em separar e detectar uma grande faixa de moléculas, permitindo a identificação por elucidação estrutural por MS e quantificação dos analitos de interesse (na ordem de $\text{pg} \times \text{mL}^{-1}$) (THEODORIDIS et al., 2012). Outra vantagem é sua compatibilidade com os solventes extratores utilizados, sendo necessário pouco preparo das amostras. Em contrapartida, maiores volumes de solventes são gastos, em comparação com outras técnicas de separação, além de longos períodos de condicionamento das colunas cromatográficas.

Resumidamente, LC é uma técnica de separação, em fase líquida, de misturas complexas, porém dificilmente fornece a identificação positiva de componentes individuais, enquanto MS é uma técnica que auxilia na elucidação estrutural de compostos em fase gasosa, porém dificilmente é apropriado para a análise de misturas. LC opera em fase líquida e MS opera em fase gasosa, sob alto vácuo. Assim, o uso de uma interface é necessário para ter compostos sequencialmente separados em LC e introduzidos para análise no MS (Figura 37).

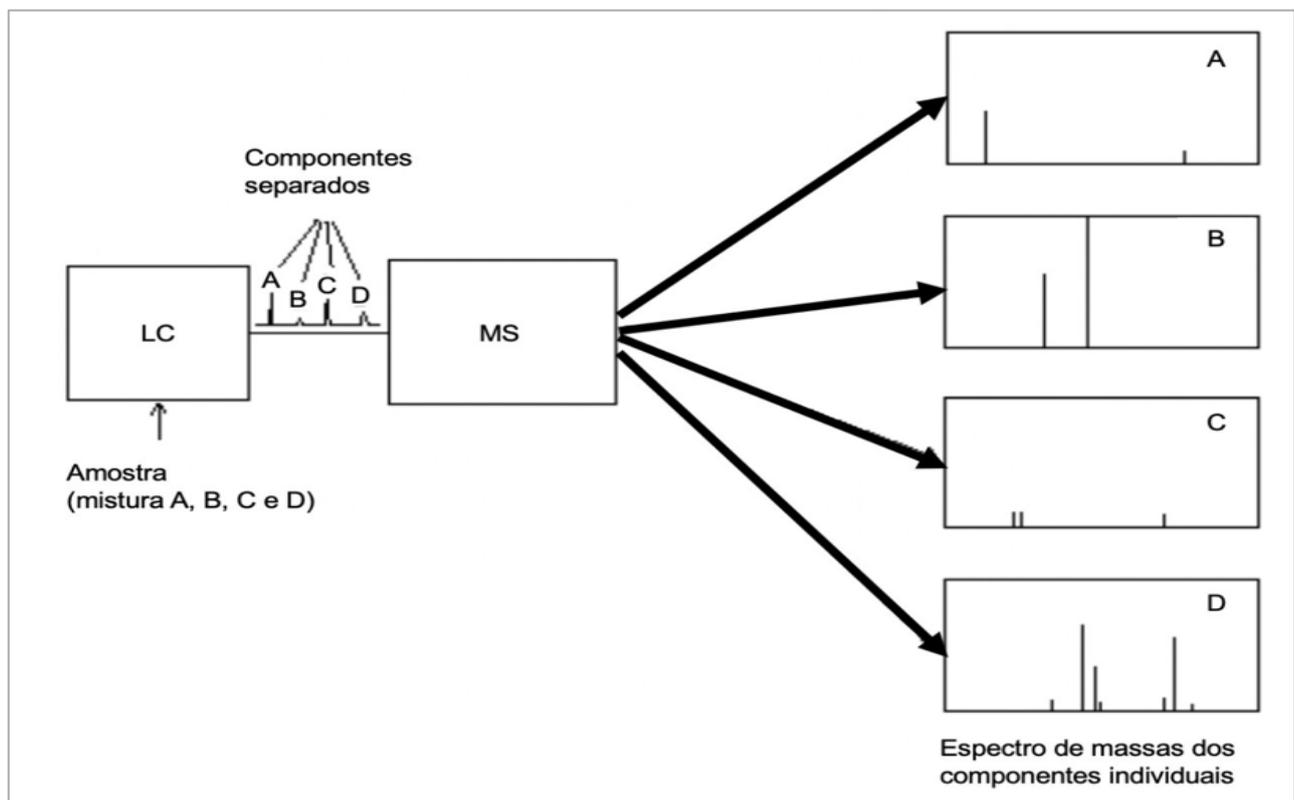


Figura 37. Representação da técnica híbrida LC/MS.

3. Análise metabolômica de amostras de plasma por LC-MS

3.1 Preparo da amostra

Para a extração dos lipídios plasmáticos, foram utilizados os seguintes reagentes: metanol (grau ACS/HPLC), adquirido de Burdick e Jackson (Muskegon, MI, EUA); SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard adquirido da Avanti (Alabama, EUA) e clorofórmio (Sigma Aldrich, MO, EUA). As amostras de plasma foram submetidas ao protocolo de extração de Bligh-Dyer modificado. Em um microtubo de 2 mL, foram adicionados 150 µL de amostra, seguidos de 10 µL de uma mistura de padrões internos (SPLASH® Lipidomix, diluído duas vezes (25 µL/500 µL) em MeOH), 375 µL de clorofórmio e 750 µL de metanol. Essa mistura foi homogeneizada em vórtice por 2 minutos e em seguida seu conteúdo foi dividido em 2 tubos (712 µL em cada). 187,5 µL de clorofórmio e 150 µL de água foram adicionados a cada tubo, agitado em vórtice por 1 minuto e centrifugado a 3000 G por 1 minuto. Após a centrifugação, ocorreu a formação de 2 fases, o que permitiu a identificação e coleta da porção apolar (lipídios) (Fig. 38). Todo o protocolo foi realizado em vidraria de laboratório e nenhum polímero plástico esteve em contato com qualquer parte do experimento. A composição do SPLASH® Lipidomix® Mass Spec Standard adquirido da Avanti está na Fig. Supl. 1.

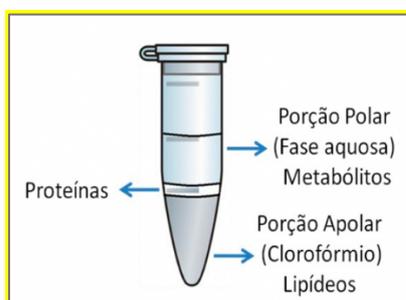


Figura 38. Representação esquemática das porções obtidas com aplicação do protocolo de Bligh-Dyer modificado (1959).

3.2 Preparo da amostra de controle de qualidade

As amostras de CQ foram preparadas a partir de uma mistura de 100 µL de cada amostra apresentada no estudo, seguida de homogeneização em agitador vortex. O tratamento das amostras de QC para injeção foi realizado conforme descrito na seção anterior 3.1.

3.3 Instrumentação e análise

As amostras foram analisadas por um sistema de cromatografia líquida Agilent Technologies 1200 series bomba de alta pressão (equipado com degaseificador, duas bombas binárias e

amostrador automático com controle de temperatura) acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo time-of-flight (Q-TOF, Agilent Technologies 6545). Cinco microlitros (5 mL) de amostra foram injetados em uma coluna de fase reversa (Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,7 µm, 3,0 mm x 10 cm) acoplada a uma pré-coluna (Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,7 µm, 3,0 mm x 5 cm) a 50°C. A bandeja de amostras foi mantida a 4°C. Após cada injeção, a agulha e a porta de injeção foram lavadas por 15 segundos com uma solução de MeOH:IPA (50:50). As fases móveis compostas por MeOH:H₂O (1:9) (Fase A) e ACN:MeOH:IPA (2:3:5) (Fase B), ambas contendo 10 mmol/L de acetato de amônio e 0,2 mmol/L de fluoreto de amônio foram usadas a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. O gradiente utilizado foi de 0-1 min (70% B), 1-3,5 min (70-86% B), 3,5-10 min (86% B), 10-11 min (86-100% B), 11-17 min (100% B), 17-17,1 min (70% B) e 17,1-19 min (70% B). Os experimentos de MS e MS/MS foram realizados nos modos positivo e negativo de ionização por eletrospray (ESI) e realizados na faixa de m/z de 40-1700 a uma velocidade de 3 espectros/segundo. Os parâmetros ESI foram definidos da seguinte forma: temperatura do gás auxiliar (gás de secagem, gás auxiliar): 200°C, vazão. Gás auxiliar: 10 L/min, pressão do nebulizador: 50 psi, temperatura do gás de revestimento (gás de impulso, gás de revestimento): 300°C, fluxo de gás de revestimento: 12 L/min, tensão no capilar: 3500 V, tensão da agulha: 0 V, triturador: 150 V, skimmer: 65V e octopolo: 750 V. Para os experimentos MS/MS, foram aplicadas energias de colisão de 20 eV (modo +) e 25 eV (modo -). Uma solução com massas de referência (purina, HP-0921 e TFANH4) foi continuamente analisada para correção m/z.

3.4 *Worklist* da análise

A *worklist* de análise das amostras por LC-MS ocorreu de maneira similar a análise por GC-MS. Duas amostras de branco foram analisadas, seguido de cinco amostras de QC para equilíbrio do sistema, outra amostra de controle de qualidade (QC de análise) para checar a estabilidade do sistema, seguido por 10 amostras. A cada bloco de 10 amostras, um QC de análise era injetado até que todas as amostras fossem analisadas. Ao final da *worklist*, duas amostras de branco foram novamente analisadas para garantir que não tenha ocorrido acúmulo de analito no sistema.

3.5 Tratamento dos dados

A etapa inicial do tratamento de dados adquiridos por LC-MS compreendeu as etapas de limpeza de ruído de fundo, detecção, extração e deconvolução de entidades moleculares, alinhamento e integração dos picos, e foram realizados no software MassHunter Profinder (B.08.00, Agilent Technologies) utilizando o algoritmo *Recursive Molecular Extraction*. A extração e deconvolução dos picos constituiu uma etapa fundamental no tratamento dos dados, pois diminuiu a complexidade dos dados adquiridos através da remoção de informações redundantes e não

específicas, identificando *features* importantes associados aos dados. Seguidamente, os picos foram alinhados em todas as amostras a partir do *Total Ion Chromatogram* (TIC), que mostra a soma de todas as intensidades de sinal por espectro *versus* tempo de retenção. Para avaliar os possíveis picos que representam os padrões internos, listamos aqui todos os compostos utilizados e os possíveis adutos de acordo com cada polaridade. Como padrão interno, Splash Lipidomix da Avanti Polar Lipids foi usado. Essa solução é formada por uma mistura de 14 compostos deuterados, todos de diferentes classes lipídicas (Fig. Supl. 13). Finalmente, a massa mediana, o tempo de retenção mediano e o espectro composto calculado a partir dos *features* alinhados foram utilizados para garantir a confiabilidade das entidades moleculares localizadas e integradas. Após a utilização do recurso automático, a integração de cada *molecular feature* identificado foi checada e corrigida manualmente. Uma tabela contendo a massa exata média, tempo de retenção médio e a área de cada metabólito foi então exportada para tratamento antes de se proceder a análise estatística. Nesse estágio, as áreas médias dos brancos de cada analito e/ou entidade molecular foram subtraídas de cada analito presente nas amostras. Somente as entidades moleculares que estavam presentes em pelo menos 50% das amostras de cada grupo e que apresentaram coeficiente de variação no QC menor que 30% foram mantidas para análise estatística.

Inicialmente, a matriz de dados foi conduzida a análise multivariada não supervisionada (PCA, análise de componentes principais) de modo a avaliar a qualidade dos dados adquiridos. Para encontrar os metabólitos discriminantes entre os grupos, análise multivariada supervisionada (PLS-DA, análise discriminante por mínimos quadrados parciais e sPLS-DA, análise discriminante por mínimos quadrados parciais esparso) foi realizada. Essas análises foram conduzidas na plataforma online Metaboanalyst 4.0. Análises univariada também foram realizadas de modo a avaliar individualmente os metabólitos discriminantes entre os grupos. Inicialmente, os dados foram testados para normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Dados com distribuição normal (paramétrico) foram então testados para heterocedasticidade (teste F) e uma análise de variância (ANOVA) apropriada foi realizada de modo a avaliar a diferença entre os grupos. Dados não paramétricos foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis (KW). Finalmente, testes *post hoc* foram conduzidos de modo a avaliar todas as diferentes combinações pareadas de grupos estudados e encontrar onde as possíveis diferenças residem. Testes *post hoc* de Tukey e de Dunn foram empregados para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. As análises univariada foram realizadas na plataforma R utilizando um script *in-house*.

3. Resultados

Para avaliar a estabilidade analítica e a qualidade dos dados adquiridos foi realizada uma análise multivariada de componentes principais (PCA). Trata-se de um método de visualização de dados que nos permite simplificar o conjunto de dados reduzindo o número de características. Em outras palavras, o PCA identifica um pequeno conjunto de dimensões informativas que capturam a maior parte da variabilidade do conjunto de dados, visando melhor descrevê-lo com o menor número de recursos, sem perder nenhuma informação. Neste modelo, as amostras foram normalizadas pela mediana, os dados foram log transformados e um escalonamento pareto foi realizado, com remoção de *molecular features* (MF) que tinham RSD (do inglês, *relative standard deviation*) em QC > 30% e que apresentaram valores faltantes (VF) superior a 50%. Para reduzir o máximo possível os valores ausentes (NA) para ajustar corretamente os dados em um modelo linear para realizar a normalização, foi usada a função fillChromPeaks (Figura. Supl. 14). A avaliação seguinte foi baseada em boxplots e visou identificar amostras problemáticas, devido a vários motivos, como falha na injeção ou problemas ocorridos durante a preparação da amostra. Os boxplots criados a partir da distribuição dos TICs estão na Figura. Supl. 15. Para a normalização, levou-se em consideração não apenas os tercis de Leaman, mas três parâmetros clínicos (idade, sexo e IMC) por análise de regressão múltipla. A normalização não foi realizada somente pelas intensidades, mas também pelos padrões internos (Figura. Supl. 16). Comparando os boxplots antes e após, vê-se que a mediana se normalizou após a normalização, sendo a mesma em toda a gama de amostras, concluindo, assim, que os dados podem ser analisados sem viés. Os gráficos com a distribuição dos sinais de intensidade antes e após a normalização encontra-se na Figura. Supl. 17.

Placa *versus* Controle

Buscando aprofundar o conhecimento sobre o estágio inicial de desenvolvimento da placa aterosclerótica coronariana, o primeiro objetivo do estudo foi comparar o perfil metabólico de pacientes com placa (n = 28) e controle (n = 12). As análises de PCA e PLS-DA encontram-se na Figura Supl. 18.

O modelo sparse PLS-DA acessou as variáveis independentes e o modelo teve uma taxa de erro de classificação de 40% (ncomp=5). Para avaliar a validade dos metabólitos para discriminação entre indivíduos Placa vs Controle, curvas ROC foram construídas para os 100 metabólitos selecionados. O melhor modelo foi obtido com valor da Área Sob Curva (AUC) de 0,696 (IC 95%: 0,559-0,952), indicando que eles tinham capacidade de previsão com acurácia de predição de 66,2%

(Fig. 39). A importância média de cada composto para a separação dos grupos é mostrada na Figura 40.

