

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS
DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA
TESE DE DOUTORADO**

MARIA GABRIELA VALLE GOTTLIEB

**ASSOCIAÇÃO ENTRE SÍNDROME METABÓLICA,
ALBUMINA MODIFICADA PELA ISQUEMIA (IMA) E
BIOMARCADORES ATERTROMBÓTICOS**

**Porto Alegre
2009**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

ASSOCIAÇÃO ENTRE SÍNDROME METABÓLICA, ALBUMINA MODIFICADA
PELA ISQUEMIA (IMA) E BIOMARCADORES ATERTROMBÓTICOS

Tese de Doutorado Submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande de Sul-PUCRS, como requisito à obtenção do título de Doutor em Medicina e Ciências da Saúde.

MARIA GABRIELA VALLE GOTTLIEB

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Bodanese

Porto Alegre, Outubro de 2009.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

G686a Gottlieb, Maria Gabriela Valle

Associação entre síndrome metabólica, albumina modificada pela isquemia e biomarcadores aterotrombóticos / Maria Gabriela Valle Gottlieb. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

136 f.: il. tab.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Carlos Bodanese.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. SÍNDROME X METABÓLICA/fisiopatologia. 2. MARCADORES BIOLÓGICOS. 3. INFLAMAÇÃO. 4. TROMBOSE. 5. ALBUMINA SÉRICA. 6. ISQUEMIA/sangue. 7. DOENÇAS CARDIOVASCULARES/metabolismo. 8. FATORES DE RISCO. 9. ESTRESSE OXIDATIVO. 10. ESTUDOS PROSPECTIVOS. 11. ESTUDOS DE CASOS E CONTROLE. I. Bodanese, Luiz Carlos. II. Título.

C.D.D.616.39

C.D.U. 616.39:616.12-008.1(043.2)

N.L.M. WK 820

MARIA GABRIELA VALLE GOTTLIEB

**ASSOCIAÇÃO ENTRE SÍNDROME METABÓLICA, ALBUMINA MODIFICADA
PELA ISQUEMIA E BIOMARCADORES ATEROTROMBÓTICOS**

Tese de Doutorado Submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande de Sul-PUCRS, como requisito à obtenção do título de Doutor em Medicina e Ciências da Saúde.

Aprovada em _____ de _____ de _____.

Banca Examinadora:

Dra. Maria Cristina Pansera de Araújo- UNIJUÍ

Dra. Ana Maria Brito Medeiros- PUCRS

Dr. Rodolfo Herberto Schneider- PUCRS

Dr. Mário Wiehe- PUCRS

Ao Universo por ter me oferecido a oportunidade de encontrar, nessa vida, não somente o meu verdadeiro coração, Guilherme Dornelles, como também pessoas maravilhosas, que estão sempre conspirando para que o meu caminho seja mais suave.

AGRADECIMENTOS

O destino define quem encontramos na vida, mas as atitudes definem quem permanece em nossas vidas! Muitas são as pessoas que permanecem na minha história de vida, porém, nesse momento, vou dedicar um especial agradecimento àquelas que contribuíram de forma inestimável para eu chegar até aqui.

Começo agradecendo do fundo do meu coração à minha eterna orientadora Professora Dra. Ivana Beatrice Mânica da Cruz, que depositou em mim toda a confiança, desde a iniciação científica, lá em 1997 no laboratório de biologia do desenvolvimento do Departamento de Genética da UFRGS. Nesse momento, eu descobri a minha verdadeira vocação, que é o fazer ciência. Acredito que se não tivéssemos nos encontrado, eu não teria seguido por esse caminho extraordinário e fantástico da pesquisa. O que dizer sobre essa cientista “fantástica”? A única coisa que posso dizer é que és uma admirável semeadora de ciência, amizade e solidariedade, que contagia a todos que passam por perto. Obrigada por me ajudar a ser parte do que sou e me mostrar o caminho com tanto amor e dedicação!

À minha irmã científica Professora Dra. Carla Helena Schwanke por ser como um anjo, não somente por me guiar pelos intrincados caminhos do fazer ciência, mas principalmente, por sempre conseguir me passar serenidade para continuar no caminho. Obrigada pela parceria, paciência e pelo apoio irrestrito!

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Bodanese por ter me recebido para o doutorado de portas abertas! Depositou em mim toda a confiança, orientou e apoiou de forma incontestável e com um entusiasmo contagiante todo o meu trabalho. O senhor é um

fiel depositário da minha eterna gratidão! Obrigada por me ajudar a subir mais um degrau da ciência!

Ao Professor Doutor Rafael Moresco e a Marta Duarte pela parceria, suporte técnico e laboratorial para a mensuração dos marcadores bioquímicos! Obrigada pela total disposição em apoiar a realização dos experimentos!

À minha irmã Dulce Gottlieb, que quando eu tinha 5 anos de idade me ensinou a ler e escrever e, em 1995, sugeriu que eu devia cursar ciências biológicas e fazer pesquisa em genética. Agora tenho certeza que ela estava redondamente certa! Pelo apoio incondicional e pela vibração a cada telefonema que dou a ela dizendo: ganhei um prêmio, meu artigo foi aceito para publicação ou quando sou convidada para alguma atividade associada à pesquisa. Obrigada pela força e apoio!

Aos meus outros irmãos por estarem sempre “quebrando meus galhos!” Sem essa imensa ajuda, acredito que ainda estaria no meio do caminho. Obrigada por todo apoio!

Aos meus pais por me darem todo o suporte e amparo para seguir em frente. Obrigada por existirem!

Aos meus sobrinhos pela torcida para que tudo dê muito certo para mim. Obrigada pelo companheirismo!

Aos meus sogros, e a minha cunhada e cunhado por não medirem esforços em me ajudar nesse período difícil de doutorado. Obrigada por toda ajuda desinteressada!

À amiga Bióloga e Dra. Jacqueline Piccoli, mesmo que longe, sempre disposta a me ajudar! Obrigada pela amizade e contribuição científica!

À Rosa e a Ellen por toda a paciência e auxílio na construção do meu projeto de tese de doutorado! Obrigada por todo auxílio!

As minhas amigas Tati e Kika que entenderam a minha distância e ausência. A compreensão de vocês foi fundamental para eu ter a tranqüilidade necessária para concluir esse trabalho! Um amigo de verdade é um anjo em nossas vidas! Obrigada pelo amor e amizade!

ANJOS EXISTEM! UM VIVA ÀS PESSOAS QUE PERMANECEM!

Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a
intenção das folhas; se houver folhas, valeu a intenção da semente!

(autor desconhecido)

“Ninguém pode construir, em teu lugar, as pontes que precisarás passar para
atravessar o rio da vida – ninguém exceto tu, só tu”.

Nietzsche

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo
em que ele nos transforma”.

John Ruskin

RESUMO

Introdução: síndrome metabólica (SM) é definida como um conjunto de anormalidades aterotrombóticas e inflamatórias. Seus portadores apresentam predisposição aumentada a morbi-mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Diversos biomarcadores inflamatórios, do metabolismo lipídico, oxidativo e isquêmico, ligados a fisiopatologia da SM têm sido investigados. Recentes estudos sugerem que a albumina modificada pela isquemia (IMA) é um biomarcador de isquemia e que seus níveis elevados representam uma possível indicação de disfunção microvascular em pacientes com SM. **Objetivo:** investigar a associação de marcadores lipídicos, oxidativos e inflamatórios potencialmente associados a processos isquêmicos em pacientes com síndrome metabólica. **Material e métodos:** estudo prospectivo, do tipo caso-controle, onde foram incluídos 32 (30,2%) indivíduos saudáveis (grupo controle – C) e 74 (69,8%) indivíduos com SM (grupo caso – SM). Os indivíduos com SM foram recrutados no ambulatório de risco cardiometabólico do Serviço de Cardiologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e os saudáveis foram recrutados na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM - alunos, funcionários e professores). O critério diagnóstico de SM utilizado foi o NCEP-ATPIII. Glicose, colesterol total (CT), HDL e triglicerídeos (TG) foram determinados por método enzimático colorimétrico (Ortho-clinical Diagnostics); LDL foi determinada pela equação de Friedwald; Proteína C ultra Sensível (PCR-us) foi determinada por nefelometria, autoanticorpo anti-LDL-oxidada (anti-OxLDL) e LDL oxidada (OxLDL) foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA); IMA foi mensurada por ensaio colorimétrico com cobalto. **Resultados:** a amostra incluiu 34 homens e 72 mulheres. A média de idade do grupo C foi $55,2 \pm 8,8$ anos e do grupo SM $57,6 \pm 8,3$ anos ($p=0,142$). O grupo SM apresentou maior IMC ($32,6 \pm 6,1$ kg/m², $p=0,0001$), pressão arterial sistólica ($147 \pm 26,8$ mmHg, $p=0,001$), pressão arterial diastólica ($85,9 \pm 15,9$ mmHg, $p=0,01$), glicose ($133,7 \pm 68,7$ mg/dL, $p=0,001$), CT ($204 \pm 58,1$ mg/dL, $p=0,001$), LDL ($114,4 \pm 49,5$ mg/dL, $p=0,001$), TG ($214,9 \pm 34,8$ mg/dL, $p=0,001$) em comparação com o grupo C. Níveis de IMA, PCR-us, IL-6, OxLDL e anti-OxLDL foram significativamente mais elevados ($0,618 \pm 0,1355$, $p=0,0001$; $1,72 \pm 0,964$, $p=0,0001$; $53,20 \pm 14,52$, $p=0,0001$; $0,662 \pm 0,461$, $p=0,001$; $27,822 \pm 17,010$, $p=0,001$) respectivamente no grupo SM, em relação ao grupo C. A análise multivariada mostrou associação entre níveis elevados de IMA e SM e esta foi independente de sexo, idade DM2 e hipercolesterolemia ($p=0,0405$). Conclusão: no presente estudo, observou-se associação entre IMA, biomarcadores inflamatórios, do metabolismo lipídico e oxidativo com SM, indicando que esses indivíduos portadores de SM estão mais propensos a desencadear processos aterotrombóticos. Estudos adicionais envolvendo interações genéticas e ambientais em pacientes com SM podem contribuir para elucidarmos o potencial papel clínico da IMA, para que se torne um preditor de eventos aterotrombóticos, com vistas à diminuição da morbi-mortalidade cardiovascular.

Palavras-chave: Síndrome Metabólica, Fatores de Risco Cardiometabólicos, Albumina Modificada pela Isquemia (IMA), Biomarcadores Aterotrombóticos.

ABSTRACT

Introduction: metabolic syndrome (MS) is defined as a set of atherothrombotic and inflammatory abnormalities. These patients are predisposed to increased morbidity and mortality from cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes mellitus (DM2). Several inflammatory biomarkers of lipid metabolism-related oxidative and ischemic pathophysiology of MS have been investigated. Recent studies suggest that ischemia modified albumin (IMA) is a biomarker of ischemia and that its levels are a possible indication of microvascular dysfunction in patients with MS. **Objective:** to investigate the association between these lipids, oxidatives and inflammatory processes potentially associated with ischemic in patients with MS. **Material and methods:** prospective, case-control study that included 32 (30.2%) healthy subjects (control - C) and 74 (69.8%) subjects with MS (case group - MS). Individuals with MS were recruited at cardiometabolic risk center of Cardiology Service, Hospital São Lucas da Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul and the healthy were recruited from the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM - students, staff and teachers). The diagnostic criteria of MS was used NCEP-ATPIII. Glucose, total cholesterol (TC), HDL and triglycerides (TG) were determined by enzymatic colorimetric method (Ortho-Clinical Diagnostics), LDL was determined by the Friedewald equation; ultra C-sensitive protein (CRP) was measured by nephelometry, autoantibody anti-oxidized LDL (anti -oxLDL) and oxidized LDL (oxLDL) were determined by ELISA; IMA was measured by colorimetric assay with cobalt. **Results:** The sample included 34 men and 72 women. The average age of group C was 55.2 ± 8.8 years and the MS group 57.6 ± 8.3 years ($p = 0.142$). The MS group had a higher BMI (32.6 ± 6.1 kg/m², $p = 0.0001$), systolic blood pressure (147 ± 26.8 mmHg, $p = 0.001$), diastolic blood pressure (85.9 ± 15.9 mmHg, $p = 0.01$), glucose (133.7 ± 68.7 mg/dL, $p=0.001$), TC (204 ± 58.1 mg/dL, $p=0.001$), LDL (114.4 ± 49.5 mg/dL, $p=0.001$), TG (214.9 ± 34.8 mg/dL, $p=0.0001$) compared with C group. IMA levels, CRP, IL-6, oxLDL and anti-oxLDL were significantly higher (0.618 ± 0.1355 , $p=0.0001$; 1.72 ± 0.964 , $p=0.0001$; 53.20 ± 14.52 , $p=0.0001$; 0.662 ± 0.461 , $p= 0.001$; $27,822 \pm 17,010$, $p=0.001$) respectively in MS group, compared to C group. Multivariate analysis showed an association between elevated levels of IMA and MS and this was independent of sex, age, DM2 and hypercholesterolemia ($p=0,0405$). **Conclusion:** This study reports an association between IMA, inflammatory biomarkers of oxidative and lipid metabolism with MS, indicating that those individuals with MS are more likely to trigger the atherothrombotic events. Additional studies involving genetic and environmental interactions in patients with MS can help to elucidate the potential clinical role of the IMA, to become a predictor of atherothrombotic events, aiming to reduce the morbidity and mortality by CVD.

Key-words: Metabolic Syndrome, Cardiometabolic Risk Factors, Ischemia-Modified Albumin (IMA), Atherothrombotic Biomarkers.

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1 Comparação de ingestão de energia e variáveis biológicas entre diferentes populações.....	27
Quadro 2 Diferentes critérios diagnósticos para a caracterização da síndrome metabólica.....	29
Figura 1 Configuração eletrônica do radical superóxido.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características gerais dos indivíduos com e sem SM participantes do estudo.....	61
Tabela 2 Comparação entre biomarcadores lipídicos, oxidativos, inflamatórios e isquêmico em indivíduos saudáveis e com SM.....	62
Tabela 3 Correlação entre albumina modificada pela isquemia (IMA) e variáveis bioquímicas e antropométricas em indivíduos com e sem SM.....	63
Tabela 4 Comparação de marcadores aterotrombóticos e isquêmico em indivíduos com síndrome metabólica com e sem DM2.....	67
Tabela 5 Comparação de marcadores aterotrombóticos e isquêmico em indivíduos com síndrome metabólica com e sem hipercolesterolemia.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

% gordura= porcentagem de gordura corporal

-13-HPODE= 13-hidroperoxioctadecadienoico

AI= angina instável

Anti-OxLDL = Anticorpo antilipoproteína de Baixa Densidade Oxidada

apo B-100 = Apoproteína B-100

APOE = Apolipoproteína E

ATP = Adenosina Trifosfato

ATP III = Adult Treatment Panel

AVC = Acidente Vascular Cerebral

CARDIA = Coronary Artery Risk Development in Young Adults

DAC = Doença Arterial Coronariana

DCNT = Doenças Crônicas Não-Transmissíveis

DCV = Doenças Cardiovasculares

DM2 = Diabete mellitus do Tipo 2

EAOs = Espécies Ativas de Oxigênio

ECG = Eletrocardiograma

FADH₂ = Flavina-Adenina-Dinucleotídeo

GR = Glutathione Redutase

GSH = Glutathione

H₂O₂ = Peróxido de Hidrogênio

HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica

HDL-c = Lipoproteína de alta densidade Colesterol

HO₂. = Hidroperoxila

HOMA B% = Função Das Células B

HOMA S% = Insulina Sensível

IAM = Infarto Agudo do Miocárdio

IDF = International Diabetes Federation

IL-6 = Interleucina-6

IMA = Albumina Modificada pela Isquemia

IMC = Índice de Massa Corporal

LDL-c = Lipoproteína de Baixa Densidade Colesterol

MDA = Malondialdeído

MMEA = Massa Do Músculo Esquelético Apendicular

MM-LDL-OX = Lipoproteína de Baixa Densidade minimamente oxidada

NADH = Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo

NCEP- ATPIII - Third Report of the National Cholesterol Education Expert Panel on
Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol

NHANES = National Health and Nutritional Examination Survey

O₂-• = Radicais Superóxido,

OH = Hidroxila

OxLDL = Liproteína de Baixa Densidade Oxidada

PAD = Pressão Arterial Diastólica

PAI-1 = Inibidor do Ativador do Plasminogênio

PAS = Pressão Arterial Sistólica

PCR- us = Proteína C Ultra Sensível

Q10 = Coenzima Q

RL = Radicais Livres

SCA = Síndrome Coronariana Aguda

SM = Síndrome Metabólica

SOD = Superóxido Dismutase

SOD1 = Superóxido Dismutase Citosólica Dependente de Cobre e Zinco

SOD2 = Superóxido Dismutase Mitocondrial Dependente de Manganês

SOD3 = Superóxido Dismutase Extracelular Dependente de Cobre e Zinco

TCA = Ácido Tricarboxílico

TG = Triglicerídeos

TNF- α = Fator de Necrose Tumoral α

χ^2 = teste do qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	Risco Cardiometabólico.....	21
2.2	Epidemiologia e um Breve Histórico sobre a Evolução da Síndrome Metabólica.....	23
2.3	CrITÉrios DiagnÓsticos para a Síndrome MetabÓlica.....	27
2.4	Aspectos Gerais da Fisiopatologia na Síndrome MetabÓlica.....	30
2.4.1	Síndrome MetabÓlica e Metabolismo Oxidativo e Antioxidante.....	31
2.4.2	Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada (OxLDL) como Biomarcador Lipídico e Oxidativo Associado à Síndrome MetabÓlica.....	37
2.4.3	Biomarcadores InflamatÓrios Associados à Síndrome MetabÓlica.....	41
2.4.4	Biomarcador IsquÊMico Associado à Síndrome MetabÓlica: Albumina Modificada pela Isquemia (IMA).....	44
3	TESE E HIPÓTESE GERAL DO ESTUDO.....	48
4	OBJETIVOS.....	49
4.1	Objetivos específicos.....	49
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
5.1	Delineamento.....	50
5.2	População e amostra.....	50
5.2.1	Grupo Controle.....	50
5.2.2	Grupo Caso.....	51

5.2.3	Critérios de Inclusão.....	51
5.2.4	Critérios de exclusão.....	51
5.3	Variáveis Analisadas.....	52
5.3.1	Instrumentos.....	52
5.3.2	Variáveis Clínicas.....	56
5.4	Logística Geral.....	57
5.5	Análise Estatística.....	58
5.6	Ética.....	59
6	RESULTADOS.....	60
7	DISCUSSÃO.....	70
8	CONCLUSÕES.....	79
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
	REFRÊNCIAS.....	81
	Apêndice A – Carta de Pré Aceite do Artigo da Tese do <i>The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism</i>.....	100
	Apêndice B – Artigo Original da Tese.....	103
	Anexo 1 – Entrevista Estruturada.....	128
	Anexo 2 - o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	135

1 INTRODUÇÃO

Há duas décadas a discussão sobre o desencadeamento de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) tem se concentrado em torno do aparato genético-metabólico e estilo de vida de cada indivíduo ou de uma população. Tal discussão e estudos científicos a ela relacionados são de grande relevância em nível de saúde pública, uma vez que as doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de morbi-mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento, como é o caso do Brasil.¹

Em 2002, no Brasil, estas doenças foram responsáveis por 32% dos óbitos, o que equivale a 267,496 mortes.¹ Em relação aos estados, o Rio Grande do Sul lidera o número de óbitos por doenças cardiovasculares. Em 1996, enquanto a prevalência de mortes por DCV no Brasil era de 27,5%, o RS já apresentava uma prevalência de 31,6%. Apesar da leve queda observada entre 2003 a 2006, o Estado ainda se mantém entre os que apresentam maiores taxas de morbi-mortalidade cardiovascular.² No caso, doenças cardiovasculares são fortemente influenciadas por distúrbios de origem metabólica cuja influência na suscetibilidade a estas doenças ainda precisa ser melhor caracterizada.