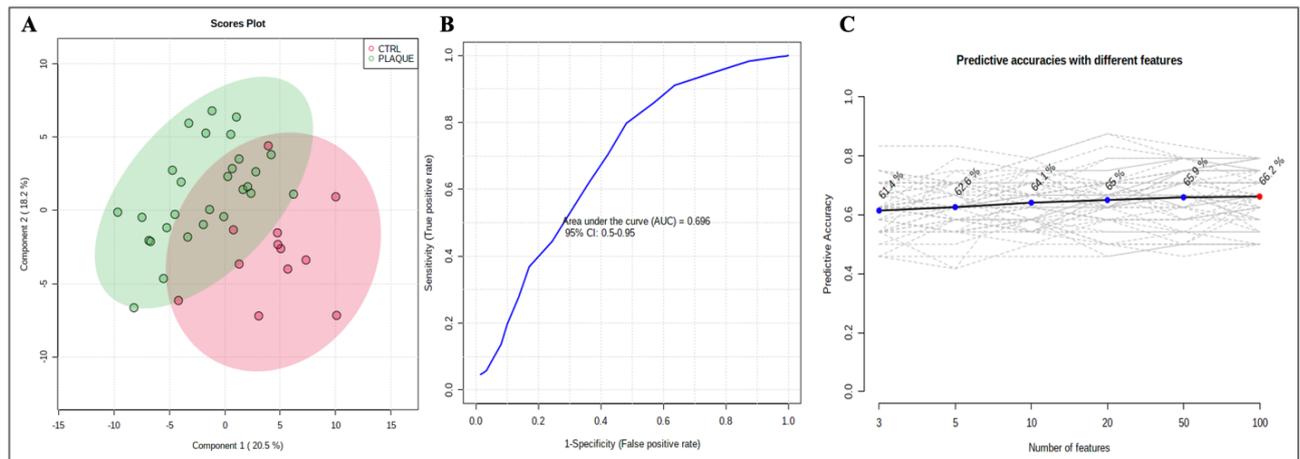


Figura 39. Gráficos da comparação Placa vs Controle. (A) Gráfico de escore do modelo de análise de sparse PLS-DA; (B) Curva ROC obtida com características selecionadas (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA; (C) Acurácia de predição pelo modelo sPLS-DA. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

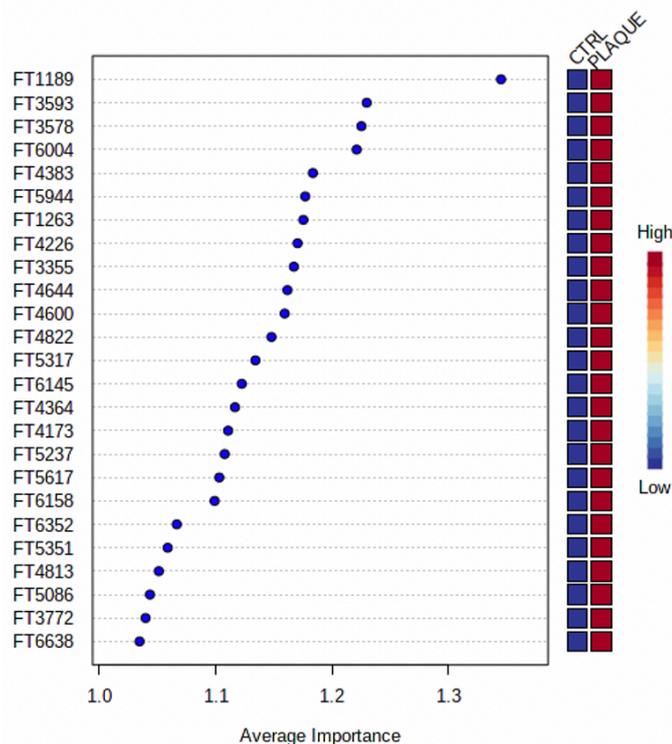


Fig. 40. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Placa vs Controle. As amostras são organizadas de acordo com a variável de pontuação de importância e o cenário de maior contribuição de cada metabólito é apresentado em uma escala de cores. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

A partir da análise estatística, foi possível a construção de um *Heatmap* ou mapa de calor, que gerou a informação acerca dos 25 *features* estatisticamente significativos expressos na análise sPLS-DA (pontuação Loading $\geq 1,0$), quanto às suas tendências de agrupamento e intensidades (Fig. 41). As inferências sobre as intensidades dos *features* constituintes da amostra, por sua vez, são

demonstradas por uma escala colorida à direita que indica a intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra. Os valores e cores variam de - 2 (azul claro – menor intensidade) a 2 (vermelho escuro - maior intensidade). A intensidade dos primeiros 15 *features* alterados (FT3355 a FT4644) se mostrou maior no grupo Controle se comparado ao grupo Placa, enquanto os 10 últimos *features* (FT5617 ao FT1263) foram mais intensos no grupo Placa, o que permite ilustrar uma discriminação entre os dois fenótipos analisados. Interessantemente, 1 paciente do grupo Controle (MILB) se organizou dentro do grupo Placa, indicando que a intensidade dos metabólitos deste paciente se assemelha mais ao perfil lipídico dos pacientes do grupo Placa do que dos demais do grupo Controle. Recorrendo aos dados clínicos para elucidar o motivo deste achado, a análise clínica revelou que este indivíduo tem altos níveis de proteína C reativa ultrasensível (> 2 mg/L), placas de aterosclerose nas artérias carótidas e obesidade grau 1, apesar de pertencer ao grupo Controle.

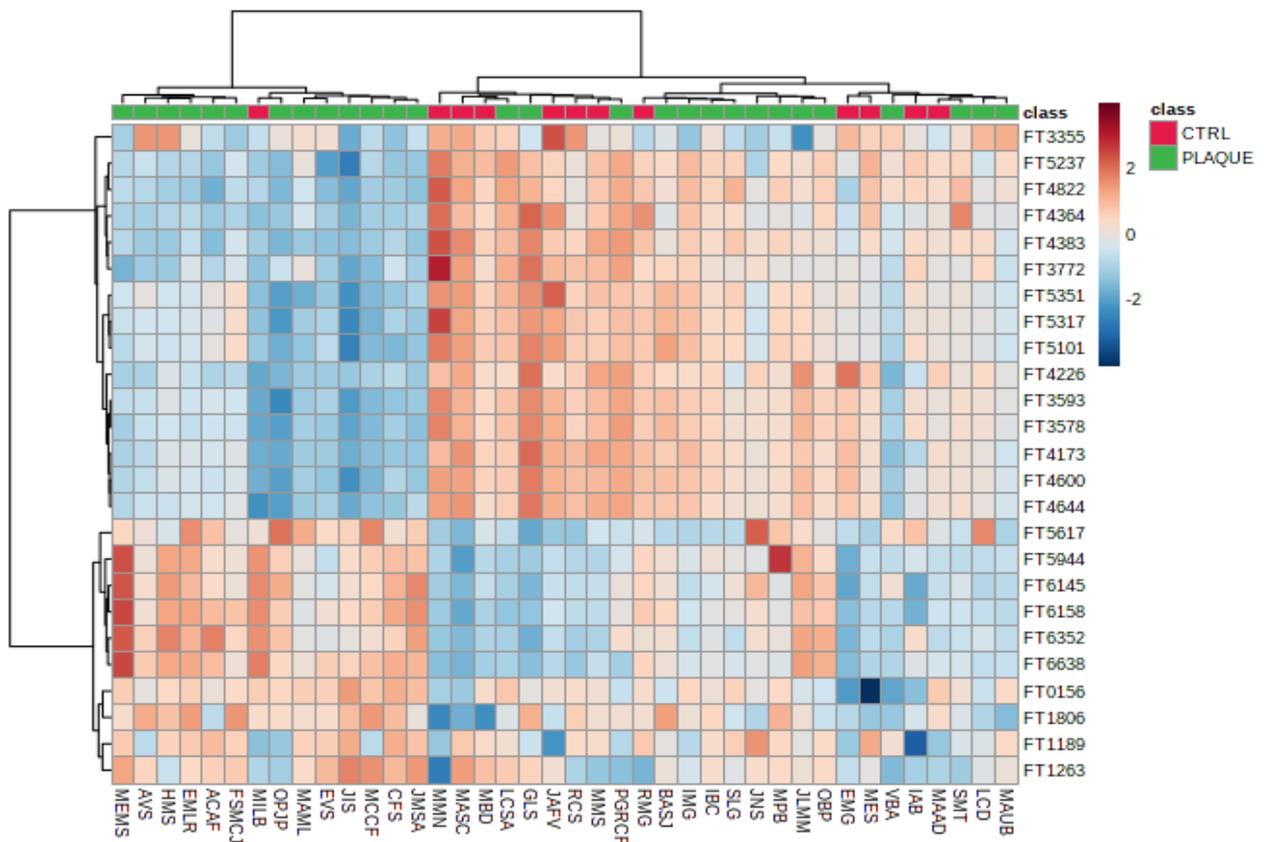


Figura 41. Mapa de calor (Heatmap) da comparação Placa vs Controle. Expresso a partir dos 25 principais *features* expressos de maneira estatisticamente significativa (metabólitos discriminantes), baseado na análise metabolômica realizada – sPLS DA (pontuação VIP $\geq 1,0$). A escala colorida à direita indica a intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra. As cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa e as matrizes expressam a relação de amostras ou metabólitos. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

Alto CT-LeSc versus Controle

Para investigar possíveis alterações lipídicas entre indivíduos com fenótipos extremos opostos, as amostras de Alto CT-LeSc e Controle foram confrontadas diretamente. Sparse PLS-DA acessou as variáveis independentes e demonstrou uma boa separação entre os grupos quando 100 metabólitos foram selecionados. O modelo teve uma baixa taxa de classificação incorreta (21,4%, $ncomp=2$), proporcionando agrupamento satisfatório. Para avaliar a validade dos metabólitos para discriminação entre indivíduos CT-LeSc alto vs Controle, as curvas ROC foram construídas para os 100 metabólitos selecionados. A AUC alcançada foi de 0,834 (intervalo de confiança de 95%: 0,538-1), indicando que eles tinham boa capacidade de previsão, com precisão preditiva de 77,3% (Figura 42).

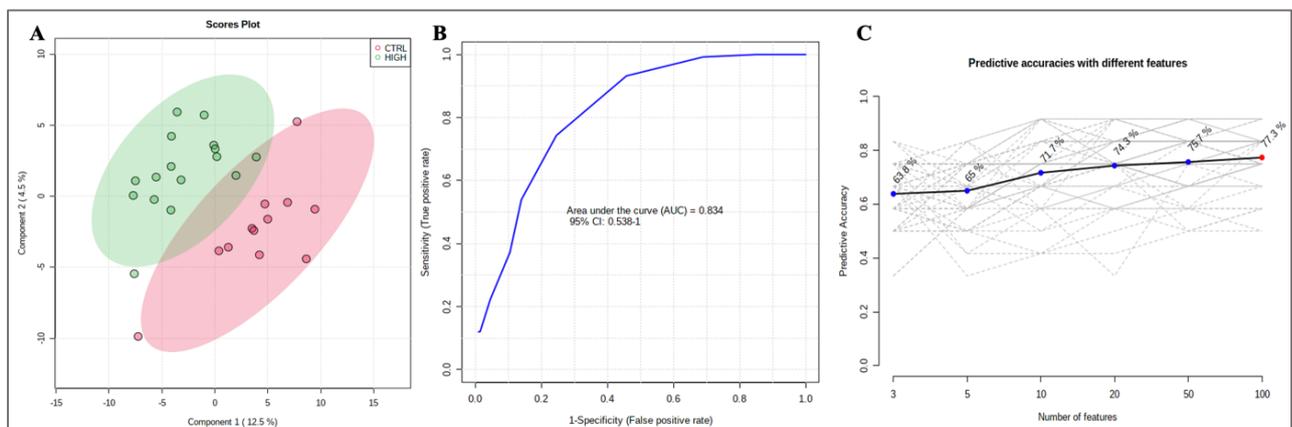


Figura 42. Gráficos da comparação Alto CT-LeSc vs Controle. (A) Gráfico de escore do modelo de análise de sparse PLS-DA; (B) Curva ROC obtida com características selecionadas (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA; (C) Acurácia de previsão pelo modelo sPLS-DA. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

Nesta comparação, notamos uma amostra fora da região de confiança, o qual foi retirada do conjunto de dados por tratar-se de um *outlier* analítico e outra amostra de um paciente do grupo controle que não estava na área de influência de seu próprio grupo (Figura Supl. 19). Como dito anteriormente, a despeito de ser controle, clinicamente este paciente se comporta como paciente de risco semelhante aos pacientes com placas por possuir fatores de risco para DAC (placas de ateroma na carótida, tabagismo, obesidade e PCR-us alta). Buscando construir um modelo representativo, removemos estas duas amostras e refizemos o modelo sPLS-DA. Desta forma, após as exclusões, houve redução da taxa de classificação incorreta (de 21,4% para 19,2%, $ncomp=2$), com aumento da AUC encontrada de 0,834 para 0,926 e da acurácia preditiva de 77,3 para 78,3% (Fig. 43). A importância média de cada composto para a separação dos grupos é mostrada na Fig. 44.

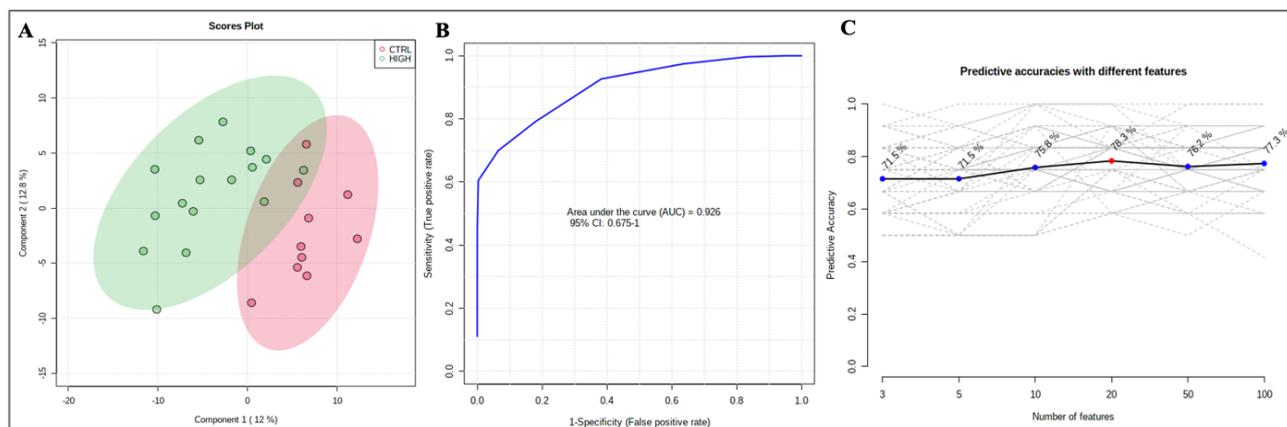


Figura 43. Gráficos da comparação Alto CT-LeSc vs Controle após remoção de 2 amostras do Controle. (A) Gráfico de escore do modelo de análise de sparse PLS-DA; (B) Curva ROC obtida com características selecionadas (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA. (C) Acurácia de predição pelo modelo sPLS-DA. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