Estudos tanto epidemiológicos, antropológicos quanto genético-evolutivos têm sugerido que a maioria das doenças crônicas, principalmente os distúrbios metabólicos, também chamados de *Síndromes da Modernidade* ou da *Civilização* tem um elo comum: o período de surgimento. Tais doenças surgiram concomitantemente à Revolução Agrícola, ao longo dos 10.000 anos passados quando o homem deixou de ser nômade e tornou-se sedentário. Além disso, desde

o Período Paleolítico (500.000 a.C. a 1.000 a.C.) o genoma humano permanece basicamente inalterado; ou seja, a taxa de mutação espontânea é baixa, aproximadamente 1×10^{-5} a 1×10^{-6} para o *Homo sapiens*.³ O que foi alterado nesse curto espaço de tempo foram os hábitos e estilo de vida do homem pós Revolução Agrícola. O homem primitivo tinha baixa ingestão calórica e alto gasto energético, o que influenciava a baixa expectativa de vida.⁴ O homem moderno, além de apresentar um aumento significativo na sua expectativa de vida ao nascer, permanece basicamente com o mesmo genoma de seus ancestrais pré-históricos, gerando um grande dilema, pois, evolutivamente, ainda não houve tempo de “reprogramar” o genoma e o aparato fisiológico para a vida moderna, com baixa atividade física, alta ingestão de alimentos hipercalóricos, promovendo a formação de Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs) ou Radicais Livres (RL) e o desencadeamento de doenças.

Assim, considerando o impacto do estilo de vida sobre a homeostase orgânica, que é geneticamente regulada, investigações sobre o papel do estresse oxidativo e do processo inflamatório em morbidades que envolvem alterações metabólicas é um tema central na pesquisa contemporânea.

Diversos estudos têm investigado o papel de marcadores do metabolismo oxidativo envolvidos na gênese de DCNT, e indicam uma associação positiva entre a quebra da homeostasia do metabolismo oxidativo e o aumento do risco para o DCNT, como diabetes tipo 2 (DM2), aterosclerose, obesidade e síndrome metabólica (SM).^{5,6,7,8,9}

A SM é considerada um distúrbio metabólico complexo, provocado pela quebra da homeostase corporal, razão pela qual é também definida como a “Síndrome da Civilização”.^{10,11,12} Por se tratar de um distúrbio que envolve o

metabolismo dos lipídeos, carboidratos, e proteínas provenientes da dieta, bem como programação e predisposição genética, marcadores bioquímicos relacionados com a sua etiologia têm sido intensamente investigados nos últimos anos.

Entre estes marcadores destacam-se os relacionados ao estresse oxidativo e inflamatório que alteram o metabolismo adiposo e corporal desencadeando modificações cardiovasculares importantes como é o caso da Proteína C reativa (PCR), interleucina-6 (IL-6) e a LDL-oxidada (OxLDL).^{8,11}

Recentemente, um marcador que parece fortemente associado à síndrome coronariana aguda (SCA) tem sido estudado: a albumina modificada pela isquemia (IMA). No caso, esta molécula parece ser formada em condições de baixa perfusão tecidual. Uma vez que estudos mais recentes sugeriram que tanto diabéticos, quanto indivíduos hipercolesterolêmicos apresentariam níveis elevados de IMA e que, até o presente momento, não existem estudos de associação desta molécula com SM, investigações sobre esta potencial associação podem ser consideradas de relevância científica e clínica.^{13,14}

Neste contexto, a presente tese pretende contribuir com um estudo que envolve a análise de marcadores do metabolismo lipídico, oxidativo, inflamatório e isquêmico entre indivíduos com e sem SM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Risco Cardiometabólico

Como as doenças cardiovasculares (DCVs) têm alta relevância epidemiológica e um alto custo de tratamento dos indivíduos afetados, o Brasil instituiu uma política para o controle das DCVs baseada no conceito de risco cardiovascular global. No caso, o risco global de uma pessoa identifica aquela que tem potencial para desenvolver doenças cardiovasculares antes mesmo dos primeiros sintomas. Ou seja, é importante, inicialmente ser avaliado o risco global de o indivíduo desenvolver doenças cardiovasculares em 10 anos. Para avaliar tal risco o Ministério da Saúde adotou e disponibiliza no seu site o Escore de *Framingham*.¹⁵ A adoção deste escore baseou-se nas seguintes considerações:

“Em um país com dimensões continentais, como o Brasil, a aplicação do Escore na Atenção Básica permitirá o diagnóstico precoce de pessoas em risco, identificando as medidas terapêuticas que poderão ser eficazes no tratamento e evitando a ocorrência de eventos cardiovasculares, muito deles fatais, evitando o sofrimento pessoal e familiar e reduzindo custos pra o sistema de saúde e a sociedade.”¹

Atualmente são considerados como principais fatores de risco cardiovascular:¹ (1) história familiar de doença arterial coronariana (DAC) prematura (familiar de 1º grau do sexo masculino que apresentou DAC < 55 anos e do sexo feminino com < 65 anos); (2) ser homem > 45 anos e mulher com > 55 anos; (3)

tabagismo; (4) hipercolesterolemia (LDL-c elevado); (5) hipertensão arterial sistêmica (>90 mmHg e > 140 mmHg); (6) diabetes mellitus tipo 2; (7) obesidade (Índice de Massa Corporal, IMC \geq 30 Kg/m²); (8) gordura abdominal (medida pela circunferência da cintura); (9) sedentarismo; (10) dieta pobre em frutas e vegetais; (11) estresse psico-social. Através do escore de *Framingham* é possível calcular o risco do indivíduo apresentar algum tipo de evento cardiovascular nos próximos dez anos é dividido em três categorias gerais: baixo, médio e alto.¹⁶

Muitos indivíduos apresentam três ou mais fatores de risco cardiometabólicos que caracteriza a síndrome metabólica. Assim pode-se dizer que a SM é um conjunto de fatores de risco cardiometabólicos, que consiste em alterações do metabolismo dos glicídios (hiperinsulinemia e resistência à insulina ou intolerância à glicose ou DM2), metabolismo dos lipídeos (aumento de triglicerídeos e HDL-c diminuídos), obesidade abdominal, alterações na pressão arterial (hipertensão) e distúrbios da coagulação (aumento da adesão plaquetária e do inibidor do ativador do plasminogênio-PAI-1). Também é caracterizada por um estado pró-inflamatório, apresentando aumento dos níveis circulantes de citocinas. É importante destacar a associação da SM com a doença cardiovascular, aumentando a mortalidade geral em cerca de 1,5 vezes e cardiovascular em aproximadamente 2,5 vezes.¹⁷ Todavia, pouco se conhece a respeito da origem da SM. A predisposição genética, a alimentação inadequada e o sedentarismo estão entre os principais fatores de risco que podem contribuir para o seu desencadeamento.¹⁷ Sobretudo, alguns estudos têm mostrado que a SM está associada tanto com o aumento do estresse oxidativo quanto com o processo inflamatório.^{9,18}

Entretanto, investigações complementares precisam ser realizadas a fim de se determinar que interações genético-ambientais podem aumentar o risco do

desenvolvimento da SM ou mesmo a progressão deste risco cardiometabólico para o DM2 e eventos coronarianos ou cérebro-vasculares. No caso, é importante também comentar qual foi o possível panorama epidemiológico que deu origem a grande epidemia de riscos cardiovasculares que afeta o mundo ocidental contemporâneo.

2.2 Epidemiologia e um Breve Histórico sobre a Evolução da Síndrome Metabólica

Uma das morbidades mais prevalentes atualmente é a SM e varia de acordo com a etnia, com as características próprias da população avaliada e com os critérios diagnósticos utilizados nos estudos.¹⁹ É uma condição de prevalência elevada e crescente em algumas populações, destacando-se as afro-descendentes, México - americanas e hispânicas.^{20,21} Além disso, os estudos têm mostrado que a incidência e prevalência da SM aumenta com a idade, principalmente depois dos 60 anos de idade, tanto em homens como em mulheres.¹⁹

Um estudo realizado pelo *National Health and Nutritional Examination Survey* (NHANES) avaliou a SM, de acordo com os critérios diagnósticos do *Adult Treatment Panel* (ATP III), em uma amostra de 12,363 homens e mulheres (US), mostrou uma prevalência de 22,8% em homens e 22,6% em mulheres. Além disso, mostrou que a SM estava presente em 4,6% nos indivíduos com peso normal, 22,4% nos indivíduos com sobrepeso e em 59,6% nos indivíduos obesos e o sedentarismo foi associado com o aumento do risco de desenvolvimento da síndrome.²²

Na Europa, a prevalência situa-se na faixa de 9,5% nos homens e 8,9% nas mulheres.²³ Em um estudo realizado na cidade do Porto em Portugal, a prevalência de SM em um grupo de mulheres obesas com idade entre 14 e 63 anos utilizando os critérios da ATP III e *International Diabetes Federation* (IDF) foi de 66,4% e 70,3%, respectivamente.²⁴

No Brasil, os dados sobre a incidência e a prevalência da SM ainda são pontuais e escassos. Entretanto, um estudo envolvendo mulheres entre 60 e 84 anos, realizado na cidade de Londrina, a prevalência de SM foi de 39,9%. No período de seguimento de sete anos, observou-se que 51,6% dessas mulheres apresentaram eventos cardiovasculares fatais e 49,4% não fatais.²⁵ Outro estudo realizado no Brasil, em Vitória-ES, mostrou uma prevalência de SM de 29,8% (critério diagnóstico NCEP-ATP III) em uma população entre 25 e 64 anos. A prevalência aumentou com a idade, sendo 15,8% no grupo mais jovem (26-34 anos) e 48,3% no grupo mais velho (55-64 anos).²⁶

Uma vez que a incidência da SM tem aumentado consideravelmente nos últimos anos tal distúrbio tem sido alvo constante de debate e investigação, principalmente a respeito de sua etiopatogênese e seu manejo clínico. Contudo, muitos estudos de base genética e evolutiva, postulam que a origem desse distúrbio tenha surgido ainda no período pré Revolução Agrícola.

Gottlieb et al.,²⁷ realizaram uma revisão sobre os principais aspectos genético-evolutivos e nutricionais envolvidos no desencadeamento da SM. Com base na literatura, os autores reportaram que nos últimos 10.000 anos, desde a Revolução Agrícola, o genoma humano basicamente não mudou, ou seja, a taxa de mutação espontânea para o DNA nuclear está estimada em 0,5% por milhão de anos.³ Portanto, os 10.000 anos passados ainda não foram suficientes para causar

expressivas mutações nos genes humanos. Entretanto, uma vez que os genes exprimem seus efeitos no fenótipo via reações bioquímicas, tais efeitos dependem do meio químico e físico em que essas reações ocorrem. Deste modo, o hábito alimentar e o estilo de vida, associados à atividade física da espécie humana podem ter sido cruciais para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos.¹² Estudos biogerontológicos evolutivos desenvolvidos por Finch e Stanford²⁸ sugerem que modificações dietéticas foram fundamentais, também para a evolução da própria longevidade humana, pois fez com que se fixassem variações genéticas associadas a menores taxas de morbidades crônicas. Por exemplo, o ser humano, quando comparado com o chimpanzé possui menor prevalência de doenças crônicas como a aterosclerose e as neurodegenerativas. Entretanto, a mudança no seu comportamento alimentar e de gasto energético que hoje é observada, reverte esta condição e aumenta o risco para o desencadeamento de doenças metabólicas.

Os estudos antropológicos e nutricionais sugerem que a dieta humana, incluindo ingestão energética e gasto energético, tem mudado ao longo dos 10.000 anos passados (Revolução Agrícola), sendo que a maior mudança ocorreu, nos últimos 150 anos, em relação ao tipo e ingestão de gorduras e vitaminas C e E.²⁹ No Período neolítico (10.000 a.C. a 4.000 a.C.), aconteceram grandes transformações, como o desenvolvimento da agricultura e da pecuária. A Revolução Agrícola incrementou a dieta humana, uma vez que proporcionou a entrada, no cardápio da humanidade, de uma enorme variedade de alimentos, principalmente, dos cereais (arroz, cevada e trigo). A introdução de cereais na dieta humana é algo relativamente recente e também causador de alterações na maneira como o alimento era tratado, pois esses alimentos precisam ser processados e cozidos antes de ingeridos, o que também altera sua estrutura química.

A introdução de novos alimentos, aliada ao tipo de processamento dado a eles e o sedentarismo, em termos fisiológico-evolutivos, pode ser os principais responsáveis pelo desencadeamento de mecanismos fisiopatológicos, já que nossos genes estão adaptados a outro modelo de dieta e de gasto energético. Sobretudo, alguns autores estimaram alta ingestão de proteína, cálcio, potássio e ácido ascórbico, e baixa ingestão de sódio na dieta do período final do Paleolítico.^{12,29} Atualmente, o que se percebe é justamente o contrário: alta ingestão de gorduras saturadas, gorduras trans, ômega 6 e cereais; e baixa ingestão de ômega 3, carboidratos complexos, fibras, frutas, verduras, proteínas, antioxidantes e cálcio; além de baixa atividade física (sedentarismo).^{12,29}

Várias dietas podem satisfazer as necessidades nutricionais humanas. Algumas populações subsistem basicamente através de uma dieta vegetariana; outras comem principalmente carne. Embora americanos consumam menos carne do que outras populações demonstradas no quadro 1, eles têm os níveis médios de colesterol total mais elevados e maior freqüência de obesidade (IMC), pois consomem mais energia do que despendem.^{4,12,29} Neste caso, a tendência é que essa energia fique indeterminadamente acumulada no organismo sob forma de gordura, resultando no aumento acelerado da incidência de doenças crônicas, tal como a obesidade, DM2 e SM.^{10,12}

Quadro 1 Comparação de ingestão de energia e variáveis biológicas entre diferentes populações.^{4,30}

População Humana	Ingestão de energia (Kcal/dia)	Energia de alimentos animais (%)	Energia de alimentos vegetais (%)	Colesterol total (mg/dL)	Índice de massa corporal (Kg/m²)
Coletores/ Caçadores					
Botswana	2,100	33	67	121	19
América do Norte	2,350	96	4	141	24
Pastores					
Kenya	1,411	80	20	186	18
Rússia	2,820	41	59	142	22
Agricultores					
Peru	2,002	5	95	150	21
Sociedades Industriais					
EUA	2,250	23	77	204	26

Com base nestas considerações evolutivas estudos complementares principalmente focados na SM estão sendo intensamente conduzidos. Entretanto, ainda não há um consenso, a respeito dos critérios diagnósticos a serem adotados dificultando a execução de investigações sobre o tema.