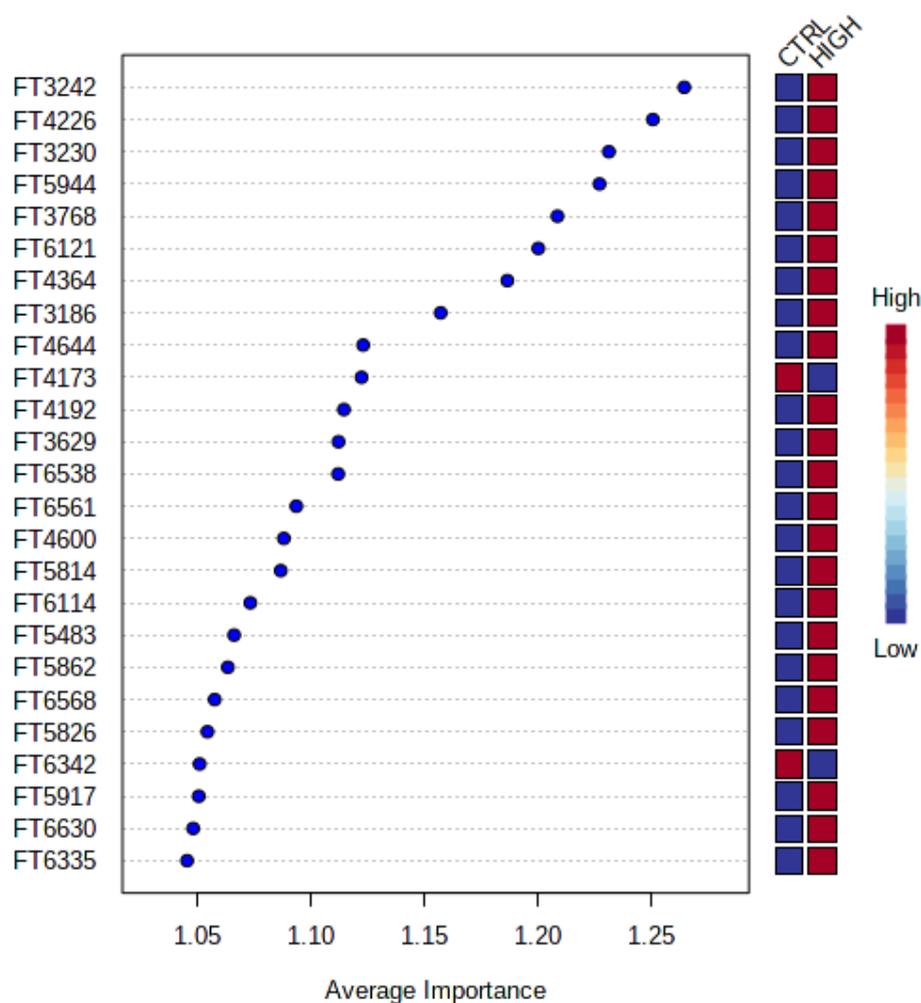


Figura 44. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Alto CT-LeSc vs Controle. As amostras são organizadas de acordo com a variável de pontuação de importância e o cenário de maior contribuição de cada metabólito é apresentado em uma escala de cores. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

A partir da análise estatística, o *Heatmap* gerou informação acerca dos 25 *features* estatisticamente significativos expressos na análise sPLS-DA (pontuação Loading $\geq 1,0$). A intensidade dos primeiros 8 *features* alterados (FT4364 a FT6335) se mostrou maior no grupo Controle se comparado ao grupo Alto CT-LeSc, enquanto os demais 17 lipídios (FT0727 ao FT6335) foram mais intensos no grupo Placa, o que permite ilustrar uma discriminação entre os dois fenótipos analisados (Fig. 45).

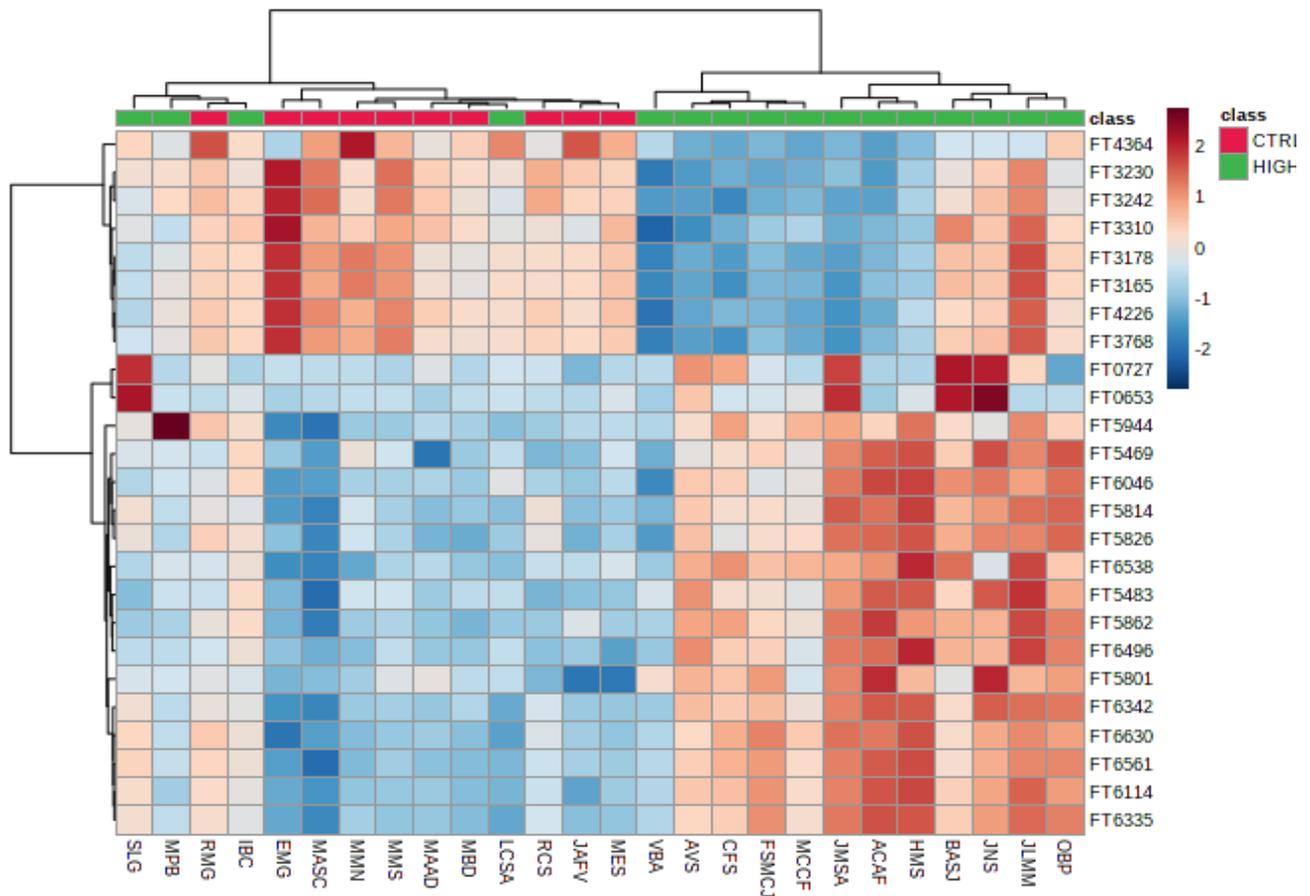


Figura 45. Mapa de calor (Heatmap) da comparação Alto CT-LeSc vs Controle. Expresso a partir dos 25 principais *features* expressos de maneira estatisticamente significativa (metabólitos discriminantes), baseado na análise metabolômica realizada – sPLS DA (pontuação VIP $\geq 1,0$). A escala colorida à direita indica a intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra. As cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa e as matrizes expressam a relação de amostras ou metabólitos. Fonte: adaptado do software *MetaboAnalyst*.

Alto CT-LeSc versus Baixo CT-LeSc

Sequencialmente, investigamos dentro do grupo placa as possíveis diferenças metabólicas entre indivíduos com fenótipo Alto vs. Baixo que corroborariam o prognóstico clinicamente distinto para esses dois fenótipos tomográficos coronarianos. Sparse PLS-DA acessou as variáveis independentes e o modelo teve uma taxa de erro de classificação incorreta de 46,4% (ncomp=1). Para avaliar a validade dos metabólitos para discriminação entre indivíduos com CT-LeSc alto vs baixo, curvas ROC foram construídas para os 100 metabólitos selecionados. A AUC alcançada foi de 0,865

(intervalo de confiança de 95%: 0,663-0,993), com precisão preditiva de 75,5% (Fig. 46). A importância média de cada composto para a separação dos grupos é mostrada na Fig. 47.

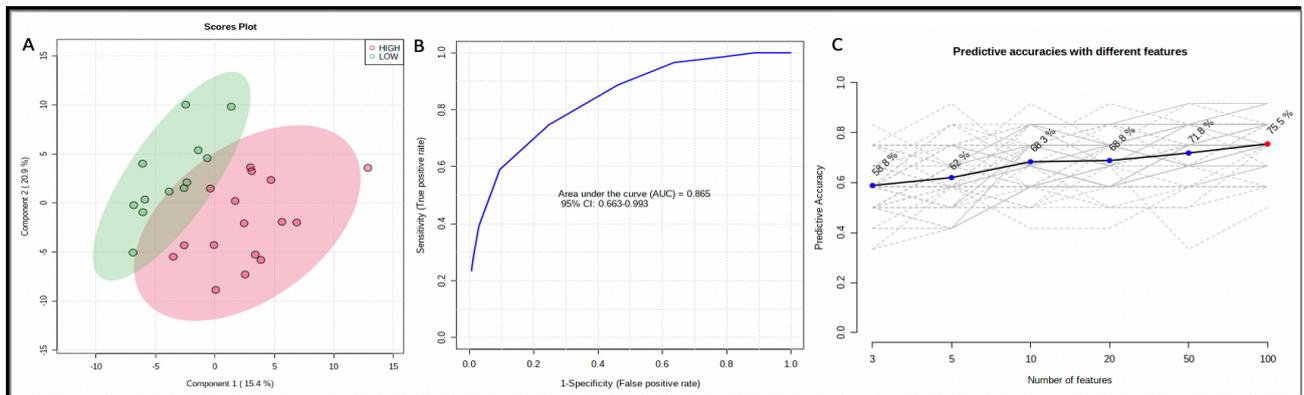


Figura 46. Gráficos da comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc. (A) Gráfico de escore do modelo de análise de sparse PLS-DA; (B) Curva ROC obtida com características selecionadas (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA. (C) Acurácia de predição pelo modelo sPLS-DA. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

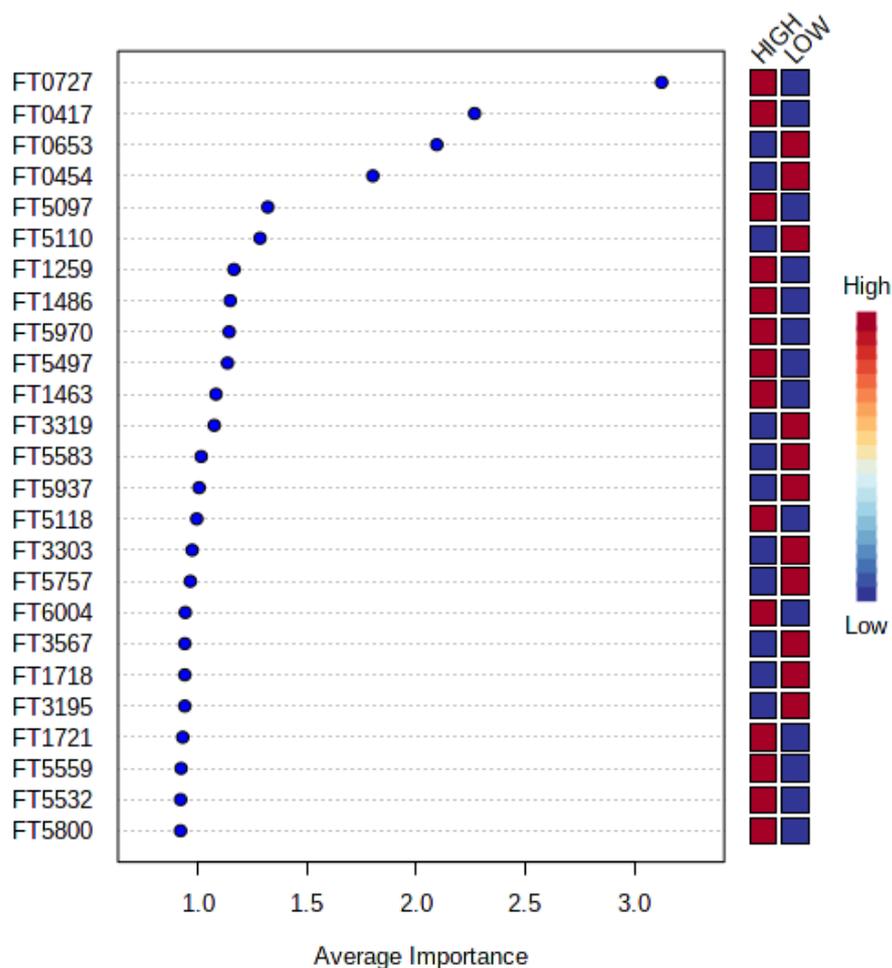


Fig. 47. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc. As amostras são organizadas de acordo com a variável de pontuação de importância e o cenário de maior contribuição de cada metabólito é apresentado em uma escala de cores. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

No *Heatmap* da comparação Alto vs Baixo, não houve discriminação clara entre estes dois fenótipos de Leaman (Fig. 48).

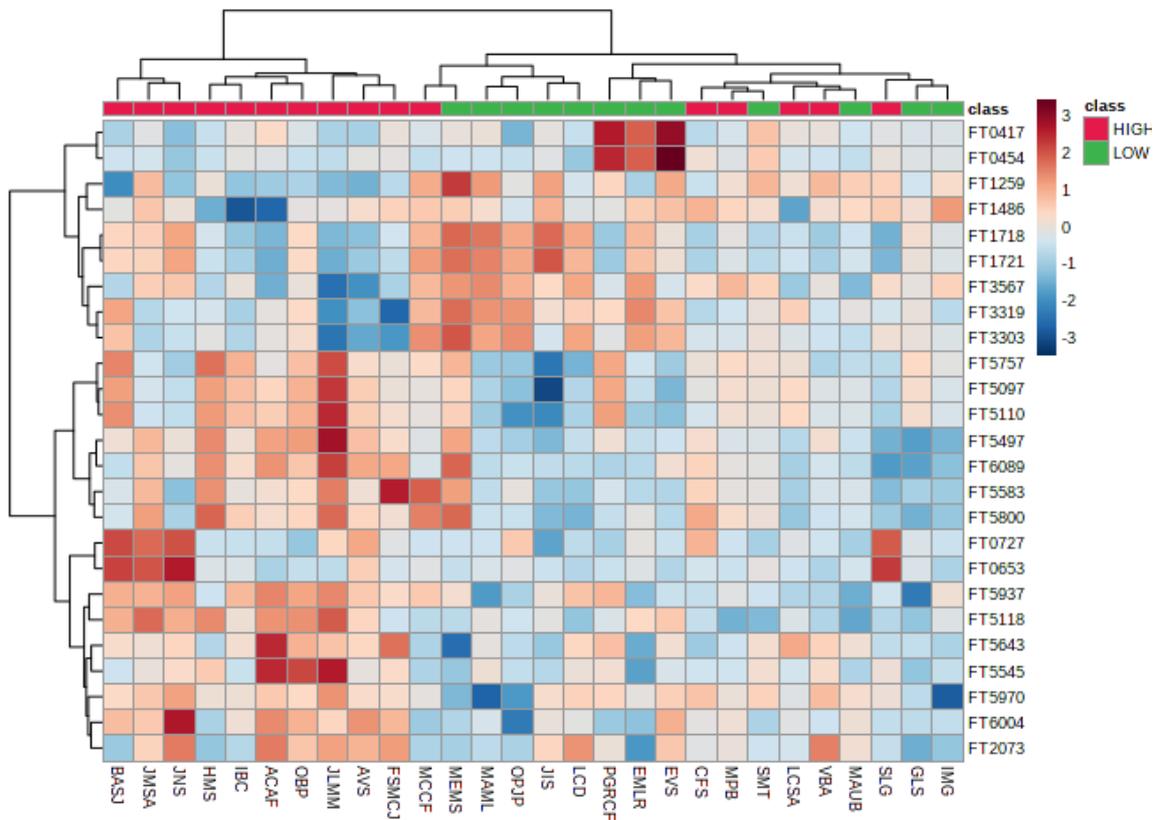


Fig. 48. Mapa de calor (*Heatmap*) da comparação Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc. Expresso a partir dos 25 principais *features* expressos de maneira estatisticamente significativa (*metabólitos discriminantes*), baseado na análise *metabolômica* realizada – *sPLS DA* (pontuação $VIP \geq 1,0$). A escala colorida à direita indica a intensidade relativa de cada *metabólito* em cada amostra. As cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa e as matrizes expressam a relação de amostras ou *metabólitos*. Fonte: adaptado do software *MetaboAnalyst*.