2.3 Critérios Diagnósticos para a Síndrome Metabólica

Inicialmente denominada "síndrome X" por Reaven³¹ ou "síndrome de resistência à insulina",³² é agora conhecida como síndrome metabólica. Embora, as tentativas iniciais de definir a síndrome, tenham suscitado muitos debates com respeito aos critérios diagnósticos, as definições atuais proporcionam uma maneira útil e prática de se identificar indivíduos com risco aumentado de desenvolver DM2, doença cardiovascular aterosclerótica e morte cardiovascular.³³

Em 1998, a Organização Mundial da Saúde propôs o termo “Síndrome Metabólica” para definir a quantidade de fatores de risco e doenças, acompanhando o DM2, formalmente conhecido como Síndrome de Resistência a Insulina. Em 1999, foram significativamente modificadas para complementar as novas classificações da *WHO-International Society of Hypertension* (quadro 2).³⁴ Dois anos depois em 2001, o *Third Report of the National Cholesterol Education Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adult Treatment Panel - NCEP-ATPIII* forneceu um critério para SM, baseada na combinação de vários fatores de risco, usualmente, aplicada para a população em geral (quadro 2). O NCEP-ATPIII identificou cinco componentes da SM, considerando seu diagnóstico quando presentes pelo menos três deles.³⁵ Em 2005 a *International Diabetes Federation* (IDF) reformulou o sistema de classificação da NCEP-ATP III, apresentando critérios mais estritos para o diagnóstico de síndrome metabólica. Estes critérios são os de mais fácil aplicação clínica (quadro 2).³⁶ Nos últimos anos, esses dois últimos sistemas de classificação ou critérios diagnósticos para a síndrome metabólica vêm sendo amplamente utilizados. Eles apresentam similaridade quanto aos fatores de risco cardiovasculares, incluindo obesidade abdominal, intolerância à glicose/ resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial.

Quadro 2 Diferentes critérios diagnósticos para a caracterização da Síndrome Metabólica.^{34,35,36}

CARACTERÍSTICAS	OMS-1999	NCEP-ATP III-2001	FDI- 2005
Hipertensão arterial	Uso de anti-hipertensivo ou PA \geq 140/90mmHg	Uso de anti-hipertensivo ou PA \geq 130/85mmHg	Uso de anti-hipertensivo ou PA \geq 130/85mmHg
Dislipidemia	TG \geq 150mg/dl HDL < 35mg/dl (homens), < 40mg/dl (mulheres)	TG \geq 150mg/dl HDL < 40mg/dl (homens), < 50mg/dl (mulheres)	TG \geq 150mg/dl HDL < 40mg/dl (homens), < 50mg/dl (mulheres)
Obesidade	IMC \geq 30Kg/m ² e ou C/Q > 0,90 (homens) e > 0,85 (mulheres)	Cintura > 102 cm (homens) e > 88 cm (mulheres)	Cintura \geq 94 cm (homens) e \geq 80 cm (mulheres) (europeus)
Glicemia	DM2 ou intolerância à glicose no TOTG	Glicemia em jejum \geq 110mg/dl	Glicemia em jejum \geq 100mg/dl
Outras	Microalbuminúria (excreção de albumina em amostra noturna > 20mcg/min)		
Condições necessárias ao diagnóstico	DM2 ou intolerância à glicose e, mais 2 alterações	Três alterações	Medida da cintura alterada e mais duas alterações

Contudo, é importante ressaltar que os componentes individuais da síndrome metabólica são fatores de risco independentes para o desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica. As tentativas de se estabelecer critérios diagnósticos para esta síndrome são baseadas no princípio de que estes componentes podem agir de maneira sinérgica ou aditiva amplificando o risco.^{33,34,35}

Deste modo, a SM é um conjunto de anormalidades metabólicas inter-relacionadas desempenhando um papel chave no desenvolvimento do DM2 e a DCV.

2.4 Aspectos Gerais da Fisiopatologia na Síndrome Metabólica

A SM é uma morbidade sistêmica, uma vez que afeta a homeostase de diversos sistemas corporais, principalmente o vascular. Na sua patogênese, estão incluídos a predisposição genética e os fatores de risco modificáveis como sedentarismo (baixa atividade física) e dieta inadequada (alta ingestão de gorduras saturadas, gorduras trans, ômega-6 e cereais; e baixa ingestão de ômega-3, carboidratos complexos, fibras, frutas e verduras, etc). Com relação à predisposição genética, Gottlieb et al.,³⁷ conduziram um estudo caso-controle (100 idosos com SM, sem DCV e 368 idosos saudáveis) para verificar a associação entre o polimorfismo do gene do receptor da Leptina e SM em idosos, e observaram diferenças nas frequências alélicas e genóticas entre os grupos ($\chi^2= 14,862$; $p=0,005$). O estudo mostrou uma redução do genótipo *Gln/Gln* e um aumento do genótipo *Arg/Arg* em indivíduos com SM, e um risco de 2.548 (IC 95%= 1,466-4,429) dos idosos com SM serem portadores do alelo *Arg* em relação aos idosos saudáveis. Além disso, idosos obesos também apresentaram uma alta frequência do genótipo *Arg/Arg* quando comparados com os idosos saudáveis ($\chi^2= 6,634$; $p=0,036$). Os resultados desse estudo sugerem que o polimorfismo do gene do receptor da Leptina principalmente a variante *Arg* pode aumentar a predisposição para o desencadeamento de obesidade e SM.

Contudo, a obesidade abdominal (acúmulo de células adiposas está associado ao aumento da produção de células inflamatórias), a dislipidemia, principalmente caracterizado pelo aumento dos níveis triglicérides e redução dos níveis de HDL-c, a resistência à insulina e a intolerância a glicose são fatores que estão associados ao desenvolvimento da SM. Sobretudo, diversos estudos

ênfatizam a importância da gordura visceral associada com resistência à insulina como componentes básicos na fisiopatogênese da SM.^{38,39}

Dada a grande importância da SM em nível clínico e de saúde pública, estudos voltados à identificação de fatores etiológicos contemplam investigações em várias rotas metabólicas. Entre estas se destacam os do metabolismo lipídico, oxidativo, inflamatório e vascular.

2.4.1 Síndrome Metabólica e Metabolismo Oxidativo e Antioxidante

Nas últimas décadas o papel dos Radicais Livres (RL) ou Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs) em processos fisiopatológicos relacionados a fatores de risco cardiometabólicos têm sido intensamente investigados.^{8,9}

O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica.⁴⁰ O não-emparelhamento de elétrons da última camada é que confere a sua alta reatividade. Entretanto, nem todos os agentes reativos patogênicos são designados de RL, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, por isso o termo mais correto, nesse caso é EAO. As EAOs são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila ($HO_2\cdot$), hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Geralmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EAOs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons.⁴⁰ Cabe lembrar que reações de redução implicam em ganho de elétrons, e as de oxidação,

em perda. Portanto, quando no metabolismo normal ocorrer uma redução do oxigênio molecular (O_2), este ganhará um elétron, formando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), considerado instável por possuir número ímpar (13) de elétrons na última camada L.⁴⁰ Assim, a configuração eletrônica do radical superóxido é apresentada na Figura 1.³⁸

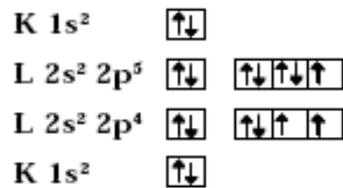


Figura 1 Configuração eletrônica do radical superóxido.

Em organismos aeróbios, ou seja, que utilizam oxigênio e glicose para obter moléculas de adenosina trifosfato (ATP) que fornecem energia para a maioria dos processos metabólicos corporais, cerca de 5% do oxigênio inspirado é transformado em RL. Este fenômeno ocorre porque os ciclos metabólicos não possuem 100% de eficiência. A formação de RL na mitocôndria se dá através do seguinte processo: a glicose oriunda da nutrição e o oxigênio servem como base para a produção de energia corporal. Na célula, a oxidação da glicose intracelular começa com a glicólise no citoplasma, ocorrendo geração de Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) e piruvato. O NADH pode doar equivalentes redutores para a cadeia de transporte de elétrons ou pode reduzir o piruvato a lactato, o qual será substrato para gliconeogênese hepática. O piruvato pode ser também transportado dentro da mitocôndria, onde será oxidado pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para produzir CO_2 , H_2O , moléculas de NADH e de Flavina-adenina-dinucleotídeo (FADH₂). Tanto o NADH quanto o FADH₂ geram energia para a produção de ATP através da fosforilação oxidativa na cadeia de transporte de elétrons.⁴⁰

Quando a geração de RL excede a capacidade antioxidante ocorre um desbalanço no *Status Redox* celular alterando o balanço oxidante-antioxidante promovendo o estresse oxidativo.⁴⁰

A atividade de moléculas antioxidantes é capaz de amenizar o impacto das EAOs em sistemas vivos. Os antioxidantes impedem que o oxigênio se combine com moléculas suscetíveis ou neutralizam a formação de RLs e EAOs, formando compostos menos reativos. Os antioxidantes podem ser compostos moleculares de origem exógena como as vitaminas, obtidos através da alimentação, ou enzimas endógenas do sistema de defesa antioxidante.⁴⁰

Os antioxidantes exógenos, obtidos de alimentos basicamente de origem vegetal, podem ser extremamente benéficos com a adoção de uma dieta saudável (composta de todos os nutrientes essenciais para o bom desempenho orgânico), tendo um papel crucial na prevenção de processos deletérios das EAOs no organismo, minimizando seus efeitos.^{40,42} As principais moléculas antioxidantes exógenas são a vitamina E (alfa tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), bioflavonóides, betacaroteno e selênio.³⁶ Todavia é importante salientar também que as EAOs não possuem somente efeitos deletérios aos organismos. As EAOs desempenham um papel muito importante em processos celulares. Por exemplo, sob condições fisiológicas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula-chave em rotas específicas de sinais de transdução (capazes de modular a expressão gênica) e na ativação de fator de transcrição NF- κ B, enquanto em condições patológicas o H_2O_2 pode levar à apoptose ou à necrose. Além disso, as EAOs, principalmente o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), também funcionam como “antibióticos celulares”, uma vez que combatem micróbios invasores. Evidenciando, dessa forma, o papel pleiotrópico que as EAOs desempenham.³⁶

Uma dieta rica em frutas e vegetais pode minimizar o estresse oxidativo e a produção das EAOs pela alteração do balanço entre atividades celulares pró-oxidantes e defesas antioxidantes.^{41,42} Dietas ricas em frutas e vegetais têm comprovado efeito redutor do risco de doenças crônicas, incluindo o câncer e as doenças cardiovasculares.^{41,42} De acordo com Steffen et al.,⁴² a ingestão de grãos, frutas e verduras está inversamente associada com a mortalidade total e incidência de DAC. Ford S et al.⁴³, usando o *Third National Health and Nutrition Examination Survey*, compararam concentrações circulantes de vitamina A, C, e E; e ésteres de retinol, carotenóides e selênio em 8.808 adultos americanos com idade >20 anos com ou sem SM entre o período de 1988-1994. Os participantes com SM tiveram concentrações significativamente baixas de retinol, vitamina C e carotenóides, exceto de licopeno. As concentrações de vitamina E foram significativamente mais baixas em participantes com SM. A ingestão de vitaminas C, E e A não foi significativa entre os grupos com SM e sem SM. Os resultados mostraram que baixas concentrações de vários antioxidantes podem aumentar o risco cardiovascular e para o diabetes.⁴¹

Os antioxidantes de origem endógena em células eucarióticas são enzimas eficientes de defesa, tais como a superóxido dismutase (SOD1 ou citosólica dependente de cobre e zinco, SOD2 ou mitocondrial dependente de manganês e a SOD3 ou extracelular dependente de cobre e zinco), a catalase, a glutatona peroxidase, bem como, a glutatona redutase (GR), a glutatona (GSH), a coenzima Q (Q10) e a melatonina.^{36,44}

As enzimas SOD, catalase e glutatona peroxidases possuem sua atividade dependente da pressão parcial de oxigênio. Em estados de hipóxia, suas atividades

se reduzem e aumenta a quantidade de RL formados durante a reperfusão, quando se restabelece os níveis elevados de oxigênio.

Diversas evidências apontam que o estresse oxidativo desempenha um papel importante em várias condições clínicas. Por isso, tem se levantado a hipótese que o estresse oxidativo também pode ser considerado um fator de risco e pode estar relacionado com a etiologia de doenças que estão fortemente centradas na homeostasia e funcionamento celular, como é o caso de algumas doenças cardiovasculares,^{45,46} diabetes *mellitus*^{47,48} das neoplasias⁴⁹ e de doenças respiratórias e neurológicas.⁵⁰

Dröge⁵¹ postula que estas doenças estejam separadas em duas grandes categorias: 1) a primeira categoria pode ser referida como estresse oxidativo mitocondrial, onde se encontram a diabetes *mellitus* e as neoplasias e que apresentam comumente mudanças pró-oxidativa no estado redox sistêmico; 2) a segunda pode ser referida como condições inflamatórias oxidativas, pois é tipicamente associada com uma excessiva estimulação da atividade da NADH/NADPH oxidase através de citocinas ou outros agentes. Neste caso, o aumento nas taxas de produção de EAOs ou mudanças nos níveis de glutathione estão freqüentemente associados às condições patológicas, como, por exemplo, a aterosclerose. Neste caso, a SM parece se encaixar nas duas categorias postuladas pelo autor.

Nesse sentido, o estresse oxidativo também está associado a SM, incluindo as morbidades relacionadas, como a aterosclerose, a hipertensão e a DM2.^{8,9} Reaven⁵² e Kaplan⁵³ propuseram pela primeira vez, que essa síndrome agregava um conjunto de fatores de riscos para a doença arterial coronariana (DAC), incluindo a resistência à insulina (hiperinsulinemia), hipertensão, hipertrigliceridemia e

obesidade visceral. DeFronzo e Ferrannini,³² posteriormente sugeriram que a resistência a insulina fosse o fator envolvido nos sintomas da SM, e uma vez adquirida, os indivíduos com predisposição genética desenvolveriam todos os outros aspectos desse distúrbio. Ford et al.⁵⁴ mostraram que 43% dos indivíduos idosos (>60 anos de idade) e 80% idosos com DM2 apresentam SM.⁵⁵ Um volume consistente de estudos tem sugerido que à hiperglicemia aumenta o estresse oxidativo.^{56,57,58} Adicionalmente, estudos em modelos experimentais já demonstraram que o estresse oxidativo aumenta a resistência à insulina.^{59,60} Urakawa et al.⁶¹ mostraram que o estresse oxidativo estava associado com adiposidade e resistência a insulina em homens, sugerindo que o mesmo pode ser, acima de tudo, um evento prematuro ou desencadeador da patologia desses distúrbios, e não uma mera consequência. Por exemplo, pacientes com SM tem elevados níveis de dano oxidativo (peroxidação lipídica, níveis aumentados de malondialdeído (MDA), carbonilação de proteínas e aumento da atividade da xantina oxidase), evidenciado pela diminuição da proteção antioxidante (diminuição da concentração de vitamina C, α -tocoferol, da atividade da enzima superóxido dismutase).⁶² Além disso, a disfunção endotelial é uma característica chave da SM e está intimamente relacionada com a resistência a insulina; essa relação funcional parece ser resultado, em parte, devido à indução do estresse oxidativo pela hiperinsulinemia.⁶³ Portanto, níveis elevados de oxidação lipídica e baixos níveis de atividade antioxidante são encontrados em indivíduos com SM.⁶⁴

Dentro deste contexto, biomarcadores do estresse oxidativo tem emergido como possíveis candidatos a fatores de risco cardiometabólicos, bem como, de alto interesse para a detecção de indivíduos com maior suscetibilidade ao desenvolvimento da SM.

2.4.2 Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada (OxLDL) como Biomarcador Lipídico e Oxidativo Associado à Síndrome Metabólica

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é a principal lipoproteína plasmática transportadora de colesterol, por isso é denominada de LDL-colesterol. Cada partícula apresenta uma massa que excede 3.000.000 D e tem 150 moléculas de ésteres de colesterol em seu núcleo. Há muito pouco triglicerídeo no núcleo de partículas normais de LDL. Quantidades consideráveis de tocoferol, carotenóides e outros antioxidantes lipofílicos plasmáticos também estão presentes. A sua superfície consiste em colesterol livre e fosfolipídeos (predominantemente fosfatidilcolina e esfingomielina) e uma única proteína, apolipoproteína (apo) B-100.⁶⁵ A molécula de LDL é altamente sensível a ação de EAOs, devido principalmente a heterogeneidade de suas partículas, que diferem entre si em tamanho, conformação, carga elétrica e composição química. Contudo, atribui-se uma ação mais aterogênica a OxLDL que a LDL nativa, tornando-as elementos centrais na patogênese da aterosclerose.^{66,67,68,69,70} Para a LDL nativa tornar-se uma molécula oxidada é necessário que atravessem as células endoteliais por transporte vesicular, o qual não requer receptores. Existem fortes evidências de que as LDLs plasmáticas, na sua relação normal com a parede dos vasos, atravessam as células endoteliais através de mecanismo de endocitose. Simionescu et al.⁷¹ demonstraram a formação de invaginações na membrana da célula endotelial, onde localizar-se-iam os receptores específicos da apo B-100. Estas invaginações se transformam em vesículas de endocitose, carreando as partículas de LDL-c para o interior da célula endotelial. O aumento da concentração de LDL-c nativa no interior das células endoteliais induz ao maior consumo de óxido nítrico e de acentuada produção de

EAOs. Cerca de 10% das partículas de LDL atingem a camada íntima do vaso.⁷¹ Na íntima, essas LDL-c são aprisionadas numa trama de fibras e fibrilas secretadas pelas células parietais.^{71,72} As lipoproteínas captadas na íntima subendotelial podem ser modificadas por oxidantes ou enzimas derivadas quer das células endoteliais, monócitos ou células do músculo liso. A modificação oxidativa da LDL-c parece ocorrer em dois estágios. O primeiro estágio ocorre antes que os monócitos sejam ativados, resulta na oxidação dos lipídeos da LDL-c, com pequena alteração na apo B-100 (LDL-c minimamente oxidada - MM-LDL-OX). O segundo estágio começa quando os monócitos são ativados e convertidos em macrófagos, que contribuem com sua grande capacidade oxidativa. Nesse estágio, os lipídeos da LDL-c e a fração protéica (apo B-100) são totalmente oxidados. Desse modo, a partícula de OxLDL consiste de componentes pró-oxidantes, incluindo hidroperóxidos de ácidos graxos e fosfolipídeos, bem como um componente maior, produto do ácido linoléico, o 13-hidroperoxioctadecadienoico (-13-HPODE). A partir destas modificações, a partícula passa a ser reconhecida por receptores acetilados e CD-36 na superfície dos macrófagos.^{73,74} Tais receptores não são regulados pela concentração intracelular de colesterol. Como resultado, a internalização da OxLDL é extremamente arriscada, visto que nas células que aprisionam esta partícula, os macrófagos, faltam o mecanismo de *feedback* encontrado em todas as outras células. Este mecanismo desencadeia o fenômeno de inibição da síntese de receptores de LDL-c. No macrófago, inexistindo esta regulação, há uma contínua internalização de OxLDL levando ao ateroma. As LDL-c nativas são reconhecidas e não se acumulam em quantidade apreciável nos macrófagos.

Numerosos estudos têm descrito a associação de biomarcadores oxidativos e SM.^{8,9,18} Hackmam e Anand⁷⁵ propuseram diversos fatores de riscos emergentes

para a doença vascular aterosclerótica, dentre estes os autores destacaram a Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada (OxLDL). Entretanto, como a SM é um distúrbio complexo que reúne a obesidade, dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina, torna-se um fator de risco primário para a diabetes e doenças cardiovasculares. Neste caso, Holvoet⁷⁶ mostrou que a SM está associada com níveis elevados de OxLDL circulantes. Além disso, a hiperinsulinemia e o controle deficiente dos níveis glicêmicos, independente dos níveis lipídicos, foram associados com o aumento, *in vivo*, da oxidação da LDL. Holvoet et al.,^{77,78} demonstraram que OxLDL está relacionada à DAC em pacientes transplantados, bem como em pacientes com DAC estabelecida. Estes estudos mostraram também que a OxLDL tem poder preditivo para o desenvolvimento da doença aterosclerótica independente dos fatores de risco cardiovasculares convencionais. Além disso, o *Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)*, que é um estudo prospectivo de base populacional (20 anos de seguimento), avaliou 1889 indivíduos entre 18 e 30 anos de idade, que viviam na zona metropolitana dos Estados Unidos, mostrou que altas concentrações de OxLDL estavam associadas com o aumento da incidência de SM, bem como, com os seus componentes (obesidade abdominal, hiperglicemia e hipertrigliceridemia).⁷⁹ Gottlieb et al.⁵ investigaram a associação dos níveis de OxLDL com fatores de risco cardiovasculares clássicos e com os polimorfismos genéticos da enzima superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) e APO E e associação positiva entre níveis de OxLDL com PAS e PAD, circunferência abdominal e porcentagem de gordura corporal. Indivíduos com o genótipo VV do polimorfismo da SOD2 com maiores níveis de OxLDL, principalmente em indivíduos afetados por DM2. Esta associação foi independente de outros fatores clássicos de risco cardiovascular e do polimorfismo da APO E que está, por sua vez, relacionado

a maiores níveis de LDL-c e DCNT como as cardiovasculares e as neurodegenerativas (demência do tipo Alzheimer). Tais achados demonstram o papel importante que o estresse oxidativo desempenha no desencadeamento de doenças fortemente centradas no metabolismo de lipídeos e carboidratos, como é caso da SM.

Raros estudos avaliaram a associação entre anticorpos anti-OxLDL e SM. Entretanto, um estudo brasileiro conduzido por Sanches et al.,⁸⁰ investigaram se os níveis de anti-OxLDL no plasma de adolescentes estava correlacionado com as suas medidas antropométricas e o seus perfis lipídicos. As análises das variáveis antropométricas indicaram que os adolescentes obesos apresentaram risco cardiovascular, quando comparados com adolescentes com peso normal e sobrepeso ($p < 0,01$). As concentrações de colesterol total ($p = 0,011$), HDL-c ($p = 0,001$) e LDL-c ($p < 0,042$) apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Adolescentes com sobrepeso ($p = 0,012$) e obesos ($p < 0,001$) apresentaram concentrações mais elevadas de anti-OxLDL do que adolescentes com peso normal. As variáveis antropométricas também foram correlacionadas com os níveis de anti-OxLDL. Estes resultados sugerem que a presença de anti-OxLDL e alterações metabólicas no perfil lipídico variam em proporção aos parâmetros antropométricos, e a concentração de anti-OxLDL pode ser um potencial indicador bioquímico do risco para a SM.

As OxLDLs são moléculas biologicamente ativas e potentes agentes pró-inflamatórios na parede das artérias, bem como imunogênicas na presença de anti-OxLDL encontrados na circulação e nas placas ateroscleróticas.⁸¹ Estudo têm demonstrado que o aumento dos níveis de anti-OxLDL estão associados com futuro IAM.^{82,83,84} Além disso, os níveis de anti-OxLDL estão associados com a espessura

da íntima-média da carótida^{85,86} e progressão de aterosclerose nas carótidas,⁸⁷ mas estes achados são inconsistentes. Uma explicação para tal situação poderia ser devido aos métodos utilizados para se obter a OxLDL.⁸⁸ Além disso, Tornvall et al.,⁸⁸ em um estudo de caso-controle (88 pacientes com infarto do miocárdio antes dos 45 anos de idades e 88 controles-indivíduos saudáveis), para avaliar a importância de diferentes tipos de anticorpos contra OxLDL em pacientes com doença arterial coronariana, demonstraram que os casos tinham mais anticorpos contra a OxLDL do que os indivíduos controles. Inversamente, nenhuma associação foi encontrada entre diferentes tipos de anticorpos para OxLDL e severidade de aterosclerose coronariana ou número e severidade de estenoses e prognósticos. Portanto, o valor prognóstico do anti-OxLDL é limitado em pacientes jovens pós-infarto e os resultados indicaram que os anti-OxLDL não são protetores em estágios tardios da aterosclerose coronária. Apesar disso, é provável que o aumento dos níveis de anti-OxLDL seja um biomarcador primário de risco cardiometabólico em pacientes adultos jovens.

2.4.3 Biomarcadores Inflamatórios Associados à Síndrome Metabólica

A SM também é caracterizada por um processo pró-inflamatório, apresentando aumento dos níveis circulantes de citocinas. As citocinas são moléculas que desempenham papel importante em vários processos biológicos, como a inflamação, a imunidade e a hematopoiese, consideradas hormônios-símiles, pois podem atuar tanto local quanto sistemicamente.⁸⁹ São sintetizadas por vários tipos de células, como os linfócitos, macrófagos, monócitos, adipócitos, fibroblastos e células endoteliais. As citocinas são moléculas bioativas e

desempenham funções distintas, porém seus efeitos estão melhor evidenciados na função vascular, na regulação imune e no metabolismo dos adipócitos.⁸⁹ Tais efeitos parecem estar envolvidos na patogênese da SM. Contudo, de acordo com a literatura, a hipercolesterolemia, hipertensão, resistência à insulina, diabetes mellitus, obesidade, entre outros fatores estão envolvidos na disfunção endotelial e a atividade dessas moléculas pode influenciar aumentando ou diminuindo o risco para o desenvolvimento desses processos mórbidos.⁸⁹ Além disso, influenciam a síntese de outras citocinas, levando à formação de cascatas, podendo exercer mecanismos reguladores positivos ou negativos para as respostas imunes e inflamatórias.

A literatura apresenta diversos resultados confirmando o importante papel da inflamação em doenças cardíacas em indivíduos com níveis de colesterol e da LDL relativamente moderados.^{90,91} Diversos marcadores inflamatórios foram avaliados quanto a sua capacidade de previsão de risco cardiovascular, porém apenas a Proteína C reativa-ultra sensível (PCR-us) está sendo amplamente utilizada na clínica atualmente.

A PCR-us é um marcador que se apresenta acentuadamente aumentado na presença de lesão ou infecção (os níveis de PCR-us podem aumentar de 10 mg/l para 200 mg/l). Por outro lado, as alterações associadas ao risco de DCV são muito inferiores, da ordem de 0,3 mg/l.⁹² Diversos estudos epidemiológicos demonstraram que os níveis de PCR-us são preditivos de IAM, AVC, doença arterial periférica (DAP) e morte súbita cardíaca.^{93,94,95} A PCR-us também é preditiva de isquemia e morte em pacientes com angina instável ou estável ou SCA e em pacientes submetidos a angioplastia.⁹²

Dentre as citocinas ou marcadores inflamatórios associados a SM, os mais investigados são: o fator de necrose tumoral alfa (TNF – α), interleucina-6 (IL-6) e

PCR-us que estão aumentados em pessoas com doença cardiovascular. O TNF- α e a IL-6 tem sido relacionados com obesidade e distúrbios metabólicos.⁹⁶ Tanto o TNF- α quanto a IL-6 também estão negativamente relacionados à sensibilidade à insulina.⁹² Succurro et al.⁹⁷ mostraram que a IL-6 está correlacionada com resistência a insulina e componentes individuais da SM. Isto é, níveis aumentados de IL-6 conferem risco aumentado de ter SM sob condições patofisiológicas, tais como, resistência à insulina e obesidade visceral. Corroborando esses dados Rush et al.⁹⁶ investigou o papel da inflamação sistêmica e da resistência à insulina em doenças associadas à obesidade em Indianos, pois são considerados um grupo de alto risco para tais morbidades. Estes autores encontraram homens com maior distribuição de gordura do o grupo das mulheres. O gasto de energia em repouso foi fortemente correlacionado com as concentrações de IL-6 nos homens, mas não nas mulheres. A IL-6 foi associada positivamente com a porcentagem de gordura e com a função das células B (HOMA B%) e inversamente associada com massa do músculo esquelético apendicular (MMEA) e com insulina sensível (HOMA S%). Nessa população investigada a relação entre distribuição de gordura corporal e HOMA S% foi fortemente dependente do sexo e as concentrações de IL-6 podem indicar uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento de SM entre os homens indianos.

Ridker⁹⁸ avaliou a relação entre Proteína C reativa (PCR), SM e incidência de eventos cardiovasculares em 14, 719 mulheres aparentemente saudáveis, que foram acompanhadas por 8 anos para observar desfechos como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC), revascularização coronária ou morte por DCV, destes 24% da coorte tinha SM. Os níveis médios de PCR para aqueles indivíduos com 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 componentes da SM foram: 0,68, 1,09, 1,93, 3,01,

3,88 e 5,75 mg/L, respectivamente ($p < 0,0001$), mostrando um aumento linear de acordo com o aumento no número de componentes. O efeito aditivo de 3 ou mais componentes da SM e os níveis de PCR acima de 3mg/L ($p < 0,001$) aumentou o risco relativo de futuros eventos cardiovasculares. A taxa de sobrevivência livre de DCV após o período de 8 anos, baseada nos níveis de PCR (acima e abaixo de 3,0 mg/L) foram similares as taxas de sobrevivência em indivíduos com SM com 3 ou mais componentes. Os dados também indicaram que os níveis de PCR em indivíduos com e sem SM tem relevância clínica, uma vez que pode predizer um risco cardiovascular futuro. Achados adicionais desse estudo mostraram que os diferentes critérios diagnósticos para a SM tiveram o mínimo impacto sobre esses achados.

Deste modo, tanto a PCR-us quanto a IL-6 são citocinas pró-inflamatórias envolvidas na inflamação vascular, com alto valor preditivo para possíveis eventos cardiovasculares, principalmente as chamadas Síndromes Coronarianas Agudas (SCA).

2.4.4 Biomarcador Isquêmico Associado à Síndrome Metabólica: Albumina Modificada pela Isquemia (IMA)

Uma das proteínas mais abundantes do sangue é a albumina (entre 3,5g/dL e 5,0g/dL) que é sintetizada pelo fígado. Tem baixo peso molecular (66,5 kDa) e é solúvel em água. Entre outras funções, atua na manutenção da osmolaridade entre o compartimento sanguíneo e intersticial, transporte de drogas e metais.⁹⁹ A albumina possui 585 aminoácidos e, na sua região N-terminal, contém a seqüência de N-Asp-Ala-His-Lis que tem demonstrado ser um sítio de fortes ligações aos

metais de transição, como o cobalto, cobre e níquel. A região N-terminal da albumina tem uma afinidade inerente pelo íon metal cobalto - Co (II).⁹⁹

Alguns autores mostraram que a região N-terminal se caracteriza, também, por ser mais sensível à degradação, se comparada com as outras regiões da albumina.^{100,101} Na presença de processo isquêmico, a região N-terminal da molécula, especificamente o sítio de ligação aos metais de transição, passa por uma diminuição na sua capacidade de ligação formando a albumina modificada pela isquemia (IMA).^{99,100} A hipóxia, acidose, redução da tensão de oxigênio, disfunção da bomba de íons e geração de radicais livres podem promover modificações no sítio de ligação e diminuir essa capacidade de afinidade pelo cobalto.^{99,102} A IMA é mensurada pelo teste baseado na avaliação da ligação do cobalto exógeno com a região N-terminal da albumina (teste ACB), o qual tem sido sugerido para o uso na detecção de isquemia aguda do miocárdio.¹⁰³ Estudos que incluem angioplastia coronária transluminal percutânea, como modelo de isquemia miocárdica transitente, tem mostrado que as concentrações de IMA, medidas pelo teste ACB, estavam elevadas mesmo antes do evento isquêmico, mostrando que a IMA pode ser um biomarcador precoce para isquemia miocárdica sem necrose.¹⁰⁴ Corroborando estes achados, Cho et al.,¹⁰² mostraram que a IMA eleva-se em isquemia miocárdica transitória induzida por vasoespasmos, podendo também ser um marcador para tal evento. Morrow et al.,¹⁰⁵ entretanto, propõe que o aumento nos níveis séricos desse marcador, pode também ser atribuído a processos oxidativos relacionados a injúrias de outros órgãos.

Assim, estudos sobre a associação dos níveis da IMA com isquemia em pacientes cardíacos têm sugerido ser esta molécula um potencial marcador útil para

o rápido diagnóstico de isquemia aguda do miocárdio, auxiliando na avaliação dos pacientes com baixo e intermediário risco de infarto.¹⁰⁵

O diagnóstico e o controle clínico de pacientes com suspeita de SCA ou disfunção cardíaca ainda são um desafio. Embora, a IMA tenha sido recentemente proposta como um biomarcador de detecção para isquemia miocárdica e disfunção cardíaca, informações sobre a sua associação com riscos cardiometabólicos, como o DM2, hipercolesterolemia e SM que estão direta ou indiretamente relacionados com alterações vasculares e isquêmicas precisam ser obtidas. Um estudo recente conduzido por Piwowar et al.¹³ em 76 pacientes diabéticos e 25 controles avaliou mostrou níveis aumentados de IMA nos pacientes diabéticos sugerindo não ter este marcador apenas origem cardíaca. Os autores sugeriram que os maiores níveis de IMA estariam relacionados à hipóxia crônica provocada, principalmente pela hiperglicemia e o estresse oxidativo.

Com base neste estudo, recentemente, Duarte et al.,¹⁴ investigaram se a hipercolesterolemia independente do DM2 poderia também causar níveis aumentados de IMA. Neste estudo os autores observaram que indivíduos hipercolesterolêmicos possuíam níveis séricos de IMA elevados também sendo também fisiologicamente explicado pelas alterações vasculares e oxidativas associadas às alterações lipídicas. Além disso, os autores encontraram correlações significativas entre IMA e colesterol total, LDL, anti-OxLDL e PCR-us.

Entretanto, em ambos os estudos os voluntários investigados apresentavam um perfil de alterações metabólicas que é considerado pouco prevalente, ou seja, a ocorrência apenas de DM2 sem outros riscos cardiometabólicos ou a ocorrência de hipercolesterolemia sem DM2.^{13,14} Em termos epidemiológicos o número de indivíduos que possuem associação entre estas alterações e outras disfunções

metabólicas conhecida como SM é muito alto e de grande interesse para a cardiologia, uma vez que são pacientes com alto risco de evento cardiovascular.

Neste contexto, investigações que avaliem a associação entre SM e níveis de citocinas como a proteína PCR-us e a IL- 6, biomarcadores lipídicos e do estresse oxidativo, incluindo a molécula de Ox-LDL e anti-OxLDL e a IMA como marcador de processos isquêmicos são de relevância científica e clínica.

3 TESE E HIPÓTESE GERAL DO ESTUDO

Doenças cardiovasculares são a principal causa de morbi-mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Estudos epidemiológicos e experimentais mostraram que indivíduos com síndrome metabólica possuem alto risco cardiovascular. Ainda que a associação entre SM e doenças cardiovasculares seja incontestável, existe a necessidade de se entender melhor a sua dinâmica patofisiológica, através de investigações integradas de diversos biomarcadores oxidativos, lipídicos e inflamatórios.

Uma vez que, recentemente, a IMA foi descrita como uma molécula biomarcadora de processos isquêmicos cardíacos e não-cardíacos (DM2 e hipercolesterolemia),^{13,14} a tese do presente estudo postula a ocorrência de níveis elevados deste biomarcador em associação com outras moléculas lipídicas, oxidativas e inflamatórias presentes em altos níveis em indivíduos com síndrome metabólica.

4 OBJETIVOS

Investigar a associação de marcadores plasmáticos lipídicos, oxidativos, inflamatórios e potencialmente associados a processos isquêmicos em pacientes com síndrome metabólica.