Tercil 3 de Leaman (T3) versus Controle

Posteriormente, interrogamos se entre os indivíduos do fenótipo T3 de Leaman e o controle havia diferenças metabólicas. Esta é a comparação direta envolvendo os maiores extremos do fenótipo. A taxa de erro de classificação do modelo Sparse PLS-DA foi de 10,5% ($ncomp=4$), com AUC da curva ROC alcançada de 0,967 (intervalo de confiança de 95%: 0,833-1) e precisão preditiva de 93,4% (Fig. 49). A importância média de cada composto para a separação dos grupos é mostrada na Fig. 50.

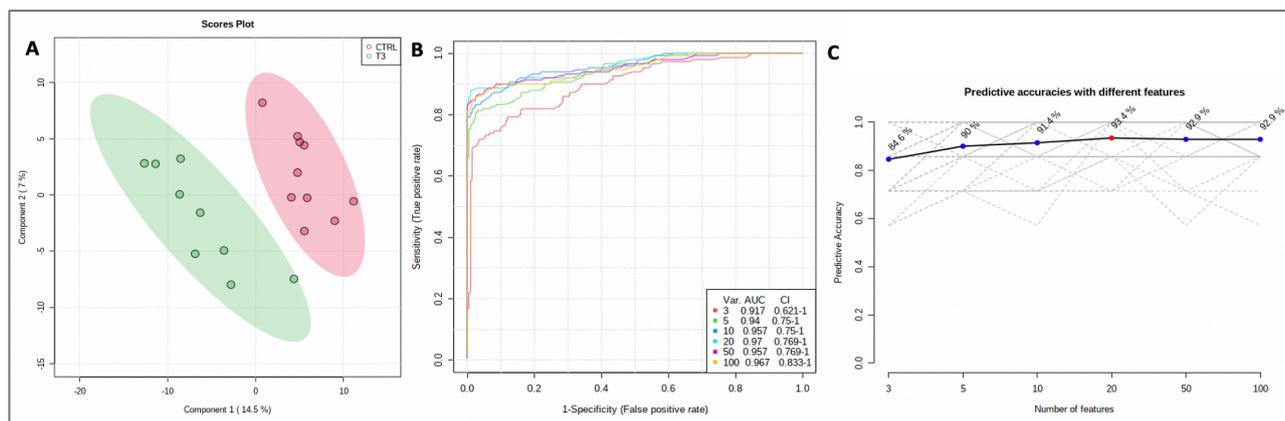


Figura 49. Gráficos da comparação Tercil 3 (T3) vs Controle. (A) Gráfico de escore do modelo de análise de sparse PLS-DA; (B) Curva ROC obtida com características selecionadas (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA. (C) Acurácia de predição pelo modelo sPLS-DA. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

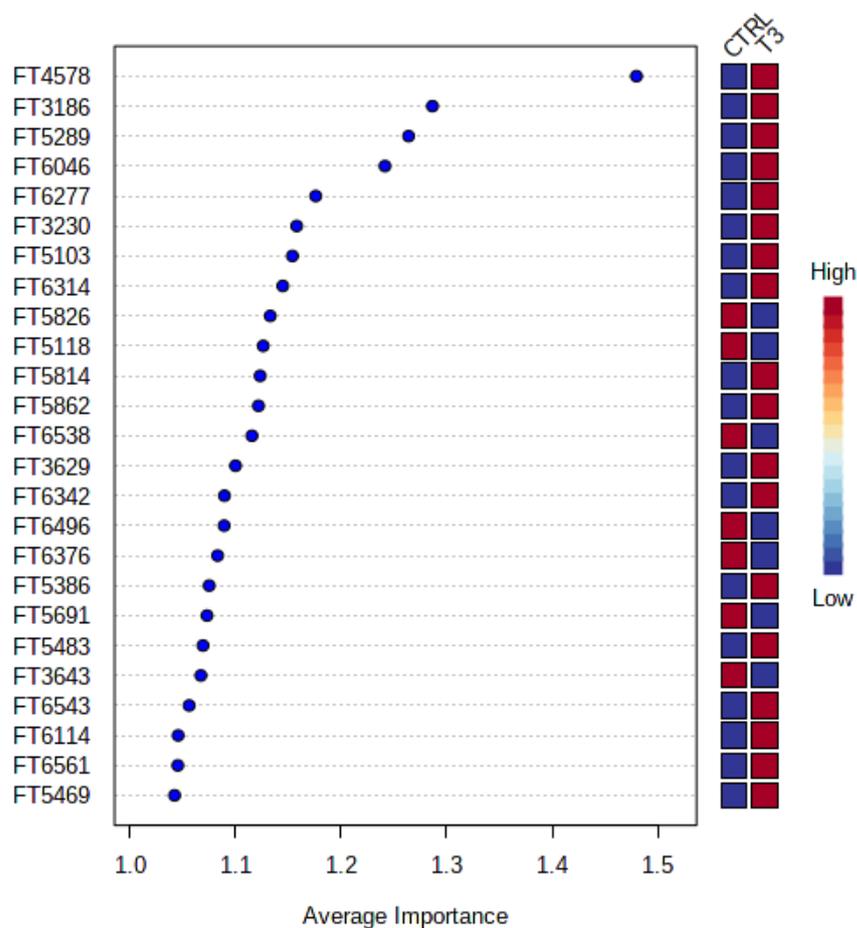


Fig. 50. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação Tercil 3 (T3) vs Controle. As amostras são organizadas de acordo com a variável de pontuação de importância e o cenário de maior contribuição de cada metabólito é apresentado em uma escala de cores. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

A partir da análise estatística, o *Heatmap* gerou informação acerca dos 25 *features* estatisticamente significativos expressos na análise sPLS-DA (pontuação Loading $\geq 1,0$). A intensidade dos primeiros 7 *features* alterados (FT3230 a FT4173) se mostrou maior no grupo Controle se comparado ao grupo T3, enquanto os demais 18 lipídios (FT0730 ao FT5386) foram mais intensos no grupo T3, o que permite ilustrar uma discriminação entre os dois fenótipos analisados (Fig. 51).

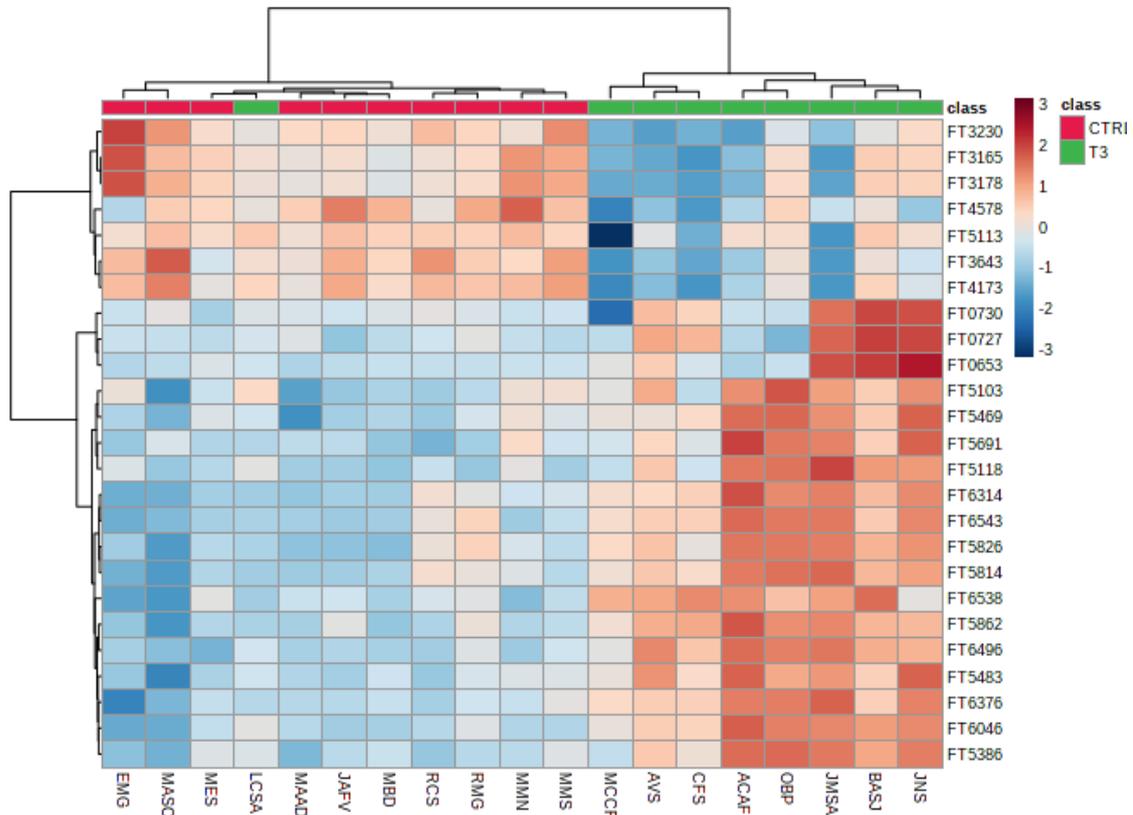


Fig. 51. Mapa de calor (Heatmap) da comparação T3 vs Controle. Expresso a partir dos 25 principais *features* expressos de maneira estatisticamente significativa (metabólitos discriminantes), baseado na análise metabolômica realizada – sPLS DA (pontuação VIP $\geq 1,0$). A escala colorida à direita indica a intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra. As cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa e as matrizes expressam a relação de amostras ou metabólitos. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

Tercil 1 de Leaman (T1) versus tercil 3 de Leaman (T3)

A análise final foi entre os opostos extremos dentro da classificação de Leaman, Tercil 3 vs Tercil 1. Sparse PLS-DA acessou as variáveis independentes e o modelo teve uma taxa de erro de classificação incorreta de 55,6% (ncomp=1). Para avaliar a validade dos metabólitos para discriminação entre indivíduos com CT-LeSc alto vs baixo, curvas ROC foram construídas para os 100 metabólitos selecionados. A AUC alcançada foi de 0,878 (intervalo de confiança de 95%: 0,556-1), com precisão preditiva de 77% (Fig. 52). A importância média de cada composto para a separação dos grupos é mostrada na Fig. 53.

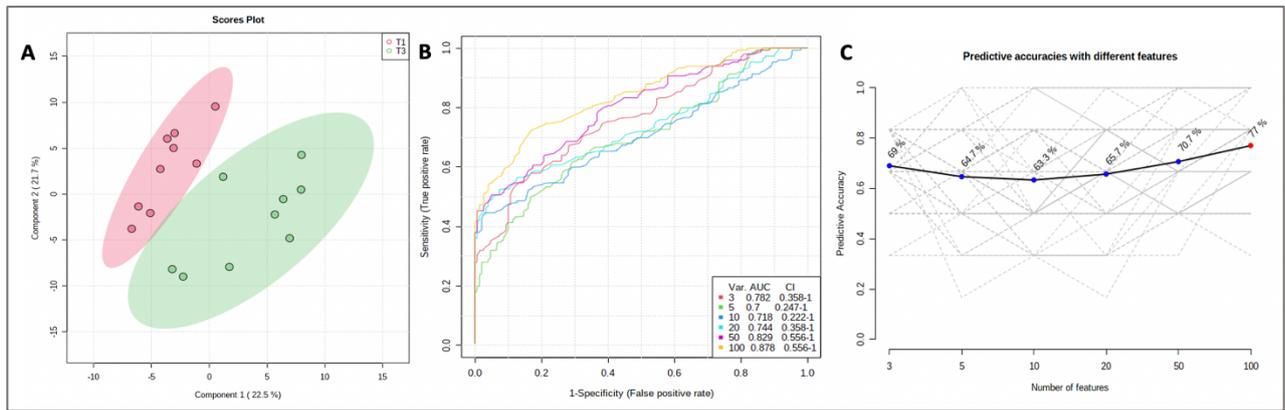


Figura 52. Gráficos da comparação Tercil 3 (T3) vs Tercil 1 (T1). (A) Gráfico de escore do modelo de análise de sparse PLS-DA; (B) Curva ROC obtida com características selecionadas (Loading plot) pelo modelo sPLS-DA. Acurácia de predição pelo modelo sPLS-DA. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

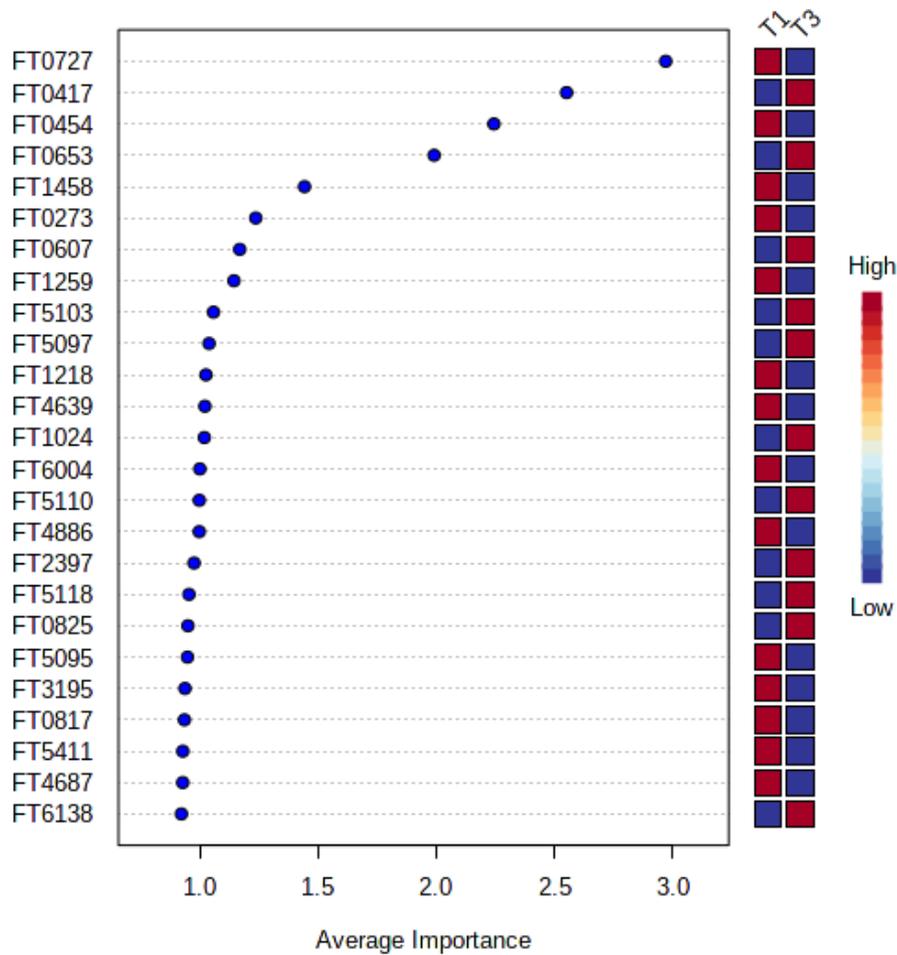


Fig. 53. Metabólitos discriminantes validados por curva ROC na comparação T3 vs T1. As amostras são organizadas de acordo com a variável de pontuação de importância e o cenário de maior contribuição de cada metabólito é apresentado em uma escala de cores. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

A partir da análise estatística, o *Heatmap* gerou informação acerca dos 25 *features* estatisticamente significativos expressos na análise sPLS-DA (pontuação Loading $\geq 1,0$). Conforme ilustrado na figura 54, apesar dos 12 primeiros lipídios estarem mais intensos no grupo T3, não houve robusta discriminação entre os dois fenótipos.