4.1 Objetivos específicos

Em sujeitos portadores de síndrome metabólica (SM) e saudáveis sem risco cardiometabólico investigar e comparar os níveis plasmáticos de:

- 1) marcadores lipídicos e oxidativos (colesterol total, LDL-c, HDL-c, triglicerídeos, OxLDL e anti-OxLDL);
- 2) marcadores inflamatórios (proteína C reativa e interleucina-6);
- 3) marcador de alteração isquêmica (albumina modificada pela isquemia-IMA);
- 4) avaliar possíveis variáveis intervenientes nas associações observadas como: sexo, idade, história prévia de DM2 e história prévia de hipercolesterolemia.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento: foi realizado um estudo prospectivo de caso-controle em que pacientes com síndrome metabólica (casos) foram comparados com indivíduos saudáveis (controle) sem nenhum fator de risco cardiometabólico prévio. Os dois grupos foram corrigidos para sexo e idade.

5.2 População e amostra: o estudo foi realizado a partir da seleção de indivíduos afetados por síndrome metabólica cadastrados e regularmente atendidos no Ambulatório de Risco Cardiometabólico do Serviço de Cardiologia, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Tais indivíduos eram oriundos tanto da região metropolitana como de outras cidades do estado do Rio Grande do Sul. Os indivíduos controles foram selecionados a partir do estudo populacional de interação gene-ambiente associada ao envelhecimento e DCNT realizado em parceria com a Universidade Federal de Santa Maria que selecionou indivíduos saudáveis da população gaúcha oriundos de diversas partes do estado do Rio Grande do Sul. O tamanho amostral foi calculado em 70 a 80 indivíduos considerando ou um intervalo de confiança de 95%. O tamanho amostral e a distribuição de uma proporção de dois indivíduos afetados para um indivíduo controle foi similar a descrita no estudo de Piwowar et al.,¹³ que investigou a associação entre níveis de IMA e DM2.

5.2.1 Grupo Controle: foram incluídos nesse grupo 32 indivíduos, de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos saudáveis (sem síndrome metabólica, DM2,

obesidade, hipertensão, dislipidemias, DCV, e sem estados inflamatórios) da população gaúcha oriundos de diversas partes do estado do Rio Grande do Sul.

5.2.2 Grupo Caso: foram incluídos nesse grupo 74 indivíduos, de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos somente com SM (sem DCV) do Ambulatório de Risco Cardiometabólico do Serviço de Cardiologia, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

5.2.3 Critérios de Inclusão: os sujeitos da pesquisa foram selecionados considerando os seguintes critérios de inclusão: manifestação de concordância voluntária para participação do estudo, serem ou não portadores de SM e possuírem idade igual ou superior a 18 anos. Todos os pacientes com SM que foram incluídos no estudo estavam clinicamente estáveis sem sinais de infecções agudas ou isquemia aguda. A todos os indivíduos incluídos no estudo foi aplicada uma entrevista estruturada (Anexo 1).

5.2.4 Critérios de exclusão: foram excluídos do estudo indivíduos: gestantes, com idade inferior a 18 anos, indivíduo do grupo controle que possuíam qualquer tipo de morbidade como hipotireoidismo, doenças cardiovasculares e neoplasias que poderia afetar os resultados bioquímicos investigados. Nos indivíduos portadores de SM, foram excluídos aqueles que apresentaram história de evento cardiovascular isquêmico. Também foram excluídos os pacientes diabéticos que apresentavam microangiopatia (nefropatia, retinopatia, neuropatia periférica e pé diabético) e macroangiopatia (DAC, doença arterial periférica, IAM e AVC).

5.3 Variáveis Analisadas

As seguintes variáveis foram analisadas:

1. **Fisiológicas e antropométricas:** pressão arterial (PA), índice de massa corporal (IMC), circunferência abdominal mínima.
2. **Bioquímicos:** perfil lipídico (CT, HDL, LDL, TG), glicose, OxLDL, anti-OxLDL;
3. **Citocinas inflamatórias:** IL-6 e PCR-us
4. **Marcador Isquêmico:** albumina modificada pela isquemia (IMA)
5. **Morbidades:** diabetes mellitus, obesidade, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica.

5.3.1 instrumentos

1. **Pressão Arterial:** A aferição da PA seguiu critérios definidos pelo *VII Joint National Committee*.¹⁰⁶ Inicialmente, todos os procedimentos foram explicados ao entrevistado, sendo conferidas informações referentes a não realização de esforço físico, fumo ou ingestão de cafeína durante 60min anteriores à aferição da PA. Esta foi medida pelo método indireto, com manômetros aneróides periodicamente calibrados contra manômetros de mercúrio. Foram utilizados manguitos de diferentes tamanhos para que possam envolver pelo menos 80% do braço do entrevistado, que permaneceu sentado em uma cadeira com as costas apoiadas. O aparelho foi colocado 2 a 3 cm acima da fossa ante cubital, com o manômetro sobre o braço livre de roupas, apoiado

ao nível do precórdio e com a palma da mão voltada para cima. As determinações das pressões sistólicas e diastólicas seguiram as fases de *Korotkoff*: a fase I determinou a pressão sistólica e a fase V determinou a pressão diastólica. Quando os batimentos persistiram até o nível zero, a pressão diastólica foi determinada no abafamento dos sons (fase IV de *Korotkoff*). A PA foi registrada com variação de 2 mmHg. A pressão arterial de $\leq 130 / >85$ mmHg foi considerada normal.³⁵

2. **Índice de massa corporal (IMC):** foi utilizado o índice de Quetelet ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$). Valores até 25 kg/m^2 foram considerados normais; entre 25 kg/m^2 e 30 kg/m^2 , sobrepeso; e acima de 30 kg/m^2 , obesidade conforme recomendação do Ministério da Saúde.¹
3. **Circunferência abdominal:** foi definida como a menor medida de uma circunferência no nível da cicatriz umbilical, no final do movimento expiratório. Aqueles com CA acima de 102 cm, no caso de homens, e acima de 88 cm, em se tratando de mulheres, serão caracterizados como portadores de obesidade abdominal (tipo centrípeto).³⁵
4. **Perfil lipídico:** A classificação dos valores de referência para o CT e LDL-c corresponderam aos critérios das IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias.¹⁰⁷ TG e HDL-c corresponderam aos critérios diagnósticos do NCEP III.³⁵ CT $<200 \text{ mg/dL}$ ou HDL-c $<40 \text{ mg/dL}$ (homens) e $<50 \text{ mg/dL}$ (mulheres) ou LDL-c $<130 \text{ mg/dL}$ ou TG $<150 \text{ mg/dL}$.
 - a) Colesterol total (CT): foi mensurado pelo método enzimático padronizado utilizando reagentes Ortho-Clinical Diagnostics® em um analisador automático (Vitros 950® dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA).¹⁰⁸

- b) HDL-colesterol (high density lipoprotein= HDL-c): utilizou-se a técnica de precipitação com Heparina-Mn²⁺ de Gildez com algumas modificações para a determinação plasmática do HDL-c. As lipoproteínas que continham Apolipoproteínas B-100 (as VLDL e LDL) foram precipitadas com heparina-Mn²⁺ (Sigma Chemical Co, USA); após, foram incubadas e centrifugadas (centrífuga refrigerada Model RB-18II, Tomy Seiko Co. Ltd, Japan). Coletou-se, então, o sobrenadante para quantificação das partículas de HDL-c através de reação enzimática colorimétrica para colesterol, sendo considerado como valor final a média de 2 determinações realizadas para cada amostra plasmática.¹⁰⁶
- c) Triglicerídeos (TG): foi mensurado pelo método enzimático padronizado utilizando reagentes Ortho-Clinical Diagnostics[®] em um analisador automático (Vitros 950[®] dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA).¹⁰⁸
- d) LDL colesterol (low density lipoprotein= LDL-c): foi obtido pela fórmula de Friedewald et al.¹⁰⁹ para valores de triglicérides inferiores a 400mg/dL.¹¹⁰ As amostras com valores de triglicérides superiores a 400mg/dL foram excluídas.

$$\text{Fórmula de Friedwald} = \text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - \text{VLDL}^*$$

$$*\text{VLDL} = \text{TG}/5$$

5. **Glicemia de jejum:** foi mensurada pelo método enzimático padronizado utilizando reagentes Ortho-Clinical Diagnostics[®] em um analisador automático (Vitros 950[®] dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA).O valor de referência adotado foi de até 110 mg/dL normal.³⁵

- 6. Determinação de marcadores do estresse oxidativo:** a quantificação de OxLDL e anti-OxLDL foram realizadas através de ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com a técnica descrita por Holvoet et al.,⁷⁷ e por Wu and Lefvert,¹¹¹ respectivamente.
- 7. Determinação de marcadores inflamatórios:** a quantificação de IL-6 foi realizada pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) usando Kits comerciais Biomyx Technology, San Diego, USA, seguindo o protocolo do fabricante. PCR-us foi avaliada por nefelometria (Dade Behring, Newark, DE, EUA), utilizando anticorpo monoclonal para PCR-us humana (com limite de detecção de 0.175 mg/l e uma sensibilidade analítica de 0.04 mg/l), em alíquota de soro resfriado, conforme previamente descrito.¹¹²
- 8. Determinação de Marcador Isquêmico:** albumina modificada pela isquemia (IMA) foi mensurada por ensaio colorimétrico com cobalto, descrito por Bar-Or et al.¹⁰³ Esse método envolve a adição de 50 µL de 0.1% de cloreto de cobalto (Sigma, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em H₂O para 200 µL de soro e esperar 10 min para a adequada ligação do cobalto com a albumina (ACB). 50 µL de dithiothreitol (DTT) (Sigma, 1.5 mg/ml H₂O) foram adicionados para acontecer a reação de cor, após 2 min foi adicionado 1.0 mL de 0.9% de NaCl para encerrar a reação. Toda a reação deve acontecer a uma temperatura de 37°C. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 470 nm (Hitachi U-2800A[®], Hitachi High-Technologies Corporation, Japan), utilizando o cobalto sérico branco sem DTT, e os resultados foram reportados em unidade de absorbância (ABSU). O ensaio colorimétrico mede o cobalto que não se ligou à albumina depois da reação de ligação. Assim, com menos cobalto ligado à albumina, mais cobalto livre fica disponível, resultando em elevada

absorbância. A curva padrão foi preparada no intervalo de 6,0-60,0 g CoCl₂/ml. Uma unidade IMA foi definida como "g" de liberdade Co (II) na mistura de reação por mL de amostra de soro. O ensaio encontrou linearidade dentro desta faixa. O coeficiente de variação (CV) para testar a reprodutibilidade foi calculado pela repetição de uma amostra de pacientes (15,6 unidades IMA) em seis ensaios em duplicata e foi encontrado ser <15%, o qual foi baixo, mas dentro de níveis aceitáveis. Estas condições foram semelhantes aos descritos anteriormente por Chawla et al.¹¹³

5.3.2 Variáveis Clínicas

Diabetes mellitus

O diabetes foi definido pela glicemia de ≥ 110 mg/dl de acordo com o NCEP III.³⁵ Os pacientes que referirem ser portadores da doença em tratamento atual também serão considerados diabéticos.

Obesidade

A obesidade foi avaliada mediante o cálculo do índice de massa corporal (IMC). O peso dos indivíduos vestindo roupas leves e descalços foi verificado utilizando-se uma balança portátil com capacidade de registrar 120kg e uma precisão de 0,1kg. Para a determinação da estatura foram utilizadas trenas metálicas com escala de 0,5cm. Foram consideradas obesas as pessoas cujo IMC

for igual ou superior a 30kg/m^2 , e com sobrepeso aquelas com IMC entre 25 e $<30\text{kg/m}^2$.¹

Dislipidemia

A determinação das dislipidemias envolveu as alterações de forma isolada ou em conjunto dentre os quatro parâmetros dosados (valores de referência), e os portadores de distúrbios lipídicos em uso de medicação específica.

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

A classificação diagnóstica da HAS foi de acordo com o NCEP III, onde a Sistólica deve ser ≥ 130 mm Hg ou em tratamento para HAS e Diastólica > 85 mm Hg ou em tratamento para HAS.³⁵

5.4 Logística Geral

Informações sobre estilo de vida e aspectos clínicos foram obtidas a partir de uma entrevista estruturada e avaliação física incluindo antropometria e medida de pressão arterial sistêmica aplicada pelos profissionais da área da saúde do Ambulatório de Risco Cardiometabólico e pesquisadores previamente treinados envolvidos no estudo.

Uma vez incluídos no Ambulatório os indivíduos com síndrome metabólica foram convidados a coletar sangue para a realização das análises bioquímicas

complementares. O sangue foi processado e armazenado em freezer -80 °C até ser posteriormente analisado. As análises bioquímicas dos marcadores lipídicos e oxidativos foram conduzidas no Laboratório de Biogenômica, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria. As análises bioquímicas dos marcadores inflamatórios e de isquemia foram conduzidas no Laboratório de Análises Clínicas LabMed Ltda. também localizado em Santa Maria-RS.

5.5 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando o pacote estatístico SPSS Versão 12.0. Inicialmente as variáveis bioquímicas foram investigadas quanto à distribuição normal dos seus valores utilizando o teste Kolmogorov-Smirnof. Para as variáveis sem distribuição normal foi realizada transformação em log a fim de se utilizar testes paramétricos. Tais variáveis foram então comparadas entre os indivíduos com SM (casos) e sem SM (controles) por teste Student t. Teste adicional comparando a possível associação entre os biomarcadores investigados em cada grupo de indivíduos foi feito através de análise de correlação de Pearson, onde valores de 0,70 para mais ou para menos indicam uma forte correlação, 0,30 a 0,70 positivo ou negativo indica correlação moderada e de 0 a 0.30 indica uma fraca correlação. Variáveis categóricas entre os dois grupos foram comparadas utilizando-se teste do qui-quadrado (χ^2) e/ou exato de Fisher. Após a realização das análises estatísticas univariadas foi realizada análise multivariada por regressão logística, método *Backward Wald* a fim de se verificar a possível influência de variáveis intervenientes

como o sexo, a idade ou outra variável qualquer cuja análise univariada que comparou seus valores entre os indivíduos caso e controle tenha apresentado um $p < 0,20$. Todos os testes foram bi-caudais e considerados estatisticamente significativos quando o $p \leq 0,05$.

5.6 Ética

O estudo apresentado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Nº protocolo 07/04069). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). O protocolo foi conduzido segundo as normativas da Resolução 196/1996.

6 RESULTADOS

Um total de 106 indivíduos foi incluído no estudo, sendo 32 controles (30,2%) e 74 portadores de síndrome metabólica (69,8%). Destes, 34 eram do sexo masculino (32,1%) e 72 do sexo feminino (67,9%) não ocorrendo diferenças significativas entre os grupos caso e controle ($\chi^2=2,151$, $p=0,142$). A idade média dos indivíduos portadores de SM foi de $57,5\pm 8,3$ e de $55,2\pm 8,8$ anos não sendo estatisticamente diferente ($p=0,559$).

As características gerais dos indivíduos saudáveis e portadores de SM são apresentadas na Tabela 1. No caso, sujeitos com SM apresentaram média elevada de IMC, PAS, PAD, colesterol total, LDL-c, triglicérides e glicose. A única variável que não apresentou diferença estatística entre os dois grupos foi o HDL-c.

Tabela 1 - Características gerais dos indivíduos com e sem SM participantes do estudo.

Variáveis		Grupos		p
		Controle Média±DP	SM Média±DP	
N		32	74	
Gênero	Homens	11 (34.4)	20 (27.0)	0.595
	Mulheres	21 (65.6)	54 (73.0)	
IMC (Kg/m ²)		22.1±4.6	32.6±6.1	0.0001
Circunferência abdominal (cm)		78.8±7.9	107.2±12.3	0.0001
PAS (mmHg)		117.5±8.0	147.8±26.8	0.001
PAD (mmHg)		74.6±18.5	85.9±15.9	0.01
Glicose (mg/dL)		81.7±7	133.7±68.7	0.001
Colesterol Total (mg/dL)		148.5±17.8	200.4±58.1	0.001
HDL-c (mg/dL)		50.5±9.3	48.2±12.9	0.371
LDL-c (mg/dL)		78.2±11.5	114.4±49.5	0.001
Triglicerídeos (mg/dL)		99.4±43.5	214.9±34.8	0.001

IMC= índice de massa corporal, PAS= pressão arterial sistólica; PAD= pressão arterial diastólica; DP= desvio padrão; A análise estatística foi realizada pelo Teste t de Student.

A seguir marcadores inflamatórios, lipídicos, oxidativos e de isquemia foram investigados comparando-se os valores médios entre os dois grupos. Como pode ser observado na Tabela 2, os valores de IMA, PCR-us, IL-6, OxLDL e anti-OxLDL

foram significativamente maiores nos indivíduos portadores de SM do que nos saudáveis.

Tabela 2 - Comparação entre biomarcadores lipídicos, oxidativos, inflamatórios e isquêmico em indivíduos saudáveis e com SM.