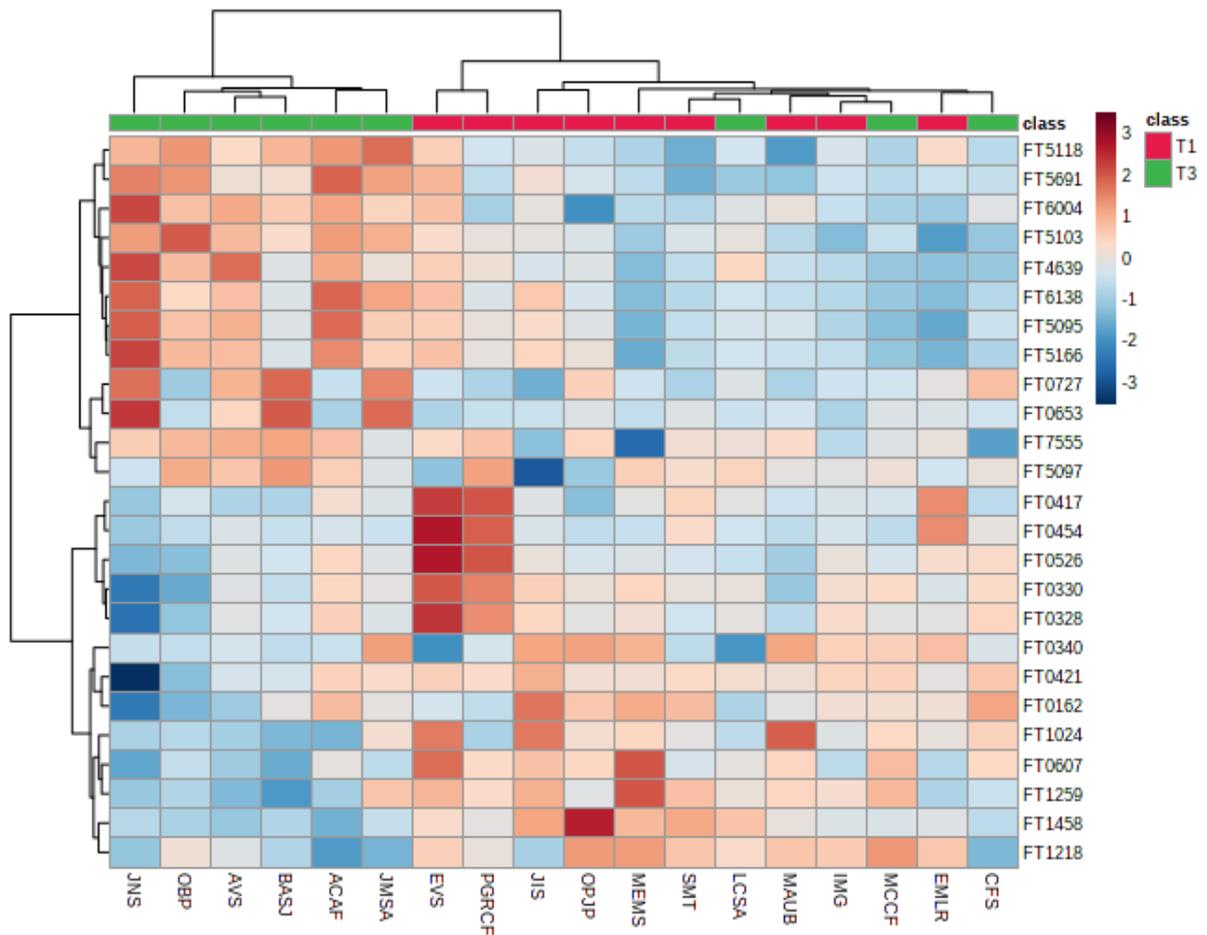


Fig. 54. Mapa de calor (Heatmap) da comparação T3 vs T1. Expresso a partir dos 25 principais *features* expressos de maneira estatisticamente significativa (metabólitos discriminantes), baseado na análise metabólica realizada – sPLS DA (pontuação VIP $\geq 1,0$). A escala colorida à direita indica a intensidade relativa de cada metabólito em cada amostra. As cores mais quentes representam uma distribuição mais intensa e as matrizes expressam a relação de amostras ou metabólitos. Fonte: adaptado do software *MetaboAnalyst*.

4. Discussão

Clinicamente, já se tem muitas evidências da falha em predizer o risco cardiovascular naqueles indivíduos classificados como de risco intermediário pelo escore de Framingham. Trata-se, de fato, de um grupo muito amplo e heterogêneo, com desfechos clínicos bem distintos dentro da mesma população. A estratificação por imagem CCTA corrobora este raciocínio, dado que existem dentro do grupo intermediário pacientes sem qualquer placa aterosclerótica e aqueles com placas de alto risco de ruptura, classificados aqui pelo escore de Leaman como CT-LeSc alto e T3. Neste trabalho, os pacientes com escore alto representaram 40% da amostra.

Devido à inexistência de trabalhos descrevendo a relação entre metabólica e CT-LeSc e as inúmeras vantagens de se usar um método não invasivo para estratificação de uma doença tão prevalente, procurou-se primeiramente demonstrar se a metabólica do grupo controle vs placa eram distintos e, em seguida, se dentro do grupo com placa o escore de Leaman discriminava metabólitos diferentes entre os fenótipos.

O que a metabólica nos mostrou é que, do ponto de vista molecular, o grupo intermediário realmente engloba pacientes com diferentes assinaturas lipídicas, a despeito da mesma categorização clínica. Os resultados indicam que há diferenças no perfil lipídico entre os cenários, notadamente marcadas entre os grupos T3 e Controle, extremos opostos fenotipicamente. Nesta comparação, o erro de classificação foi o menor de todos (10%) e a área sob a curva ROC alcançada foi a maior (0,967), com predição de 93,4%. Este resultado tem grande relevância. Primeiro, porque trata-se de uma amostra biológica complexa (humanos), onde existe uma variabilidade metabólica muito grande. Segundo, porque na prática clínica a condução destes pacientes pelo cardiologista é a mesma, pois os indivíduos estão engessados na mesma classificação de risco intermediário de Framingham. O seguimento ambulatorial e as indicações com exames para detecção de isquemia ou metas de alcance de LDL colesterol embasados nas diretrizes correntes para ambos estes grupos (T3 e Controle) são, até o presente momento, as mesmas, apesar de tão distintos metabolicamente.

A discriminação entre o grupo de Alto CT-LeSc e controle também foi boa, com erro de classificação baixo de 19,2%, com AUC ROC de 0,92. Este resultado foi inferior ao da comparação T3 vs controle porque no grupo Alto CT-LeSc estão incluídos não somente pacientes T3, mas também do grupo T2. De toda forma, a consideração mais importante que se permite inferir disso é que o grupo de alto risco (CT-LeSc alto e T3) parece, mesmo nesta análise global, ter indício de uma assinatura molecular discriminante.

À medida que a análise se concentrou na comparação entre os grupos com placa, ou seja, com fenótipos só patológicos, o poder de discriminação dos modelos diminuiu, em função do

aumento da similaridade entre os grupos. Isso é bem congruente com o próprio escore de Framingham, que não categoriza bem os intermediários. Comparado aos grupos de alto e baixo risco de Framingham, é mais desafiador trabalhar no grupo intermediário, assim como é difícil trabalhar com plasma (matriz sistêmica) para elucidar um fenótipo que é *in situ* (artéria coronariana). Mesmo na esfera molecular, e mesmo sendo lipídico, é difícil reclassificar estes pacientes. Além disso, é imperativo lembrar que há muita sinergia entre cenários próximos (Alto CT-LeSc vs Baixo CT-LeSc) e muitos outros fatores não analisados podem ter influência nestes resultados (condições hepáticas, dieta, etc).

Interessantemente, também podemos tirar considerações valiosas do grupo controle. MILB, por exemplo, considerado como pertencente ao grupo controle baseado na CCTA, padrão ouro de imagem não invasiva, poderia ser considerado um “verdadeiro intermediário morte súbita” porque é um controle que se comporta em todos os momentos como *outlier*, ou seja, próximo do fenótipo de alto risco. Em verdade, o fenótipo intermediário é muito sutil. Estes achados sugerem, então, que a questão do risco cardiovascular vai muito além da placa. Mensura-se pela placa porque é algo visível. Apesar de não ter placa aterosclerótica documentada na CCTA, MILB tem uma maquinaria molecular de alto risco de eventos cardíacos, que pôde ser constatada no plasma. Com um raciocínio análogo, a assinatura lipídica distinta do grupo CT-LeSc alto e T3 permite-nos questionar se a maquinaria molecular destes pacientes teria, na verdade, mais similaridade com a de pacientes classificados como de alto risco cardiovascular do que de risco intermediário. E, sendo isso verdadeiro, na prática clínica estes pacientes de grupo intermediário mas com CT-LeSc alto ou T3, poderiam ser melhor conduzidos do ponto de vista clínico com vigilância maior e estratégias mais rígidas para controle de níveis glicêmicos e lipídicos, por exemplo, à semelhança do que se propõe para os indivíduos de alto risco cardiovascular.

A interpretação biológica e a inferência clínica dos achados descritos neste estudo só poderão se completar quando os lipídios discriminantes foram identificados. Este trabalho está em curso e seus resultados aprofundarão ainda mais nosso conhecimento sobre a fase pré-clínica da coronariopatia.

Aqui, a estratificação de risco cardiovascular por técnica inovadora que buscou espelhar a metabólica aos achados da anatomia coronariana pelo método de Leaman foi testada. Contextualizando nosso momento histórico e o atual estado da arte da Medicina, sabemos que no modelo científico moderno não se pode precisar quando e como um fenômeno acontecerá, apenas sua probabilidade. Mesmo após mais de 100 anos, a frase do visionário Sir William Osler (1849-1919) “*A Medicina é a ciência da incerteza e a arte da probabilidade*” é força motriz para se buscar ampliar nossa predição de risco e aumentar a chance de acerto na probabilidade de ocorrer um evento cardiovascular. Nesta busca para atingir a melhor previsão na avaliação de risco cardiovascular, a

metabolômica surge como uma opção. Afinal, ela está mais próxima do fenótipo do que a genômica. De fato, a maioria das doenças são multigênicas e a proposta futurística do genoma não atingiu a relevância de que se imaginava alcançar.

Por CCTA, usamos a “placa” como fenótipo, já que é o ator principal dos eventos coronarianos. Porém, reconhecemos que é minimizar muito afirmar que as predições de ter ou não infarto agudo do miocárdio estejam resumidas a ter ou não placa. Isso deve ser levado em consideração em qualquer trabalho sobre probabilidade de doença e previsão de risco. Partindo destes princípios, e considerando este experimento um estudo de vida real – no qual não é possível controlar todas as variáveis -, estes resultados são um pequeno, mas importante, passo na área da Cardiologia Preventiva, a despeito das limitações.

As mesmas limitações citadas no Capítulo 2 discutidas sobre a interpretação dos resultados do GC-MS cabem aqui, especialmente em relação ao número total de pacientes que efetivamente entraram para o estudo. Passos para fundamentar nossos achados e expandir nosso entendimento passam, necessariamente, pelo (1) aumento do número amostral; (2) Análise multiplataforma (conexão entre as diferentes “ômicas”) para criação de *painéis* metabólicos que cubram todo o metaboloma; (3) Monitoramento de um conjunto de metabólitos; (4) Associação de resultados de diferentes estudos e (5) Uso de ferramentas estatísticas cada vez mais precisas, incluindo curvas ROC e aplicação de inteligência artificial.

Sobre este último ponto, ressalta-se que na vanguarda do século 21, há uma velha declaração com relevância atual: “Os computadores são incrivelmente rápidos, precisos e estúpidos. Os seres humanos são incrivelmente lentos, imprecisos e brilhantes. Juntos eles são poderosos, além da imaginação”. Essa frase, atribuída ao físico teórico que desenvolveu a teoria da relatividade e um dos dois pilares da física moderna, Albert Einstein, serve como uma luva nessa nova era da Medicina. Mais de meio século depois, o aprendizado de máquina para interpretação de imagens de cardiologia mostra-se uma revolução. Como em outras esferas da sociedade e da ciência, a incorporação da inteligência artificial certamente contribuirá para expandir nossa compreensão mecanicista da biologia integrativa, na qual se inclui a Cardiologia Preventiva.

A análise metabolômica tem um enorme potencial para um casamento feliz com imagem e inteligência artificial, agregando informações adicionais aos dados tradicionais, fornecendo, assim, *painéis* metabólicos para a aterosclerose subclínica. Esta informação nos ajudará a entender melhor a composição da placa coronária vulnerável e abrirá novas oportunidades no desenvolvimento de biomarcadores mais refinados. Mais esforços são necessários para explorar a viabilidade da implementação clínica, bem como se a combinação de experiência do médico, inteligência artificial e dados “ômicos” podem levar a uma melhor qualidade do atendimento ao paciente, especialmente para indivíduos assintomáticos em risco cardiovascular intermediário cujo manejo clínico é incerto.

Além das aplicações para um melhor diagnóstico, esses biomarcadores lipídicos "personalizados" poderão ser úteis no diagnóstico precoce (ou mesmo no prognóstico) da doença coronariana aterosclerótica e na definição de desfechos em ensaios clínicos.

É essencial lembrar que trabalhos complexos são possíveis graças a esforços colaborativos. Essa afirmação parece bastante apropriada para a aplicação da metabolômica translacional no contexto da prevenção de doenças cardiovasculares. A metabolômica é uma das áreas de pesquisa multidisciplinar que requer informações de diferentes tipos de especialistas, incluindo biólogos, químicos analíticos, estatísticos, cientistas de dados e bioinformáticos. O futuro da estratificação de risco molecular envolve a integração de múltiplas medições e fontes de dados para aprimorar nossa compreensão biológica dos fatores de risco e dos processos de aterosclerose coronariana.

Em resumo, em virtude da fenotipagem rica e profunda e da personificação dos fatores de risco de DCV, a implementação da metabolômica neste campo pode fornecer soluções custo-efetivas para um problema clínico relevante, visando atingir seu objetivo principal: melhorar a prática da Medicina e permitir que os médicos tomem melhores decisões clínicas e forneçam aos seus pacientes cuidado de excelência.

5. Conclusão

Em conclusão, nosso trabalho revelou pela primeira vez possível discriminância nas constituições lipídicas observadas no plasma de indivíduos assintomáticos de risco intermediário para eventos cardiovasculares pelo escore de Framingham, classificados por angiotomografia de artérias coronárias e analisados por metabolômica. Nossos dados mostram perfil metabólito discriminante entre os fenótipos extremos (T3 *versus* Controle e Alto CT-LeSc *versus* Controle). Quanto melhor entendermos as alterações metabólicas subjacentes ao processo de aterogênese coronariana, mais nos aproximaremos de melhora em seu manejo, permitindo o desenvolvimento de biomarcadores específicos em fases precoces da doença e até mesmo de terapias direcionadas. O alto potencial da metabolômica como adjuvante ou mesmo alternativa à CCTA no estudo da carga aterosclerótica coronariana é um caminho real no campo da Cardiologia Translacional.

6. Material Suplementar

Catalog Number	Mixture Components	Target Concentration (µg/mL)
791637	15:0-18:1(d7) PC	160
791638	15:0-18:1(d7) PE	5
791639	15:0-18:1(d7) PS	5
791640	15:0-18:1(d7) PG	30
791641	15:0-18:1(d7) PI	10
791642	15:0-18:1(d7) PA	7
791643	18:1(d7) LPC	25
791644	18:1(d7) LPE	5
700185	18:1(d7) Chol Ester	350
791646	18:1(d7) MG	2
791647	15:0-18:1(d7) DG	10
791648	15:0-18:1(d7)-15:0 TG	55
791649	18:1(d9) SM	30
700041	Cholesterol (d7)	100

Figura Supl. 13. LIPIDOMIX®. Para avaliar os possíveis picos que representam os padrões internos, listamos aqui todos os compostos utilizados e os possíveis adutos de acordo com cada polaridade. Como padrão interno, Splash Lipidomix da Avanti Polar Lipids foi usado. Essa solução é formada por uma mistura de 14 compostos deuterados, todos de diferentes classes lipídicas. A descrição completa e informações técnicas podem ser encontradas em: <https://avantilipids.com/product/330707>.

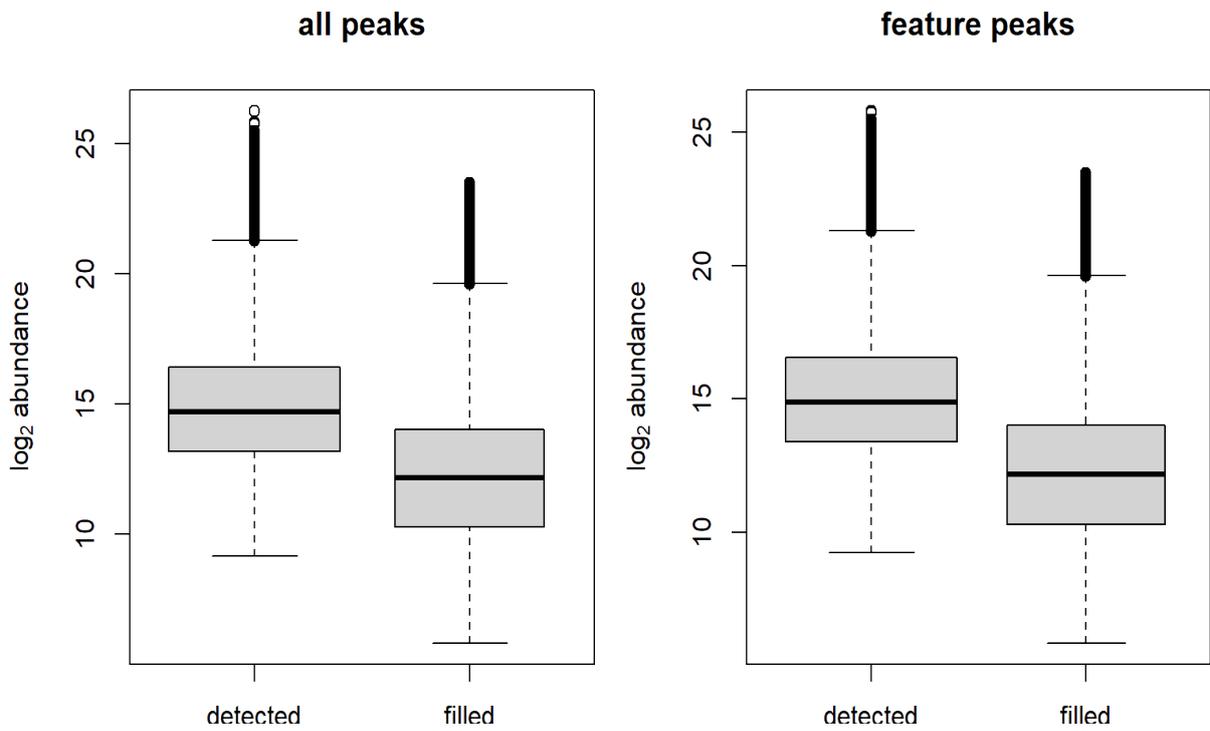


Figura Supl. 14. Distribuição do sinal (\log_2) antes e depois do preenchimento dos valores ausentes (missing values). Muitas causas subjacentes podem estar na raiz dessas intensidades ausentes: um sinal pode não ser detectável porque um composto está ausente de uma amostra ou pode ser ruidoso (portanto, falhando na etapa de detecção de pico a ser identificada) e/ou abaixo da detecção limite do instrumento. A função `fillChromPeaks` foi usada para resgatar sinais ausentes com o chamado preenchimento de lacunas: esse método usa a área sob a curva das amostras onde o pico específico foi identificado para definir valores de intensidade plausíveis onde eles estão ausentes. Isso é usado posteriormente para recuperar apenas os dados preenchidos.

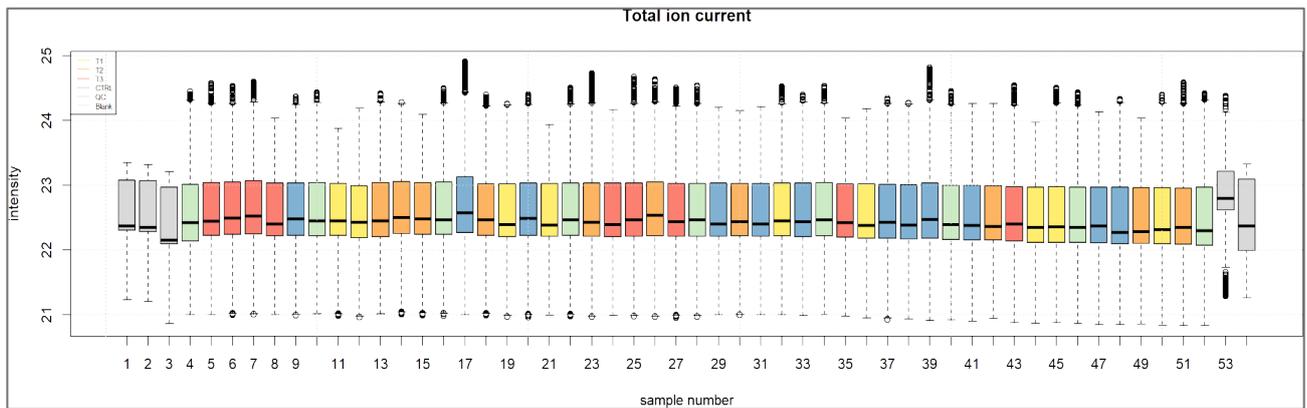


Figura Supl. 15. Distribuição das intensidades de sinal de todas as amostras pré-normalização.

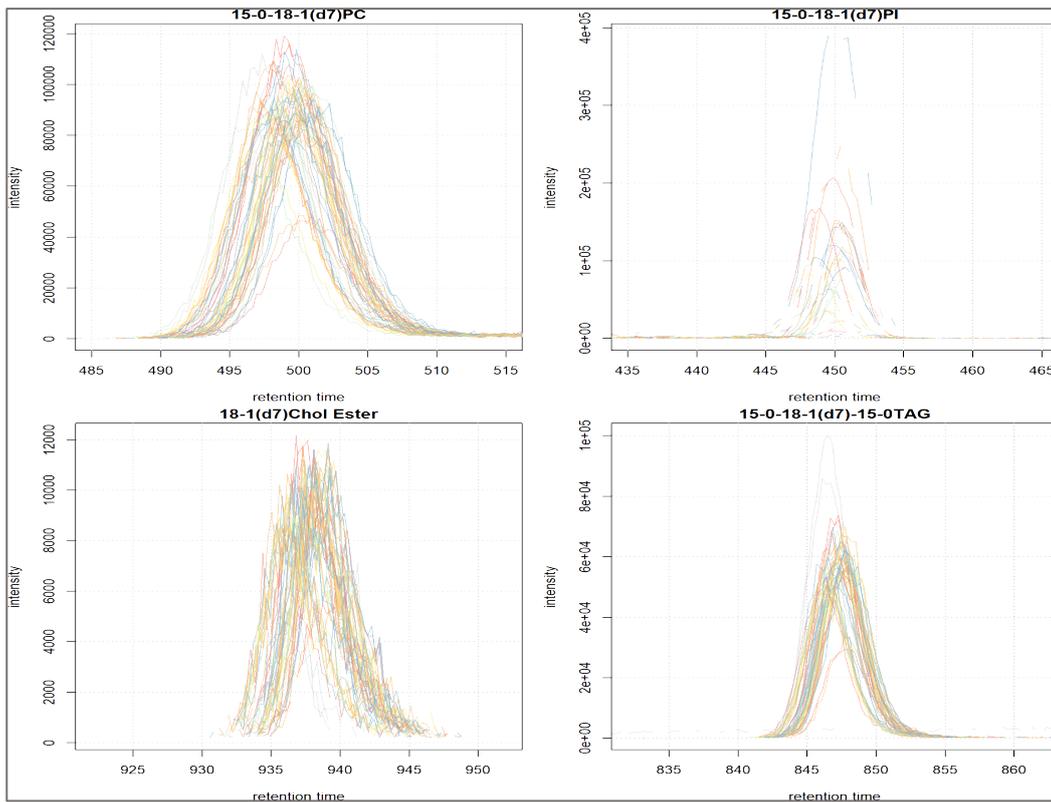


Figura Supl. 16: Cromatogramas de íons extraídos para o conjunto de padrões internos.

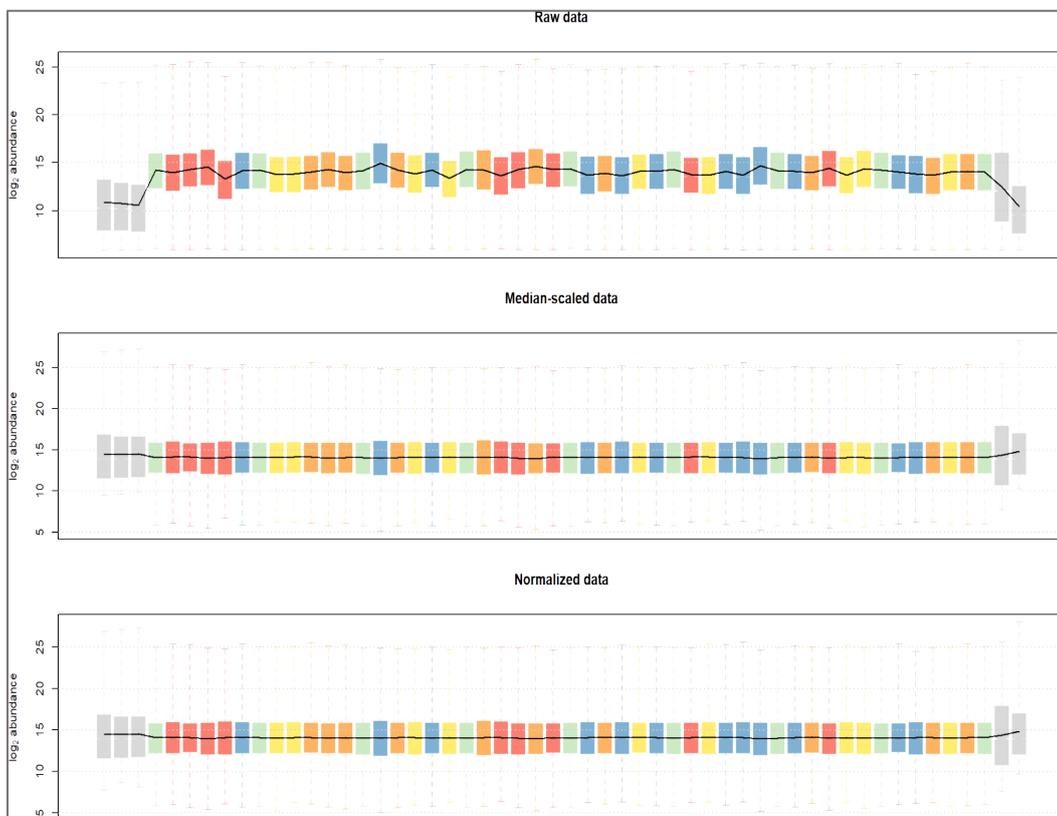


Figura Supl. 17. Comparação entre abundâncias (\log_2) de dados brutos, dados em escala mediana e dados normalizados. A partir dos gráficos da comparação dos boxplots antes e depois da normalização pela mediana, podemos ver que a maior parte da melhoria vem da normalização pela mediana; apenas algumas pequenas alterações são visíveis após o ajuste linear.