Variáveis	Grupos		p
	Controle Média±DP	SM Média±DP	
IMA (ABSU)	0,338±0,0486	0,618±0,1355	0,0001
PCR-us (mg/dL)	0,172±0,0716	1,721±0,964	0,0001
IL- 6 (pg/mL)	17,06±3,17	53,20±14,52	0,0001
OxLDL (mg/dL)	0,193±0,261	0,662±0,461	0,0001
anti-OxLDL (mg/L)	3,359±2,277	27,822±17,010	0,001

ABSU= unidades de absorvância

Uma vez que indivíduos portadores de SM apresentaram níveis elevados de IMA que é um marcador potencial de isquemia, foi realizada uma análise adicional de correlação entre a IMA, glicemia, perfil lipídico e demais biomarcadores lipídicos, oxidativos e inflamatórios avaliados no presente estudo. A Tabela 3 apresenta as principais correlações entre IMA e os demais marcadores (colesterol total, LDL-c, triglicerídeos, glicose, PCR-us, OxLDL, anti-OxLDL, IL-6, IMC e PAS). Não se verificou correlação significativa entre HDL- c, PAD e níveis de IMA.

Tabela 3 - Correlação entre albumina modificada pela isquemia (IMA), e variáveis bioquímicas, fisiológicas e antropométricas em indivíduos com e sem SM.

Variáveis Independentes	Correlação	
	r^2	p
Colesterol total (mg/dL)	0,561	<0,0001
HDL-c (mg/dL)	-0,194	0,230
LDL-c (mg/dL)	0,418	0,001
Triglicerídeos (mg/dL)	0,674	0,0001
Glicose (mg/dL)	0,574	0,001
OxLDL (mg/dL)	0,585	0,0001
anti-OxLDL (mg/dL)	0,575	<0,0001
PCR-us (mg/dL)	0,649	<0,0001
IL-6 (pg/mL)	0,723	<0,0001
PAS (mmHg)	0,522	<0,0001
PAD (mmHg)	0,177	0,168
Circunferência abdominal (cm)	0,716	<0,0001

IMC= índice de massa corporal; PAS= pressão arterial sistólica;
PAD= pressão arterial diastólica.

Em relação ao perfil lipídico, uma correlação positiva moderada foi observada entre o colesterol total ($r^2 = 0,561$, $p < 0,0001$) e triglicerídeos ($r^2 = 0,674$, $p = 0,0001$) enquanto que uma correlação positiva moderada foi observada entre os níveis de IMA e de LDL-c ($r^2 = 0,418$, $p = 0,0001$). Entretanto, foi observada correlação negativa entre IMA e HDL-c ($r^2 = -0,194$, $p = 0,230$). Em relação à glicemia uma

correlação positiva moderada entre os níveis de IMA e glicose foram observadas ($r^2 = 0,574$, $p=0,001$).

Associação positiva moderada entre IMA e os níveis de OxLDL ($r^2 = 0,585$, $p=0,0001$) e anti-OxLDL ($r^2 = 0,574$, $p < 0,0001$) também foi observada neste estudo.

Em relação às citocinas, verificou-se associação positiva moderada significativa entre os níveis da IMA e PCR-us ($r^2 = 0,649$, $p < 0,0001$) e uma forte correlação positiva entre IMA e IL-6 ($r^2 = 0,723$, $p < 0,0001$).

Além disso, foi observada correlação positiva moderada entre os níveis de IMA e PAS ($r^2 = 0,522$, $p < 0,001$) e uma forte correlação com a circunferência abdominal ($r^2=0.716$, $p<0.0001$). Não foi observada correlação entre os níveis de IMA e PAD ($r^2 = 0,177$, $p = 0,168$).

Adicionalmente foram realizadas análises estatísticas para avaliar a associação entre IMA e IMC. O grupo controle não apresentou indivíduos obesos ($>30 \text{ kg/m}^2$), enquanto que no grupo SM 08 (10,8%) indivíduos apresentaram IMC $< 25 \text{ kg/m}^2$, 25 (33,8%) apresentaram sobrepeso ($>25 \text{ kg/m}^2 < 30 \text{ kg/m}^2$) e 41 (55,4%) foram considerados obesos ($> 30 \text{ kg/m}^2$). Não se observou diferença significativa entre IMA e IMC no grupo controle ($<25 \text{ kg/m}^2 = 0,335 \pm 0,049$ e sobrepeso = $0,355 \pm 0,045$, $p=0,398$). O mesmo ocorreu no grupo caso (SM), em que não se verificou diferença significativa entre IMA e IMC ($<25 \text{ kg/m}^2 = 0,625 \pm 0,120$, sobrepeso = $0,572 \pm 0,203$ e obesos = $0,645 \pm 0,0598$, $p=0,477$). Adicionalmente, o teste de correlação de Pearson entre IMA e IMC no grupo caso, bem como no grupo controle não mostrou diferenças significativas ($r^2=0,013$, $p=0,944$ e $r^2= -0,31$, $p=0,865$, respectivamente).

A análise multivariada para observar se os níveis de significância de IMA seriam mantidos após a correção para o IMC foram realizados. A significância estatística foi mantida após a correção para todas as outras variáveis (IMA Wald = 12,394, $p = 0,001$; IMC Wald = 3,866, $p = 0,049$). Além disso, foi realizada uma análise estatística, considerando a estratificação do IMC em cada grupo (controle e SM) separadamente. No grupo controle, 05 indivíduos apresentavam sobrepeso ($>25 \text{ kg/m}^2 < 30 \text{ kg/m}^2$) e 27 apresentaram valores de IMC $< 25 \text{ kg/m}^2$. A análise estatística mostrou valores semelhantes de IMA nestes grupos ($< 25 \text{ kg/m}^2 = 0,335 \pm 0,049$, sobrepeso = $> 25 \text{ kg/m}^2 = 0,335 \pm 0,454$, $p = 0,398$). Como, o número de indivíduos com sobrepeso foi muito baixo, uma análise de correlação de Pearson entre IMA e os valores do IMC foram realizados no grupo controle. Não foi observada uma correlação significativa ($r^2 = 0,013$, $p = 0,944$). Portanto, em nossa amostra, os níveis de IMA apresentaram uma associação com a SM independente dos valores de IMC.

A seguir foi realizada uma análise adicional para averiguar o possível efeito do DM2 nos resultados investigados. Na amostra de pacientes SM 37 (50%) eram portadores de DM2 e 37 (50%) não apresentaram esta morbidade prévia.

Uma comparação entre os biomarcadores investigados entre pacientes sindrômicos com e sem história prévia de DM2 mostrou que, com exceção dos níveis de colesterol total e glicose que foram mais altos nos indivíduos com SM e diabéticos, os níveis da IMA e dos demais biomarcadores foram similares entre os indivíduos com SM, mas sem DM2, previamente diagnosticada. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos nesta análise.

Para averiguar a influência da hipercolesterolemia nos resultados obtidos, uma vez que a literatura descreve associação entre esta morbidade e níveis

elevados de IMA, foi feita uma análise comparativa entre as médias dos biomarcadores investigados entre indivíduos sindrômicos com e sem hipercolesterolemia. Apenas oito indivíduos portadores de SM foram classificados como hipercolesterolêmicos (> 240 mg/dL). Como pode ser observado na Tabela 5, indivíduos com SM e hipercolesterolêmicos apresentaram níveis significativamente mais elevados de colesterol total, LDL-c e triglicerídeos. Os níveis de anti-OxLDL ficaram no limite da significância. Nesta análise, os níveis de IMA também foram similares entre indivíduos com SM portadores ou não de hipercolesterolemia.

Tabela 4 - Comparação de marcadores aterotrombóticos e isquêmico em indivíduos com síndrome metabólica com e sem DM2

Variáveis	Grupos	Média±DP	P
IMA (ABSU)	SM+DM2	0,58±0,18	0,148
	SM	0,65±0,09	
Colesterol Total (mg/dL)	SM+DM2	220,4±57,4	0,007
	SM	180,3±52,5	
HDL-c (mg/dL)	SM+DM2	47,92±13,93	0,897
	SM	48,37±12,11	
LDL-c (mg/dL)	SM+DM2	104,60±47,07	0,207
	SM	123,34±51,81	
Triglicerídeos (mg/dL)	SM+DM2	193,64±174,23	0,249
	SM	234,83±81,50	
Glicose (mg/dL)	SM+DM2	165,90±83,63	0,000
	SM	100,40±16,99	
PCR-us (mg/dL)	SM+DM2	1,88±2,46	0,616
	SM	1,55±1,34	
OxLDL (mg/dL)	SM+DM2	0,70±0,58	0,556
	SM	0,61±0,30	
anti-OxLDL (mg/dL)	SM+DM2	24,40±18,20	0,232
	SM	31,25±15,47	
IL-6 (pg/mL)	SM+DM2	50,90±15,37	0,347
	SM	55,51±13,67	
IMC (Kg/m ²)	SM+DM2	33,03±5,52	0,344
	SM	31,68±6,67	
Circunferência Abdominal (cm)	SMD+DM2	111.39±13.91	0.000
	SM	103.14±11.3	

Tabela 5 - Comparação de marcadores aterotrombóticos e isquêmico em indivíduos com síndrome metabólica com e sem hipercolesterolemia.

Variáveis	Grupos	Média±DP	P
IMA (ABSU)	SM+Hipercolesterolemia	0,60±0,10	0,344
	SM	0,64±0,07	
Colesterol Total (mg/dL)	SM+Hipercolesterolemia	295,37±41,13	0,000
	SM	185,15±44,50	
HDL-c (mg/dL)	SM+Hipercolesterolemia	49,57±15,74	0,827
	SM	48,40±12,70	
LDL-c (mg/dL)	SM+Hipercolesterolemia	182,75±53,86	0,000
	SM	99,43±36,00	
Triglicerídeos (mg/dL)	SM+Hipercolesterolemia	362,00±283,50	0,001
	SM	189,65±84,56	
Glicose (mg/dL)	SM+Hipercolesterolemia	171,87±125,02	0,120
	SM	128,83±56,22	
PCR-us (mg/dL)	SM+Hipercolesterolemia	2,41±1,78	0,649
	SM	1,82±2,11	
OxLDL (mg/dL)	SM+Hipercolesterolemia	0,87±0,19	0,445
	SM	0,66±0,45	
anti-OxLDL (mg/dL)	SM+Hipercolesterolemia	45,60±9,22	0,067
	SM	26,99±16,48	
IL-6 (pg/mL)	SM+Hipercolesterolemia	67,20±11,78	0,086
	SM	52,28±13,96	
IMC (Kg/m ²)	SM+Hipercolesterolemia	32,7±6,0	0,164
	SM	29,6±3,3	
Circunferência abdominal (cm)	SM+Hipercolesterolemia	107.33±14.32	0,871
	SM	106.7±8.56	

Análise multivariada confirmou que associação entre níveis elevados de IMA e SM e foram independentes da história prévia de DM2, de hipercolesterolemia, sexo e idade dos sujeitos investigados ($p=0.0405$). Análise multivariada também mostrou que os níveis de PCR-us, OxLDL, anti-OxLDL e IL-6 foram associados com SM independente de história prévia de DM2, de hipercolesterolemia, sexo e idade dos sujeitos investigados.

A carta de pré-aceite para a publicação do artigo, gerado a partir dos dados da presente tese, no *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* encontram-se no apêndice A e B.

7 DISCUSSÃO

O estudo conduzido postulou a ocorrência de diferenças nos níveis de marcadores lipídicos, oxidativos, inflamatórios e da IMA, que é um potencial marcador de isquemia entre indivíduos com síndrome metabólica e sem síndrome metabólica. Como pode ser observado a partir dos resultados descritos, indivíduos com SM apresentaram níveis maiores de IMA, IL-6, PCR-us, OxLDL e anti-OxLDL do que os controles.

A revisão da literatura, até o presente momento, indica que este é o primeiro estudo a identificar possível associação entre níveis de IMA em indivíduos com SM, ainda que estudos anteriores já tenham descrito que em indivíduos diabéticos e hipercolesterolêmicos este marcador também estaria elevado.^{13,14}

Tais resultados serão discutidos a fim de compreender se os mesmos possuem plausibilidade biológica e se são científica e clinicamente relevantes.

Como foi anteriormente comentada, a alteração da albumina sérica tem sido avaliada como um possível marcador bioquímico de isquemia cardíaca. Isto porque, a isquemia miocárdica produz uma diminuição na capacidade de ligação da albumina a metais de transição, principalmente a ligação desta molécula com o cobalto, o que produz uma alteração com subsequente formação da chamada albumina modificada pela isquemia (IMA). Estudos indicam que o nível de IMA se eleva minutos após o início da isquemia permanecendo alto em um período de 06 a 12 horas. Geralmente após 24 horas ocorre uma diminuição nos valores de IMA.¹⁰⁴ Parece que a IMA seria um bom marcador de isquemia na ausência de necrose, o que significa também que outros marcadores como a troponina não estão elevados.¹⁰⁴

A relevância da IMA como marcadora de isquemia se traduz na rapidez do diagnóstico que pode ser feito antes que ocorra a destruição das células cardíacas, diminuindo a lesão e possibilitando um tratamento terapêutico mais precoce daqueles indivíduos em que se suspeita a ocorrência de IAM.¹¹⁴

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram associação entre níveis de IMA e SM em indivíduos sem isquemia aguda. A plausibilidade biológica desses resultados está baseada em um recente estudo conduzido por Serne et al.,¹¹⁵ em que sugere que o potencial mecanismo fisiopatológico da SM talvez seja a disfunção microvascular, definida como disfunção de resistência de pequenos vasos (diâmetro < 150 µm) que desempenha um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo coronário. Nesse caso, a disfunção microvascular seria um mecanismo de base para a associação entre hipertensão, obesidade e resistência a insulina, que são componentes da SM. Essa hipótese é corroborada por Pirat et al.,¹¹⁶ que estudaram 33 indivíduos com SM e 35 indivíduos controles pareados para idade e sexo e encontraram alterações no fluxo de reserva coronária (FRC) em indivíduos com SM. Esses resultados suportam a idéia que a disfunção microvascular coronária, que é um achado precoce na aterosclerose está presente também em indivíduos com SM. Portanto, a presença de disfunção vascular associada a SM poderia ser uma explicação para o aumento dos níveis de IMA e outros marcadores inflamatórios observados aqui no presente estudo.

Um estudo prévio, realizado por Piowowar et al.,¹³ descreveu uma associação entre IMA e DM2. O estudo analisou 76 diabéticos e 25 controles para investigar a possível conexão entre níveis de IMA, complicações vasculares, controle glicêmico, hipertensão, dislipidemia e obesidade. Os autores encontraram que pacientes com DM2 tinham níveis elevados de IMA em comparação aos

indivíduos controles, independente de outros fatores de risco metabólicos, tais como obesidade e dislipidemia, e aqueles pacientes com um pobre controle glicêmico tinham níveis de IMA mais elevados em relação aos indivíduos com um bom controle glicêmico. Em uma investigação recente realizada por Duarte et al.,¹⁴ também foi encontrado níveis elevados de IMA e hipercolesterolemia (níveis de colesterol entre 250 a 529 mg/dL), quando comparados ao grupo controle (níveis de colesterol entre 104 a 178 mg/dL).

Similarmente, às investigações anteriores realizadas por Duarte et al.,¹⁴ e Piwowar et al.,¹³ o presente estudo encontrou associação entre IMA e SM, porém foi independente de DM2 e hipercolesterolemia. Baseados nessa associação encontrada pode-se postular que esse distúrbio metabólico possa levar a disfunção microvascular, que poderia ser o gatilho para o aumento dos níveis de IMA. Levando em consideração os resultados encontrados com DM2, hipercolesterolemia e SM, os níveis de IMA podem não ter necessariamente uma origem cardíaca, mas sim diversas origens. Nesse sentido, uma questão que precisa ser respondida é: quais são os fatores bioquímicos e fisiológicos comuns para essas morbidades e o possível gatilho para o aumento dos níveis de IMA? Investigações sugerem que a modificação estrutural da albumina pode ocorrer como resultado da hipóxia endotelial e extracelular, acidose, tensão reduzida de oxigênio, disfunção da bomba de íons e geração de EAOs.^{100,102} O desbalanço na produção de EAOs, o qual causa o estresse oxidativo, são bem conhecidas como moléculas responsáveis por danos a proteínas, lipídeos, carboidratos, DNA e nucleotídeos, bem como danos a estrutura da membrana celular. Um estudo experimental sugere que EAOs, principalmente o radical hidroxila pode modificar a albumina humana, resultando em formação de IMA.¹¹⁷

O papel do estresse oxidativo na SM ainda não está totalmente esclarecido, mas a sua importância nesse processo reside principalmente nas manifestações associadas a SM, tais como a aterosclerose, hipertensão, obesidade e resistência à insulina. Por esse motivo, tem sido sugerido que o estresse oxidativo pode ser um evento primário e desencadeador da SM, mais do que meramente uma consequência.⁸

Indivíduos com SM têm elevados níveis de dano oxidativo, evidenciado pela diminuição da proteção antioxidante, da atividade da superóxido dismutase, aumento da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.⁶⁰ Adicionalmente, investigações epidemiológicas, como o estudo de *Framingham*, também têm reportado que o IMC e o diabetes estão intimamente associados com o estresse oxidativo sistêmico, e que as EAOs podem ser o mecanismo de ligação entre SM e dieta associados com a hipertensão (alta ingestão de sal) e obesidade (alta ingestão de gorduras).¹¹⁸

O presente estudo suporta a hipótese da associação entre SM e estresse oxidativo, uma vez que foi observado níveis elevados de moléculas geradas e associadas com o estresse oxidativo, tais como a Ox-LDL e o anti-OxLDL, bem como moléculas envolvidas na resposta inflamatória, como a PCR-us e a IL-6. Além disso, também foram verificadas significativas e positivas correlações entre essas moléculas e níveis de IMA.

A OxLDL desempenha um papel crucial no desenvolvimento da aterosclerose, e dados experimentais suportam a hipótese que OxLDL está associada também com a SM.⁷⁷ Esses autores reportaram que altas concentrações de OxLDL foram associadas com o aumento da incidência de SM, bem como seus componentes, obesidade abdominal, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Portanto, os resultados

aqui descritos também mostraram uma associação similar entre OxLDL, anti-OxLDL e SM.