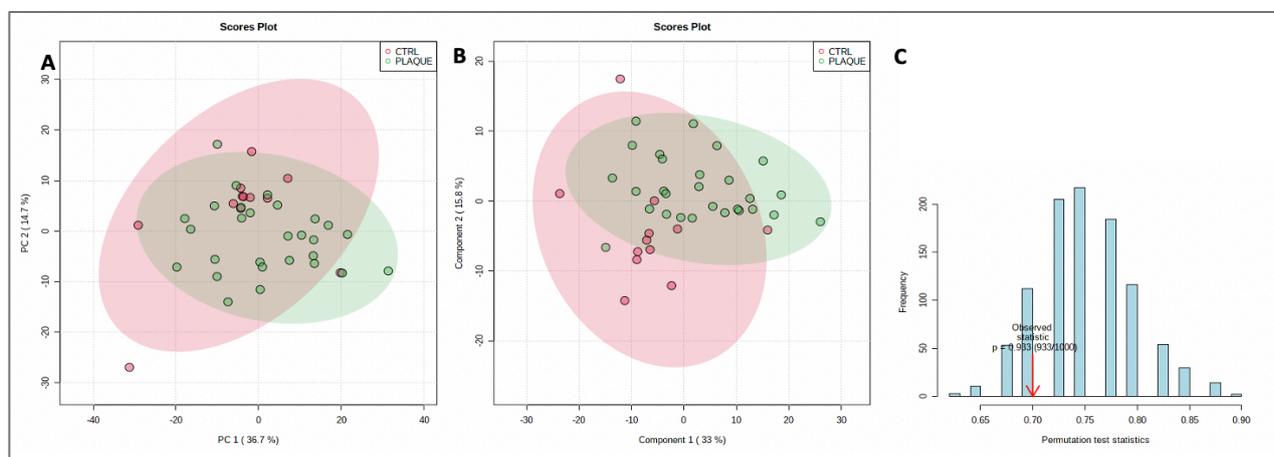


Figura Supl. 18. Análise de PCA e PLS-DA na comparação Placa e Controle. A porcentagem de cada eixo revela a variância explicada em cada projeção plotada e as regiões elípticas correspondem ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Cada ponto no gráfico corresponde a um paciente ou amostra. (A) PCA; (B) PLS-DA; (C) Teste de permutação. No PLS-DA, $Q^2 = -0.3$, $R^2 = 0.9$ e o p valor do teste de permutação > 0.05 , mostrando que o modelo não foi validado. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

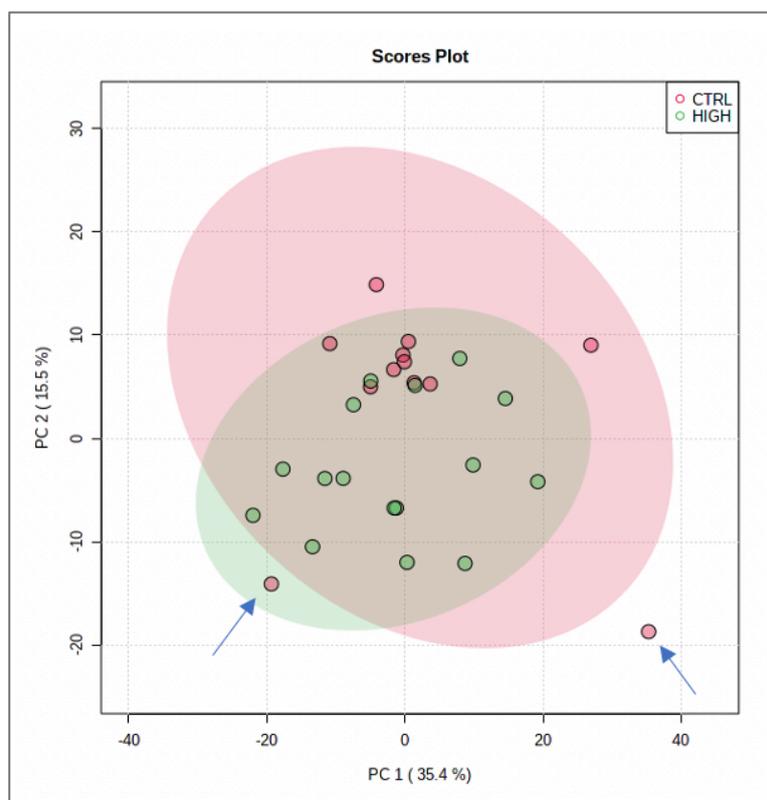


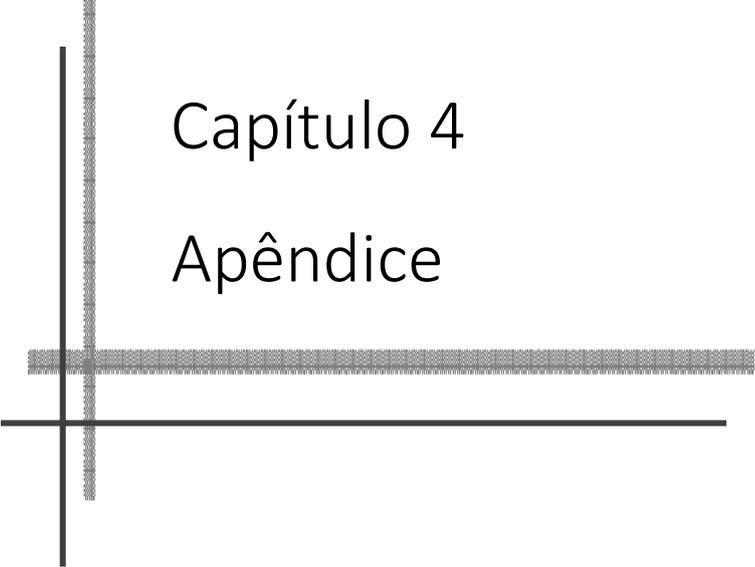
Figura Supl. 19. Análise de PCA na comparação com Alto-CT-LeSc vs Controle. Presença de 2 amostras fora da região de confiança (setas azuis), sendo uma outlier analítico e outra outlier clínico. Fonte: adaptado do software MetaboAnalyst.

9. Referências

- ANDREINI, D. et al. Long-term prognostic impact of CT-Leaman score in patients with non-obstructive CAD: Results from the COronary CT Angiography EvaluatioN For Clinical Outcomes InteRnational Multicenter (CONFIRM) study. **International Journal of Cardiology**, v. 231, p. 18–25, 2017.
- AOKI, J.; INOUE, A.; OKUDAIRA, S. Two pathways for lysophosphatidic acid production. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1781, n. 9, p. 513–518, 2008.
- BI, K. et al. Antigen-induced translocation of PKC- θ to membrane rafts is required for T cell activation. **Nature Immunology**, v. 2, n. 6, p. 556–563, 2001.
- BORLAND, S. J. et al. Regulation of vascular smooth muscle cell calcification by syndecan-4/FGF-2/PKC α signalling and cross-talk with TGF β . **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 13, p. 1639–1652, 2017.
- CHENG, J. M. et al. Plasma concentrations of molecular lipid species in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome: Results of the ATHEROREMO-IVUS study. **Atherosclerosis**, v. 243, n. 2, p. 560–566, 2015.
- CHICCO, A. J.; SPARAGNA, G. C. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 292, n. 1, 2007.
- DWYER, J. H. et al. Arachidonate 5-Lipoxygenase Promoter Genotype, Dietary Arachidonic Acid, and Atherosclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 1, p. 29–37, 2004.
- EKROOS, K. et al. Lipidomics: A tool for studies of atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 12, n. 4, p. 273–281, 2010.
- FUELLER, M. et al. Activation of human monocytic cells by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. **Cellular Signalling**, v. 15, n. 4, p. 367–375, 2003.
- GUSTIN, C. et al. Upregulation of pentraxin-3 in human endothelial cells after lysophosphatidic acid exposure. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 3, p. 491–497, 2008.
- HEEMSKERK, J. W. M.; MATTHEIJ, N. J. A.; COSEMANS, J. M. E. M. Platelet-based coagulation: Different populations, different functions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 11, n. 1, p. 2–16, 2013.
- HELGADOTTIR, A. et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. **Nature Genetics**, v. 36, n. 3, p. 233–239, 2004.
- HELGADOTTIR, A. et al. A variant of the gene encoding leukotriene A4 hydrolase confers ethnicity-specific risk of myocardial infarction. **Nature Genetics**, v. 38, n. 1, p. 68–74, 2006.
- HOUTKOOOPER, R. H.; VAZ, F. M. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 16, p. 2493–2506, 2008.
- KOHNO, S. et al. Lipidomic insight into cardiovascular diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 504, n. 3, p. 590–595, 2018.

- LI, X.; LEGIDO-QUIGLEY, C. Advances in separation science applied to metabolomics. **Electrophoresis**, v. 29, n. 18, p. 3724–3736, 2008.
- LIN, C. I. et al. Lysophosphatidic acid regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through LPA1 and LPA3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, n. 4, p. 1001–1008, 2007.
- LU, J. et al. Comprehensive metabolomics identified lipid peroxidation as a prominent feature in human plasma of patients with coronary heart diseases. **Redox Biology**, v. 12, p. 899–907, 2017.
- MEEUSEN, J. W. et al. Plasma ceramides a novel predictor of major adverse cardiovascular events after coronary angiography. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 8, p. 1933–1939, 2018.
- MEIKLE, P. J. et al. Plasma lipidomic analysis of stable and unstable coronary artery disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 11, p. 2723–2732, 2011.
- NAVRATIL, A. R. et al. Lipin-1 contributes to modified low-density lipoprotein-elicited macrophage pro-inflammatory responses. **Atherosclerosis**, v. 242, n. 2, p. 424–432, 2015.
- PAN, W. et al. Elevation of ceramide and activation of secretory acid sphingomyelinase in patients with acute coronary syndromes. **Coronary Artery Disease**, v. 25, n. 3, p. 230–235, 2014.
- QIU, H. et al. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 21, p. 8161–8166, 2006.
- ROSENSON, R. S. New technologies personalize diagnostics and therapeutics. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 12, n. 3, p. 184–186, 2010.
- ROTHER, E. et al. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. **Circulation**, v. 108, n. 6, p. 741–747, 2003.
- SCHILKE, R. M. et al. Macrophage-Associated Lipin-1 Promotes β -Oxidation in Response to Proresolving Stimuli. **ImmunoHorizons**, v. 4, n. 10, p. 659–669, 2020.
- SCHULZE-LUEHRMANN, J.; GHOSH, S. Antigen-Receptor Signaling to Nuclear Factor κ B. **Immunity**, v. 25, n. 5, p. 701–715, 2006.
- SIESS, W. et al. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low-density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 12, p. 6931–6936, 1999.
- SKOTLAND, T. et al. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2020.
- SMYTH, S. S. et al. Roles of lysophosphatidic acid in cardiovascular physiology and disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1781, n. 9, p. 563–570, 2008.
- THEODORIDIS, G. A. et al. Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 7–16, 2012.

- TOKUMURA, A. et al. Increased formation of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in serum of hypercholesterolemic rabbits. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 2, p. 307–315, 2002.
- TUOMINEN, A. et al. A natural antibody to oxidized cardiolipin binds to oxidized low-density lipoprotein, apoptotic cells, and atherosclerotic lesions. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 9, p. 2096–2102, 2006.
- TURER, A. T. et al. Metabolomic profiling reveals distinct patterns of myocardial substrate use in humans with coronary artery disease or left ventricular dysfunction during surgical ischemia/reperfusion. **Circulation**, v. 119, n. 13, p. 1736–1746, 2009.
- VERHEYE, S. et al. Selective Clearance of Macrophages in Atherosclerotic Plaques by Autophagy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 6, p. 706–715, 2007.
- VISSCHER, M. et al. Data Processing Pipeline for Lipid Profiling of Carotid Atherosclerotic Plaque with Mass Spectrometry Imaging. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 30, n. 9, p. 1790–1800, 2019.
- WAN, M. et al. Oxidized but not native cardiolipin has pro-inflammatory effects, which are inhibited by Annexin A5. **Atherosclerosis**, v. 235, n. 2, p. 592–598, 2014.



Capítulo 4

Apêndice

1 Cópia do parecer da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília/Plataforma Brasil

Saúde
Ministério da Saúde

principal
x sair

Público
Pesquisador
Alterar Meus Dados
MARIANA UBALDO BARBOSA PAIVA - Pesquisador | V3.2

Cadastros
Sua sessão expira em: 40min 00

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil lipídômico como marcador de risco de placa coronariana em pacientes assintomáticos de risco intermediário para eventos cardiovasculares.
Pesquisador Responsável: MARIANA UBALDO BARBOSA PAIVA
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 86928217.6.0000.5558
Submetido em: 13/06/2018
Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1007938

+ DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO

Apreciação	Pesquisador Responsável	Versão	Submissão	Modificação	Situação	Exclusiva do Centro Coord.	Ações
PO	MARIANA UBALDO BARBOSA PAIVA	2	13/06/2018	09/07/2018	Aprovado	Não	

+ HISTÓRICO DE TRÂMITES

LEGENDA:

(*) Apreciação

PO = Projeto Original de Centro Coordenador	POp = Projeto Original de Centro Participante	POc = Projeto Original de Centro Coparticipante
E = Emenda de Centro Coordenador	Ep = Emenda de Centro Participante	Ec = Emenda de Centro Coparticipante
N = Notificação de Centro Coordenador	Np = Notificação de Centro Participante	Nc = Notificação de Centro Coparticipante

(*) Formação do CAAE

Ano de submissão do Projeto						Tipo do centro			Código do Comitê que está analisando o projeto										
n	n	n	n	n	n	a	a	.	dv	.	t	x	x	x	.	l	l	l	l
Sequencial para todos os Projetos submetidos para apreciação						Digito verificador			Sequencial, quando estudo possui Centro(s) Participante(s) e/ou Coparticipante(s)										

Voltar

Este sistema foi desenvolvido para o navegador Mozilla Firefox.
(versão 9 ou superior)

Conselho Nacional de Saúde
Ministério da Saúde

2. Cópia do parecer da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Cardiologia do Distrito Federal (ICDF)

	INSTITUTO DE CARDIOLOGIA – DISTRITO FEDERAL FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE CARDIOLOGIA COMISSÃO CIENTÍFICA				
	Localizador: 15.01.30.00	Formulário: Comissão Científica 030/2017	Criação do documento: Qualidade	Data Elaboração: 07/12/2017	
Título: Termo de autorização para realização da pesquisa					

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Eu, **Núbia Welerson Vieira**, Superintendente, RG N° 3248432-MG, CPF N° 750.553.416-53 e **Guilherme Monte Urpie**, CPF N° 673.249.165-20 AUTORIZO: **Mariana Ulbaldo Barbosa Paiva**, realizar uma pesquisa institucional no setor Centro Cirúrgico com o objetivo **(Selecionar por meio de banco de dados, pacientes que realizaram angiogramografia de artérias coronarianas nos últimos 3 meses).**

O(s) pesquisador(es) acima qualificado(s) se compromete(m) a:

- 1- Iniciarem a coleta de dados somente após o Projeto de Pesquisa ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, caso seja necessário.
- 2- Obedecerem às disposições éticas de proteger os participantes da pesquisa, garantindo-lhes o máximo de benefícios e o mínimo de riscos, caso seja necessário.
- 3- Assegurarem a privacidade das pessoas citadas nos documentos institucionais e/ou contatadas diretamente, de modo a proteger suas imagens, bem como garantem que não utilizarão as informações coletadas em prejuízo dessas pessoas e/ou da instituição, respeitando deste modo as Diretrizes Éticas da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, nos termos estabelecidos na Resolução CNS N° 466/2012, e obedecendo as disposições legais estabelecidas na Constituição Federal Brasileira, artigo 5º, incisos X e XIV e no Novo Código Civil, artigo 20.
- 4- Assegurar a privacidade de informações de modo a proteger a imagem da Instituição.

Brasília, 19 de fevereiro de 2018.

Núbia Welerson Vieira
 Dra. Núbia Welerson Vieira
 Superintendente
 ICDF/FUC
 Fundação Universitária de Cardiologia

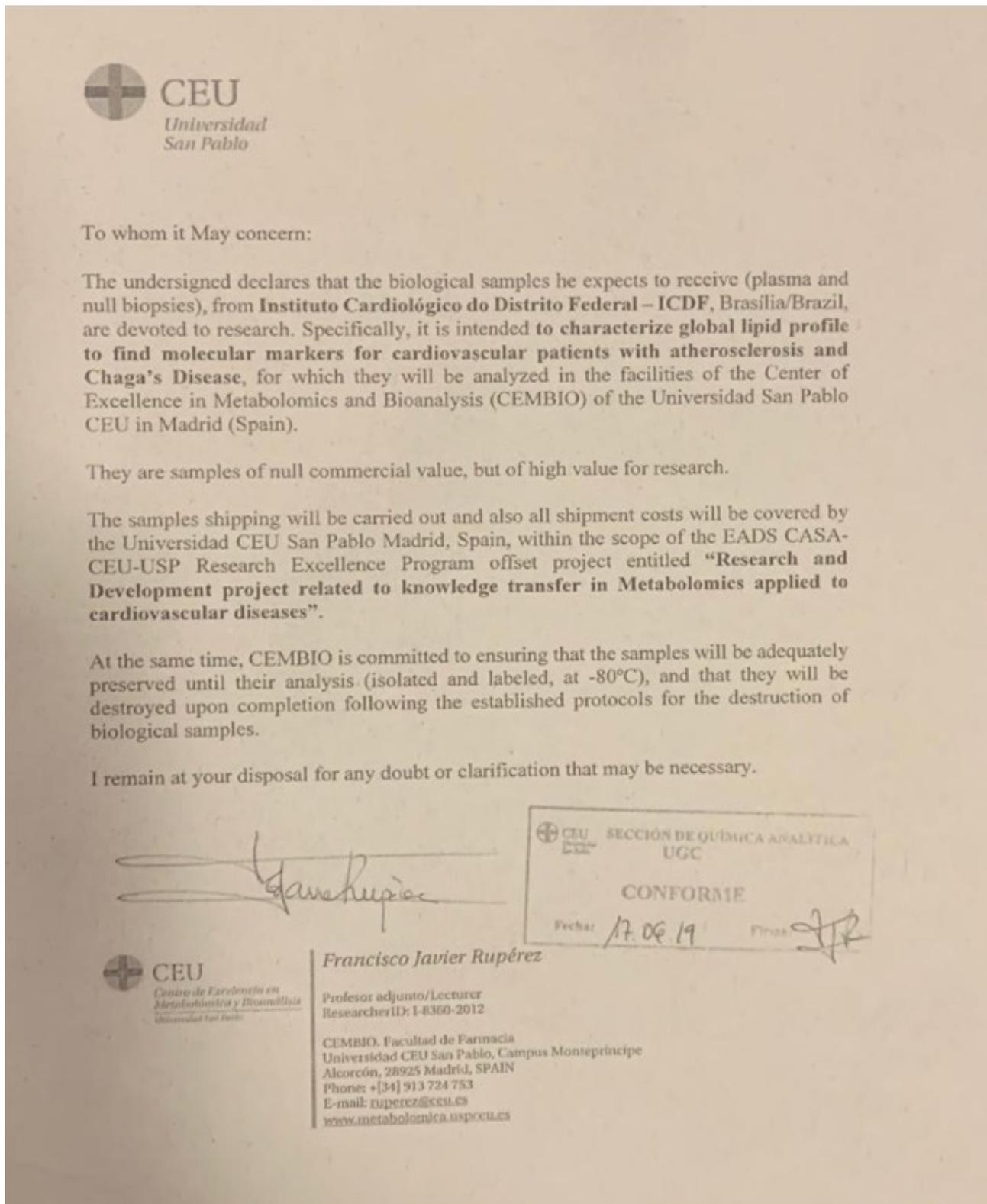
Dra. Núbia Welerson Vieira
 Superintendente
 Instituto de Cardiologia do Distrito Federal
 Fundação Universitária de Cardiologia

Fernando Atik
 Dr. Fernando Atik
 Cirurgião Cardiovascular
 CRM-DF 14789 ICDF
 Fundação Universitária de Cardiologia
 Fernando Antibas Atik
 Coordenador Médico
 Instituto de Cardiologia do Distrito Federal
 Fundação Universitária de Cardiologia

Mariana Ulbaldo Barbosa Paiva
 Mariana Ulbaldo Brabosa Paiva
 Medicina
 Faculdade de Medicina - FMD

Setor HFA – Hospital Forças Armadas, Setor Sudoeste, S/N – Brasília-DF CEP: 70.673-900
 Telefones: (61) 3403-5442 / (61) 3403-5418 / (61) 3403-5410 / (61) 3403-5552
 e-mail: cursos@icdf.org.br | Site: www.icdf.org.br

3. Cópia da declaração CEMBIO Facultad de Farmacia Universidade CEU San Pablo em Madri/Espanha



4. Cópia do Termo de Concordância de Instituição Co-participante Cardiológica



CARDIOCLÍNICA
Cardiologia e Arritmias

SHIS 716 - Conjunto L - Sala 1 a 6 - Centro Clínico Sul - Torre I
Fones: (61) 3245 3566 / 3245 3404 Brasília - Distrito Federal - CEP 70390 700

**TERMO DE CONCORDÂNCIA DE
INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE**

O Dr Ayrton Klier Péres da clínica **CARDIOCLÍNICA – Cardiologia e Arritmias**, está ciente de suas corresponsabilidades como instituição coparticipante no cumprimento da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, na realização do projeto de pesquisa “Perfil lipídômico como marcador de risco de placa coronariana em pacientes assintomáticos de risco intermediário para eventos cardiovasculares”, de responsabilidade da pesquisadora Mariana Ubaldo Barbosa Paiva, para recrutamento de pacientes com critérios de inclusão no estudo, a partir da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como instituição proponente do projeto de pesquisa.

O estudo envolve a realização de entrevistas aos pacientes atendidos na clínica e realização de ecocardiograma transtorácico com Doppler colorido e ultrassonografia de artérias carótidas e vertebrais nestes pacientes. Tem duração de 2 anos com previsão de início para fevereiro de 2018.

Brasília, 26 / janeiro / 2018.

Director responsável da Clínica:

Ayrton Klier Péres
Nome/Assinatura/Carimbo Ayrton Klier Péres
Cardiologista
1176 DF

Pesquisador Responsável pelo protocolo de pesquisa:

Mariana Ubaldo Barbosa Paiva
Nome/Assinatura Dr. Mariana Ubaldo Barbosa Paiva
Cardiologista
CRM - DF 18448

**6. Cópia do parecer de aprovação do credenciamento da Prof^a. Dr^a.
Aline Martins como Co-orientadora do projeto.**

ATO DE CREDENCIAMENTO DO DECANATO DE PÓS-GRADUAÇÃO (DPG) Nº 505/2021

O DECANO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, no uso de suas atribuições, e *ad referendum* da Câmara de Pesquisa e Pós-Graduação e à vista do constante no Processo Eletrônico nº 23106.084390/2020-31,

RESOLVE:

Credenciar o (a) professor (a) Aline Maria Araújo Martins para coorientar o (a) aluno (a) de Doutorado Acadêmico, Mariana Ubaldo Barbosa Paiva, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. O presente credenciamento é válido até a data de homologação da defesa da dissertação e/ou tese pelo DPG.

Lucio Remuzat Rennó Junior
Decano de Pós-graduação

Brasília, 11 de junho de 2021.

Documento assinado eletronicamente por **Lucio Remuzat Renno Junior, Decano(a) do Decanato de Pós-Graduação**, em 11/06/2021, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento na Instrução da Reitoria

7. Manuscrito publicado durante o doutorado

Martins AMA, Paiva MUB, Paiva DVN, de Oliveira RM, Machado HL, Alves LJSR, Picossi CRC, Faccio AT, Tavares MFM, Barbas C, Giraldez VZR, Santos RD, Monte GU, Atik FA. Innovative Approaches to Assess Intermediate Cardiovascular Risk Subjects: A Review From Clinical to Metabolomics Strategies. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021 December; 8:788062. doi: 10.3389/fcvm.2021.8788062.



published: 22 December 2021
doi: 10.3389/fcvm.2021.788062



Innovative Approaches to Assess Intermediate Cardiovascular Risk Subjects: A Review From Clinical to Metabolomics Strategies

OPEN ACCESS

Edited by:
Turgay Celik,
VM Medical Park Ankara
(Kecioren), Turkey

Reviewed by:
Pompilio Faggiano,
Fondazione Poliambulanza Istituto
Ospedaliero, Italy
Irene R. Degano,
Centro de Investigación Biomédica en
Red en Enfermedades
Cardiovasculares (CIBERCV), Spain

***Correspondence:**
Aline M. A. Martins
alin3.m4rtins@gmail.com
Mariana U. B. Paiva
mubp2505@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:
This article was submitted to
Coronary Artery Disease,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 01 October 2021
Accepted: 22 November 2021
Published: 22 December 2021

Citation:
Martins AMA, Paiva MUB, Paiva DVN,
de Oliveira RM, Machado HL,
Alves LJSR, Picossi CRC, Faccio AT,
Tavares MFM, Barbas C,
Giraldez VZR, Santos RD, Monte GU
and Atik FA (2021) Innovative
Approaches to Assess Intermediate
Cardiovascular Risk Subjects: A
Review From Clinical to Metabolomics
Strategies.
Front. Cardiovasc. Med. 8:788062.
doi: 10.3389/fcvm.2021.788062

Keywords: risk stratification, coronary artery disease (CAD), metabolomics, atherosclerosis, cardiovascular prevention

Current risk stratification strategies for coronary artery disease (CAD) have low predictive value in asymptomatic subjects classified as intermediate cardiovascular risk. This is relevant because not all coronary events occur in individuals with traditional multiple risk factors. Most importantly, the first manifestation of the disease may be either sudden cardiac death or acute coronary syndrome, after rupture and thrombosis of an unstable non-obstructive atherosclerotic plaque, which was previously silent. The inaccurate stratification using the current models may ultimately subject the individual to excessive or insufficient preventive therapies. A breakthrough in the comprehension of the molecular mechanisms governing the atherosclerosis pathology has driven many researches toward the necessity for a better risk stratification. In this Review, we discuss how metabolomics screening integrated with traditional risk assessments becomes a powerful approach to improve non-invasive CAD subclinical diagnostics. In addition, this Review highlights the findings of metabolomics studies performed by two relevant analytical platforms in current use—mass spectrometry (MS) hyphenated to separation techniques and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)—and evaluates critically the challenges for further clinical implementation of metabolomics data. We also discuss the modern understanding of the pathophysiology of atherosclerosis and the limitations of traditional analytical methods. Our aim is to show how discriminant metabolites originated from metabolomics approaches may become promising candidate molecules to aid intermediate risk patient stratification for cardiovascular events and how these tools could successfully meet the demands to translate cardiovascular metabolic biomarkers into clinical settings.

8. Manuscrito publicado durante o doutorado

Otto MEB, Martins AMA, Campos Dall'Orto AdOM, Leite SF, de Queiroz Maurício Filho MAF, Martins NT, de Araújo SR, Almeida SV, Paiva MUB, Atik FA. **Acute Cellular Rejection in Heart Transplant Patients: insights of Global Longitudinal Strain, Myocardial work, and an Exclusive Group of Chagas Disease.** *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022 April; 9:841698. doi: 10.3389/fcvm.2022.841698.

 | Frontiers in **Cardiovascular Medicine**

ORIGINAL RESEARCH
published: 27 April 2022
doi: 10.3389/fcvm.2022.841698



Acute Cellular Rejection in Heart Transplant Patients: Insights of Global Longitudinal Strain, Myocardial Work, and an Exclusive Group of Chagas Disease

Maria Estefânia Bosco Otto^{1}, Aline Maria Araújo Martins², Aline de Oliveira Martins Campos Dall'Orto¹, Simone Ferreira Leite¹, Marco Antonio Freitas de Queiroz Mauricio Filho¹, Natalia Taveira Martins¹, Samuel Rabelo de Araújo¹, Soraya Vasconcelos Almeida¹, Mariana Ubaldo Barbosa Paiva² and Fernando Antibas Atik^{1,2}*

OPEN ACCESS

Edited by:
Mingxing Xie,
Huazhong University of Science
and Technology, China

Reviewed by:
Marcelo Miglironza,
Federal University of Health Sciences
of Porto Alegre, Brazil
Dan Nistor,
Târgu Mureș Emergency Institute
for Cardiovascular Diseases
and Transplantation (IUBCVT),
Romania

***Correspondence:**
Maria Estefânia Bosco Otto
mariaestefaniaotto@gmail.com

Specialty section:
This article was submitted to
Heart Failure and Transplantation,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 22 December 2021
Accepted: 28 March 2022
Published: 27 April 2022

Citation:
Otto MEB, Martins AMA,
Campos Dall'Orto AdOM, Leite SF,
de Queiroz Mauricio Filho MAF,
Martins NT, de Araújo SR,
Almeida SV, Paiva MUB and Atik FA
(2022) Acute Cellular Rejection
in Heart Transplant Patients: Insights
of Global Longitudinal Strain,
Myocardial Work, and an Exclusive
Group of Chagas Disease.
Front. Cardiovasc. Med. 9:841698.
doi: 10.3389/fcvm.2022.841698

Background: Echocardiographic markers associated with asymptomatic acute cellular rejection (ACR) in patients with orthotopic heart transplant (HT) are still under investigation. The aim of our study was to determine clinical and myocardial strain imaging (MSI) variables evaluated by echocardiography associated with ACR in the first year of HT. A separate analysis was performed to compare variables during the first 6 months of HT, when ACR has a prevalence in 60% of patients. Another analysis evaluated an exclusive population with Chagas disease as the cause of HT.

Methods: We prospectively studied 67 patients with less than 1 year of HT, 36 patients without ACR (41% men, age 49 ± 12 years, 52% Chagas disease as the cause of heart failure), and 31 patients with ACR (59% men, age 55 ± 8 years, 74% Chagas disease as the cause of heart failure). Conventional echocardiographic measurements and MSI by global longitudinal strain (GLS) from the left ventricle (LV) and right ventricle free wall (RV-FWLS) and myocardial work (MW) from the left ventricle were obtained by experienced echocardiologists. Clinical variables, such as the presence of diabetes, hypertension, and immunosuppressant drugs, were compared between groups.

Results: HT patients with ACR were older and used more cyclosporine for immunosuppression. The positive ACR group had an increased relative wall thickness and LV mass index and similar LVGLS and RV-FWLS compared to the negative ACR group. Nevertheless, MW analysis observed increased global work efficiency (GWE) in positive ACR. Multivariate analysis identified older age, cyclosporine use, LV mass index, and GWE as independent predictors for detecting rejection. A separate analysis was performed for patients with less than 6 months of HT. Similar MSI was observed in both groups, with a trend for increased GWE in patients with ACR and significantly increased LV mass index in the ACR group. An exclusive group of Chagas patients as the primary cause of HT was analyzed, and similar MSI results for LVGLS, RV-FWLS, and MW were observed for both ACR and the no rejection groups. Additionally, the survival rates at 2 years were similar between the Chagas disease groups.

Frontiers in Cardiovascular Medicine | www.frontiersin.org

1

April 2022 | Volume 9 | Article 841698

9. Manuscrito submetido durante o doutorado

de Oliveira RM, MUB, Paiva MUB, Picossi CRC, Paiva DVN, Ricart CAO, Ruperez FJ, Barbas C, Atik FA, Martins AMA. **Plasma metabolomics of chronic chagasic and idiopathic dilated cardiomyopathies heart failure patients.** Submetido à *Transplantation*