A modificação oxidativa da LDL induz a formação de epítopes imunogênicos na molécula de LDL, o qual leva a formação de anticorpos contra a OxLDL, que pode ser detectada no soro.¹¹⁹ Estudos têm demonstrado que a molécula de anti-OxLDL pode bloquear a captação de OxLDL pelos macrófagos em lesões ateroscleróticas, sugerindo um possível papel protetor para a formação de células espumosas.¹²⁰ Entretanto, como os resultados aqui obtidos mostraram correlação positiva entre IMA, OxLDL e anti-OxLDL, ou seja, correlação diretamente proporcional, mesmo que o sistema imune esteja tentando combater as OxLDLs, através do anti-OxLDL, os níveis de IMA continuam aumentados, incrementando o risco de eventos isquêmicos em indivíduos com SM em relação aos controles.

O estresse oxidativo pode ser um determinante dos níveis de PCR-us e promove processos inflamatórios pró-aterogênicos em estágios iniciais do desenvolvimento da doença coronariana, e tem sido previamente associado com SM e DM2.^{116,121} Uma metanálise de estudos prospectivos demonstrou um aumento do risco de doença coronariana com o aumento dos níveis de PCR-us.¹²² Elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 são considerados marcadores de inflamação sistêmica e forte determinante de eventos ateroscleróticos futuros.¹²³ Um estudo de caso-controle, realizado por Van Guilder et al.,¹⁸ mostrou que indivíduos obesos com SM apresentaram significativamente altas concentrações plasmáticas de OxLDL (62.3 +/- 3.2 versus 54,0 +/- 4.0 U/L; $p < 0.05$), PCR (3.0 +/- 0.6 vs. 1.5 +/- 0.3 mg/L; $p < 0.01$), TNF- α (2.1 +/- 0.1 vs. 1.6 +/- 0.1 pg/mL; $p < 0.05$), IL-6 (2.8 +/- 0.4 vs. 1.4 +/- 0.2 pg/mL; $p < 0.01$) e interleucina-18 (IL-18) (253 +/- 16 vs. 199 +/- 16 pg/mL; $p < 0.01$), comparado com adultos obesos sem SM. Estes resultados sugerem

que a SM intensifica o estresse oxidativo e a cascata de eventos inflamatórios em adultos obesos. Além disso, o aumento do estresse oxidativo e inflamatório pode contribuir para um grande risco para DCV e cerebrovascular em adultos obesos com SM.

Succurro et al.,⁹⁷ mostraram que a IL-6 está correlacionada com resistência a insulina e componentes individuais da SM. Além disso, mostrou que níveis aumentados de IL-6 conferem risco aumentado de ter SM sob condições patofisiológicas, tais como, resistência à insulina e obesidade visceral. Estudos têm mostrado que a IL-6 afeta a produção de PCR, o que, por sua vez afeta a produção de moléculas de adesão, de coagulação e aumenta a captação de OxLDL. Dessa forma interferindo na modulação de muitos dos eventos que promovem a doença aterosclerótica.¹²⁴ Aqui também foi verificada uma moderada correlação, positiva entre IMA e PCR-us e uma forte correlação entre IMA e IL-6. Nesse caso, é importante destacar o papel da IL-6 como uma mediadora da inflamação, desempenhando a função de citocina chave na resposta de fase aguda, bem como seus efeitos, que incluem a estimulação da PCR e produção de fibrinogênio no fígado, liberação de leucócitos e plaquetas da medula óssea e ativação do endotélio e homeostase.¹²⁵ Muitos estudos têm associado os níveis de IL-6 com obesidade e componentes da SM, principalmente com a resistência a insulina e dislipidemia.^{126,127,128} Wannamethee et al.,¹²⁹ investigaram a relação entre níveis plasmáticos de IL-6, resistência a insulina, marcadores metabólicos, inflamatórios e hemostáticos em 3490 homens com idade entre 60 a 79 anos ingleses. Os autores mostraram que a IL-6 estava significativamente associada com a idade, IMC, circunferência abdominal, tabagismo, baixa atividade física, classe social e ingestão alcoólica. Entretanto, não encontraram associação entre IL-6 com resistência a

insulina ou outros componentes (glicose, triglicerídeos, pressão arterial, exceto para a HDL-c), hematócrito, fator VII e adiponectina depois de ajustado para idade e circunferência abdominal. Porém, os autores também encontraram uma forte associação entre IL-6 com outros marcadores, tais como PCR, fibrinogênio, leucócitos, viscosidade plasmática, com marcadores de coagulação (fibrina, dímero D, fator VIII e fator IX) e marcadores de disfunção endotelial (fator de Von Willebrand, tecido ativador de plasminogênio). Depois de ajustada para fibrinogênio, a associação entre IL-6 e viscosidade plasmática permaneceu significativa, que é consistente com a hipótese de que a IL-6 induz o aumento de proteínas séricas, que por sua vez aumentam a viscosidade sérica e plasmática. O risco para a SM aumentou significativamente com o aumento dos níveis de IL-6, mas foi atenuada depois de ajustada para IMC. Os autores sugerem que a IL-6 pode ter um potencial papel como uma mediadora entre fatores de risco cardiovascular e diversos mecanismos biológicos para a DCV. Esses achados, em parte corroboram os nossos resultados, uma vez que foi encontrada correlação entre IL-6 e IMA, que é uma proteína sérica, bem como, níveis aumentados dessa citocina em indivíduos com SM. Uma possível explicação para os resultados encontrados seria que indivíduos com SM têm um processo inflamatório instalado e contínuo. Além disso, a inflamação pode causar edema tecidual, que por sua vez, pode alterar a fisiologia vascular, levando a uma diminuição na perfusão do oxigênio (ou seja, menos aporte de oxigênio aos tecidos). Em consequência disso, os níveis de IMA, que é a albumina modificada pela maior demanda de oxigênio do que de suprimento (isquemia) podem se elevar.

Uma pergunta que podemos explorar é se níveis mais elevados de IMA poderiam estar relacionados com valores de IMC? Infelizmente nossa amostra

controle não apresentou indivíduos obesos. Por este motivo, foi realizada uma análise estatística adicional, considerando a estratificação do IMC, e os resultados sugerem que a IMA e os valores de IMC não estão diretamente relacionados. Neste caso, essa questão precisa ser estudada em uma investigação complementar.

Outras considerações importantes que precisam ser comentadas sobre a associação entre os níveis de IMA e SM dizem respeito aos possíveis fatores intervenientes relacionados a modulações dos níveis de IMA, incluindo exposição farmacológica ou terapia medicamentosa. Um estudo que incluiu 37 pacientes com DAC estável, submetidos à avaliação não-invasiva, e a um teste de estresse farmacológico foi realizado. Os autores descobriram que os níveis plasmáticos IMA mudaram significativamente durante o teste de estresse farmacológico.¹³⁰ No entanto, as investigações sobre a possível influência da terapia farmacológica em níveis IMA ainda são incipientes. Outra importante variável interveniente sobre os níveis IMA poderia ser o nível de lipídeos, como os triglicerídeos. As investigações sugerem que os triglicerídeos têm uma função de armazenamento de toxicidade resultante, principalmente, da cadeia longa de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) e seus produtos como ceramidas e diacilgliceróis. Como os critérios de SM, incluem níveis mais elevados de triglicerídeos (> 150 mg/ dL), essa variável poderia interferir nos níveis IMA. No entanto, em um estudo anterior realizado por Gidenne et al.,¹³¹ as concentrações de triglicerídeos não mostraram interferência significativa nos níveis IMA. Estudos anteriores que analisaram os valores de IMA entre normolipídeos e hipercolesterolêmicos corroboram estes dados, uma vez que não foi encontrada associação positiva entre os níveis de triglicerídeos e IMA.¹⁴

Em síntese, o presente estudo mostrou altas concentrações de IMA em indivíduos com SM, bem como associação entre SM e outros biomarcadores que

aumentam o risco cardiovascular. Os níveis elevados de IMA, PCR-us, IL-6, OxLDL e anti-OxLDL em indivíduos com SM indicam um processo inflamatório e isquêmico possivelmente mais acentuado do que encontrados em indivíduos saudáveis. Logo, pode-se inferir que esses indivíduos têm um risco aumentado para desencadear a cascata de eventos aterotrombóticos e evoluir para SCA. Além disso, uma vez que não existe padrão-ouro (usa-se múltiplas ferramentas, onde o ECG na entrada é o padrão) para o diagnóstico da isquemia cardíaca, o presente estudo corrobora outros estudos que já demonstraram que a IMA tem valor preditivo negativo para SCA e alta sensibilidade para eventos clínicos adversos, na ausência de necrose.

99,102,104

Como o estresse oxidativo está associado com muitos componentes da SM,^{8,9} como a resistência à insulina, hipertensão, aumento dos lipídeos e de marcadores inflamatórios e disfunção endotelial, estudos adicionais incluindo investigações de variações genéticas e padrão dietético, associadas ao metabolismo oxidativo, necessitam ser realizados para auxiliar na elucidação da associação entre IMA e SM e seu potencial papel clínico, com vistas à prevenção da morbi-mortalidade por DCV.

8 CONCLUSÕES

- Indivíduos com SM apresentaram médias significativamente maiores de IMC, PAS, PAD, CT, LDL-c, triglicérides, glicose, circunferência abdominal, IMA, PCR-us, IL-6, OxLDL e anti-OxLDL com relação aos indivíduos controles.

- A análise de correlação de Pearson mostrou correlação positiva de moderada à forte entre IMA e: glicose, CT, TG, LDL, PAS, OxLDL, anti-OxLDL, PCR-us, e IL-6; Não foi observada correlação entre os níveis de IMA, IMC e PAD; Entretanto, foi observada correlação negativa entre IMA e HDL-c;

- Análise multivariada confirmou que os níveis de IMA foram independentes de DM2, hipercolesterolemia, sexo e idade dos sujeitos investigados;

- Análise multivariada também mostrou que os níveis de PCR-us, OxLDL, anti-OxLDL e IL-6 foram associados com SM independente de DM2, hipercolesterolemia, sexo e idade dos sujeitos investigados.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante ponderar algumas considerações associadas ao desenho metodológico do estudo. O estudo conduzido foi do tipo caso-controle com uma amostra relativamente pequena, o que impede análises mais complexas e acuradas. Contudo, ainda existe a possibilidade de que fatores genético-ambientais possam estar influenciando nos resultados descritos. Por exemplo, estudos prévios, conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa tem reportado achados sugerindo associação entre obesidade ou sobrepeso, SM e polimorfismos genéticos envolvidos no metabolismo oxidativo, lipídico e vascular.^{37,132} Para minimizar o impacto das variáveis de confusão, o estudo foi conduzido com sujeitos com idades similares, não fumantes e que não estivessem utilizando medicamentos que pudessem influenciar nos marcadores inflamatórios e oxidativos (por exemplo estatinas). Adicionalmente, todos os indivíduos com SM incluídos nesse estudo eram sedentários e foram avaliados pelo serviço de cardiologia. Os indivíduos saudáveis também foram avaliados e não apresentaram qualquer disfunção ou morbidades relacionadas à SM. Entretanto, resguardadas as limitações, o estudo abre perspectivas de investigações adicionais que podem ser importantes para a elucidação das relações complexas que existem no processo aterotrombótico e na evolução do mesmo para eventos isquêmicos vasculares em indivíduos com SM instalada.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica, no. 14, 2006. http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcd14.pdf (Acesso em abril de 2009).
2. Informações sobre mortalidade. DATASUS (<http://www.datasus.gov.br>) (Acesso em abril de 2009).
3. Futuyama DJ. Biologia evolutiva. 2ª ed. Ribeirão Preto: SBG, 1997. 631 p.
4. Leonard WR, Robertson ML. Evolutionary perspectives on human nutrition: the influence of brain and body size on diet and metabolism. *Am J Human Biol.* 1994; 6: 77-88.
5. Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Mussel DP, da Cruz IB. Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genet Mol Res.* 2005 Dec 30;4(4):691-703.
6. Montano MAE, Barrio LJP, Gottlieb MG, Schwanke CHA, Rocha MIUM, Manica-Cattani MF, Santos GF, Cruz IBM. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2009; 5:1-8.
7. Gottlieb MG, Bodanese LC, Schwanke CHA, Schneider RH, Cruz IBM. O Papel do Estresse Oxidativo e do Status Antioxidante no Diabetes mellitus tipo 2: relevância para a cardio-geriatria. In: Schwanke CHA, Schneider RH organizadores. *Atualização em Geriatria e Gerontologia: da pesquisa básica à prática clínica.* Porto Alegre: EDIPUCRS; 2008. p. 103-122.

-
8. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*. 2009; 84: 705–712.
 9. Ando K, Fujita T. Metabolic syndrome and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 47:213–218.
 10. Cordain L, Eades MR, Eades MD. Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 2003;136: 95–112.
 11. Chew GT, Gan SK, Watts GF. Revisiting the metabolic syndrome. *Med J Aust*. 2006 Oct; 185(8):445-449.
 12. Eaton SB, Konner M. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *N Engl J Med*. 1985;312:283-9.
 13. Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M. Ischemia-modified albumin level in type 2 diabetes mellitus - Preliminary report. *Dis Markers*. 2008;24(6):311-317.
 14. Duarte MM, Rocha JB, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IB, Loro VL, Schetinger MR. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem*. 2009 May;42(7-8):666-671.
 15. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2007/IV_diretriz_DA.asp. Acesso em 27 Abril de 2009.

-
16. Cálculo de risco cardiovascular pelo Escore de Framingham. Ministério da Saúde. http://dtr2004.saude.gov.br/dab/cnhd/score_framingham/ Acesso em abril de 2009.
17. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 2002;288(21):2709-2716.
18. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Dec;14(12):2127-2131.
19. Hwang L, Bai C, Chen C. Prevalence of obesity and metabolic syndrome in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2006; 105(8):626-635.
20. Ferdinand KC, Clark LT. The epidemic of diabetes mellitus and the metabolic syndrome in African-Americans. *Rev Cardiovasc Med*. 2004; 5(3):S28-33.
21. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005; 365:1415-1428.
22. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield S B. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Archives of Internal Medicine*. 2003;163 (4):427-436.

-
23. Guize L, Thomas F, Pannier B, Bean K, Danchin N, Benetos A. Metabolic syndrome: prevalence, risk factors and mortality in a French population of 62 000 subjects. *Bull Acad Natl Med.* 2006; 190 (3): 685-97.
24. Santos AC, Lopes C, Barros H. Prevalence of metabolic syndrome in the city of Porto. *Rev Port Cardiol.* 2004; 23 (1): 45-52
25. Cabrera MAS, Gebara OCE, Diament J, Nussbacher A, Rosano G, Wajngarten M. Metabolic syndrome, abdominal obesity, and cardiovascular risk in elderly women. *Int J Cardiol.* 2007; 114:224-229.
26. Salaroli LB, Barbosa GC, Mill JG, Molina MCB. Prevalência de síndrome metabólica em estudo de base populacional, Vitória, ES – Brasil. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007; 51(7):1143-1152.
27. Gottlieb MG, Da Cruz IBM, Bodanese LC. Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. *Scientia Medica.* 2008; 18(1):31-38.
28. Finch CE, Stanford CB. Meat-adaptive genes and the evolution of slower aging in humans. *Q Rev Biol.* 2004 79: 3-50.
29. Simopoulos AP. Genetic variation and evolutionary aspects of diet. In: PAPANICOLAOU A, editor. *Antioxidants in nutrition and health.* Boca Raton: CRC Press, 1999. p. 65-88.
30. Leonard WR. Food for thought: dietary change was a driving force in human evolution. *Scientific American,* december, p.108-115, 2002.

-
31. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37 (12): 1595–1607.
32. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991;4 (3):173-194.
33. Saad MJA, Zanella MT, Ferreira SRG. Síndrome metabólica: ainda indefinida, mas útil na identificação do alto risco cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006 50(2): 208-215.
34. Marchesini G, Forlani F, Cerrelli R. WHO and ATPIII proposals for the definition of the metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2004; 21:383-387.
35. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATPIII). *JAMA* 2001; 285:2486-97.
36. International Diabetes Federation (IDF). The new International Diabetes Federation definition. Disponível em: www.idf.org. Acesso em: set. 2005.
37. Gottlieb MG, Bodanese LC, Leite LEA, Schwanke CHA, Piccoli JCE, da Rocha MIUM, da Cruz IBM. Association between the Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor and metabolic syndrome in free-living community elderly. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2009;7:1-8.
38. Kendall DM, Harmel AP. The metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease: understand the role of insulin resistance. *Am J Manag Care*. 2002; 8(20):S635-53.

-
39. Lottenberg SA, Glezer A, Turatti LA. Metabolic syndrome: identifying the risk factors. *Jornal de Pediatria*. 2007;83 (5 Supl):S204-208.
40. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
41. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, *et al.* Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants and risk of breast cancer. *Cancer Research*, 1999 Feb 1; 59 (3): 602-606.
42. Steffen LM, Jacobs Jr DR, Stevens J, Shahar E, Carithers T, Folsom AR. Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 2003 Sep; 78(3):383-390.
43. Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown D. The Metabolic syndrome and antioxidant concentrations. *Diab*. 2003; 52:2346-2352.
44. Zelko NI, Mariani JT, Folz JR. Superoxide Dismutase Multigene Family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radical Biol & Med* 2002; 33(3): 337-49.
45. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schafers HJ, Nickenig G, Bohm M, *et al.* Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation*. 2003 Sep 30;108(13):1567-74.

-
46. Orem C, Orem A, Uydu HA, Celik S, Erdol C, Kural BV. The effects of lipid-lowering therapy on low-density lipoproteins auto-antibodies: relationship with low-density lipoprotein oxidation and plasma total antioxidant status. *Coron Artery Dis.* 2002; Feb; 13(1): 65-71.
47. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; 414(13):813-820.
48. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, et al. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β -cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2003; (300): 216-22.
49. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *J. Biochem.* 2007; 401:1–11.
50. Praticó D, Lee VMY, Trojanowski JQ, Rokach J, Fitzgerald GA. Increased F₂-isoprostanes in Alzheimer's disease: evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *FASEB J.* 1998;12: 1777-1783.
51. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002; 82:47-95.
52. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988; 37 (12): 1595–1607.

-
53. Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of Internal Medicine*. 1989;149(7):1514–1520.
54. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third national health and nutrition examination survey. *Journal of the American Medical Association*. 2002;287(3):356–359.
55. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, et al. Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24(4): 683-689.
56. Negre-Salvayre A, Salvayre R, Auge N, Pamplona R, Portero-Otin M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Jun 2. [Epub ahead of print]
57. Dey A, Chandrasekaran K. Hyperglycemia induced changes in liver: in vivo and in vitro studies. *Curr Diabetes Rev*. 2009 May;5(2):67-78.
58. Osawa T, Kato Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1043:440-451.
59. Ogiwara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sakoda H, Anai M, et al. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with increased oxidative stress and enhanced insulin signaling. *Hypertension*. 2002;40:872–879.
60. Ndisang JF, Lane N, Jadhav A. The heme oxygenase system abates hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats by potentiating insulin-sensitizing pathways. *Endocrinology*. 2009 May;150(5):2098-108.

-
61. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(10):4673–4676.
62. Armutcu F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A. Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2008;46 (6):785–790.
63. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, et al. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation*. 2002;105:576–582.
64. Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the third national health and nutrition examination survey. *Diabetes*. 2003; 52 (9):2346–2352.
65. Braunwald E. *Atlas de doenças cardiovasculares*. Porto Alegre: Artmed, 1998. p.1.1.
66. Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, et al. Role of Oxidized LDL in Atherosclerosis. *Annals New York Acad of Scienc*. 2002; 199-206.
67. Steinberg D, Parathasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989; 320: 915-24.
68. Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis: current concepts. *JAMA*.1990; 264: 3047-3052.

-
69. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*. 1994; 344: 793-795.
70. Gottlieb MG. Hipótese da modificação oxidativa na aterosclerose. *Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica*. 2006;3:120-126.
71. Simionescu N, Simionescu M. *Endothelial Cell Biology in Health and Disease*. New York: Plenum Press, 1988.
72. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards AD, et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995; 91: 2488-2496.
73. Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1989; 264:2599-604.
74. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA . CD-36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1993; 268:1811-1816.
75. Hackam GD, Anand SS. Emerging Risk Factors for Atherosclerotic Vascular Disease – A Critical Review of the Evidence. *JAMA*. 2003; 290:932-940.
76. Holvoet P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2008;70(3):193-219.

-
77. Holvoet P, Stassen JM, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 100-117.
78. Holvoet P, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoproteins is a prognostic marker of transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 698-702.
79. Holvoet P, Lee DH, Steffes M, Gross M, Jacobs DR. Association Between Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein and Incidence of the Metabolic Syndrome. *JAMA.* 2008 May 21; 299(19): 2287–2293.
80. Sanches LB, da Silva IT, Paz AF, Fisberg M, Cintra IP, Villar BS, et al. Anti-oxLDL autoantibodies and their correlation with lipid profile and nutritional status in adolescents. *J Pediatr (Rio J).* 2008 May-Jun;84(3):258-263.
81. Witztum JL, Horkko S. The role of oxidized LDL in atherogenesis: immunological response and anti-phospholipid antibodies. *Ann NY Acad Sci.* 1997; 811:88-96.
82. Puurunen M, Manttari M, Manninen V, Tenkanen GA, Ehnholm, OV. Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarction. *Arch Intern Med.* 1994;154:2605-2609.

-
83. Wu R, Nityanand S, Beglund L, Lithell H, Holm G, Lefvert AK. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LSL in 50-year-old men predict myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:3159-3163.
84. Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, Patel R, Pattison J, Miller E, et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Feb 5; 41(3):360-370.
85. Fukumoto M, Shoji T, Emoto M, Kawagishi T, et al. Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:703-707.
86. Hulthe J, Bokemark L, Fagerberg B. Antibodies to oxidized LDL in relation to intima-media thickness in carotid and femoral arteries in 58-years-old subjectively clinically healthy men *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:101-107.
87. Salonen J, Yla-Herttula S, Yamamoto R, Butler HK, Nyyssonen WP, Witztum JL. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 1992; 339:883-887.
88. Tornvall P, Waeg G, Nilsson J, et al. Autoantibodies against modified low-density lipoproteins in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2003; 167:347-353.

-
89. Guzik TJ, Mangalat D, Korbut R. Adipocytokines- Novel Link Between Inflammation and vascular function? *Journal of Physiology and Pharmacology* 2006;57(4): 505-528.
90. Nissen SE, Tzcu EM, Schoenhagen P, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl Jmed.* 2005;352:29-38.
91. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl Jmed.* 2005;352:20-28.
92. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation.* 2003 Jan 28;107(3):363-369.
93. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, et al. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1959–1965.
94. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA.* 2001; 285: 2481–2485.
95. Albert CM, Ma J, Rifai N, et al. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation.* 2002; 105: 2595–2599.
96. Rush EC, Plank , LD, Yajnik CS. Interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and insulin relationships to body composition, metabolism and resting energy expenditure in a migrant Asian Indian population. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007 May;66(5):684-90.

-
97. Succurro E, Andreozzi F, Sciaqua A, Hribal ML, Perticone F, Sesti G. Reciprocal association of plasma IGF-1 and interleukin-6 levels with cardiometabolic risk factors in nondiabetic subjects. *Diabetes Care*. 2008;31(9):1886-1898.
98. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-Reactive Protein, the Metabolic Syndrome, and Risk of Incident Cardiovascular Events An 8-Year Follow-Up of 14 719 Initially Healthy American Women. *Circulation*. 2003;107;391-397.
99. Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, Yang J, Ortega-Lopez AM, Shinoda H, et al. Evaluation of Human Serum Albumin Cobalt Binding Assay for the Assessment of Myocardial Ischemia and Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry*. 2003;49:4 581–585.
100. Bar-Or D, Curtis G, Rao N, Bampos N, Lau E. Characterization of the Co(2+) and Ni(2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. *Eur J Biochem*. 2001; 268: 42-47.
101. Chan B, Dodsworth N, Woodrow J, Tucker A, Harris R. Site specific N-terminal auto-degradation of human serum albumin. *Eur J Biochem*. 1995; 227: 524-528.
102. Cho DK, Choi JO, Kim SH. Ischemia-modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary vasospasm. *Coron. Artery Dis*. 2007;18 (2):83-87.
103. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. Novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia—a preliminary report. *J Emerg Med*. 2000;19:311-315.

-
104. Bar-Or D, Winkler JV, Van Bengthuysen K, Harris L, Lau E, Hetzel FW. Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: a preliminary comparison to creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I. *Am Heart J.* 2001;131:985-991.
105. Morrow DA, De Lemos, Sabatine MS, Antman EM. The search for a biomarker of cardiac ischemia. *Clin. Chem.* 2003;49(4):537-539.
106. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health National Heart, Lung, and Blood Institute National High Blood Pressure. 2004
107. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2007.
108. Tonks DB. Quality control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagent Division, Scarborough, Canadá; 1972.
109. Friedewald WT, Levi RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18:499-502.
110. Giannini SD. Aterosclerose e dislipidemias. São Paulo: BG Cultural, 1998. p. 157.

-
111. Wu R, Lefvert AK. Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein (OxLDL): characterization of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL. *Clin Exp Immunol.* 1995;102:174-180.
112. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM, et al. New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). *Clin Chem.*1994;40:934-8.
113. Chawla R, Navendu G, Rajneesh C, Shweta G. Ischemia modified albumin: A novel marker for acute coronary syndrome. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2006;21(1):77-82.
114. Worster A, Devereaux PJ, Heels-andell D, Guyatt GH, Opie J, Mookadam, F, et al. Capability of ischemia-modified albumin to predict serious cardiac outcomes in the short term among patients with potential acute coronary syndrome. *CMAJ.* 2005;173(13):1685-1690.
115. Serne EH, de Jongh RT, Eringa EC, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension.* 2007; 50:204-211.
116. Pirat B, Bozbas H, Simsek V, Yildirim A, Sade EL, GURSOY Y, et al. Impaired coronary flow reserve in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2008; 201:112-116.
117. Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart.* 2006;92:113-114.

-
118. Keany F Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:434-439.
119. Palinski W, Witztum JL. Immune responses to oxidative neopeptides on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *J Intern Med.* 2000;247:371-80.
120. Shaw PX, Horkko S, Tsimikas S, Chang M, Palinski W, Silverman G, et al. Human-derived anti-oxidized LDL autoantibody blocks uptake of oxidized LDL by macrophages and localizes to atherosclerotic lesion in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1333-9.
121. Kasap S, Gönenç A, Şener DE, Hisar I. Serum cardiac markers in patients with acute myocardial infarction: oxidative stress, C-reactive protein and N-terminal pro-brain natriuretic peptide. *J Clin Biochem Nutr.* 2007;41:50-57.
122. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfiel GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A 2004 C-Reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350:1387-1397.
123. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.* 2000;101:1767-1772.

-
124. Anwaruddin S, Askari AT, Topol EJ. Redefining Risk in Acute Coronary Syndromes Using Molecular Medicine. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;49(3):279-289.
125. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med*. 1998; 128: 127–37.
126. Zuliani G, Volpato S, Ble A, Bandinelli S, Corsi AM, Lauretani F, et al. High interleukin-6 plasma levels are associated with lowHDL-C levels in community-dwelling older adults: the InChianti study. *Atherosclerosis*. 2007;192: 384–90.
127. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280: E745–751.
128. Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, et al. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 1154–1159.
129. Wannamethee SG, Whincup PH, Rumley A, Lowe GDO. Inter-relationships of interleukin-6, cardiovascular risk factors and the metabolic syndrome among older men. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007; 5(8):1637 – 1643.
130. Sbarouni E, Georgiadou P, Panagiotakos D, Kyrzopoulos S, Tsiapras D, Voudris V, Kremastinos DT. Ischemia modified albumin in relation to pharmacologic stress testing in coronary artery disease. *Clin Chim Acta*. 2008;396 (1-2):58-61.

131. Gidenne S, Ceppa F, Fontan E, Perrier F, Burnat P. Analytical performance of the Albumin Cobalt Binding (ACB) test on the Cobas MIRA Plus analyzer. *Clin Chem Lab Med.* 2004; 42(4):455-461.

132. Montano MAE, Lera JPB, Gottlieb MG, Schwanke CHA, da Rocha MIUM, Manica-Cattani MF, et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and elderly obesity. *Mol Cell Biochem.* 2009;5:1-8.

APÊNDICE A

Carta de Pré Aceite do *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.

Date: Mon, 5 Oct 2009 09:34:01 -0400

> From: sherman@endo-society.org

> To: ibmcruz@hotmail.com

> Subject: Manuscript 09-1592 Version 2

> Ivana B. Cruz, Mrs.

> Universidade Federal de Santa Maria

> Departamento de Morfologia Centro de Ciências da Saúde

> Av Roraima 1000 Prédio 19

> Santa Maria Brazil

> Dear Dr. Cruz:

> The editors and reviewers have completed their review of your manuscript, # 09-1592 Version 2; "ASSOCIATION AMONG METABOLIC SYNDROME, ISCHEMIA, INFLAMATORY, OXIDATIVES AND LIPIDS BIOMARKERS." We are pleased to inform you that your paper will be acceptable for publication in *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* once a few points have been addressed.

> You must submit your revised manuscript within one month. In a covering letter, detail the changes that you have made, enumerating the specific comments of the reviewers and explaining point-by-point how each has been addressed. The resubmitted version of your paper must also conform to the Journal's requirements for a structured abstract and word limits. Authors MUST include the word counts on the submission form. Information about these requirements can be found in the Instructions to Authors (<http://jcem.endojournals.org/misc/ittoa.shtml>).

>

> All papers must include a precis on the title page of the revised article. The precis should be a single sentence, written in the present tense and stating the conclusion(s) of the manuscript (ie, the bottom line). Please refer to the "Instructions for Authors Resubmitting Revised Manuscript" below.

> Congratulations on the provisional acceptance of your manuscript. Thank you for giving us the opportunity to review and publish your paper.

>
> Sincerely,

Paul W. Ladenson, M.D.

Editor-in-Chief

>
> *****
>
> INSTRUCTIONS FOR AUTHORS RESUBMITTING REVISED MANUSCRIPTS
>
> >
> On the My Manuscript page, find the manuscript title and click on the blue "Resubmit"
button, which is located next to the manuscript status. Click on the "Instructions for
Resubmitting" button for detailed instructions.

>
> Note that the "Affirmation of Originality and Assignment of Copyright" form must be
received by the Editorial Office before the revised manuscript will be re-reviewed. If you
did not transmit this with your original submission, you must do so now when submitting
the revised manuscript.

>
> You must submit source files (text and graphics) with your revised manuscript. Source
files must be in acceptable publication format (Word for the text, references and tables
and TIFF, PowerPoint, or EPS for figures; see <http://cjs.cadmus.com/da> for details).
Authors should check their figures using Rapid Inspector
(<http://rapidinspector.cadmus.com/ea/index.jsp>). Questions regarding source files for
digital art can be directed to digitalart@cadmus.com. Files may be zipped (for PC) for
faster submission or compressed using StuffIt (for MAC),

>
> If you have problems uploading files, there are two alternatives. For both choices, you
must first fill out the resubmission portion, uploading your cover letter and rebuttal. Then
click upload by mail. You may use the Cadmus FTP site at
<http://rapidsubmission.cadmus.com/endo> to upload your files to the Journal office.
Please be sure to upload both text and graphic files. Alternatively, you may express mail
these electronic files on a Zip disk or CD to:

> Scott Herman

> Managing Editor, JCEM

> The Endocrine Society

> 8401 Connecticut Avenue, Suite 900

> Chevy Chase, MD 20815-5717 USA

> Tel. 301-951-2615

> If you have any questions regarding submission of your manuscript source files, please contact Scott Herman (sherman@endo-society.org).

>

>

>

> REVIEWER 1:

> Comments:

> The authors have revised the paper which is improved. However, they still report the correlation data (Table 3) where the value is very doubtful. The original request was to delete data on correlations and instead report the independent predictive role of IMA based on a multiple regression model, which would be of more value to the reader.
> Further, the discussion is quite long and would benefit from being shorter and more to the point.

APÊNDICE B

Artigo gerado a partir dos resultados da presente tese de doutorado:

**ASSOCIATION BETWEEN METABOLIC SYNDROME, ISCHEMIA,
INFLAMMATORY, OXIDATIVES AND LIPIDS BIOMARKERS**

Metabolic Syndrome and Biomarkers

Maria Gabriela Valle Gottlieb¹, Ivana Beatrice Mânica da Cruz², Marta F. Duarte³, Rafael Noal Moresco⁴, Mário Wiehe⁵, Carla Helena Augustin Schwanke⁶, Luiz Carlos Bodanese⁷

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Serviço de Cardiologia, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Address: Av. Ipiranga, 6690, 3º floor. 90610-000 – Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55-51-33205120. e-mail: vallegot@hotmail.com.

² Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Address: Avenida Roraima, 1000. 97105-900, Santa Maria, RS – Brazil. Tel: +55-51-32208736, Fax: +55-51-32208736. e-mail: ibmcruz@hotmail.com

³ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Address: Avenida Roraima, 1000. 97105-900, Santa Maria, RS – Brazil. Tel: +55-51-32208736, Fax: +55-51-32208736. e-mail: duartmm@hotmail.com

⁴ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Address: Avenida Roraima, 1000. 97105-900, Santa Maria, RS – Brazil. Tel: +55-51-32208736, Fax: +55-51-32208736. e-mail: rafael.moresco@hotmail.com

⁵Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Serviço de Cardiologia, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Address: Av. Ipiranga, 6690, 3º

floor. 90610-000 – Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55-51-33205120. e-mail: mariowiehe@terra.com.br

⁶ Instituto de Geriatria e Gerontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Address: Av. Ipiranga, 6690, 3º floor. 90610-000 – Porto Alegre, RS, Brazil. Instituto de Geriatria e Gerontologia. Tel: + 55 -51 33368153. e-mail: schwanke@pucls.br

⁷ Serviço de Cardiologia, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Address: Av. Ipiranga, 6690, 3º floor. 90610-000 – Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55-51-33205120. e-mail. lcbodanese@pucls.br

Corresponding author: Ivana B. M. Da Cruz

Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria. Address: Avenida Roraima, 1000. 97105-900, Santa Maria, RS - Brazil

Tel: +55-51-32208736, Fax: +55-51-32208736

e-mail: ibmcruz@hotmail.com

Key terms for indexing: Risk Factors, Metabolic Syndrome, Ischemia-Modified Albumin.

Disclosures: the present study does not have real or apparent conflicts of interest.

ABSTRACT

Context: Metabolic syndrome (MS) is described as a cluster of cardiometabolic risk factors. Studies suggest that ischemia-modified albumin (IMA) is a biomarker of cardiovascular diseases. IMA levels could be associated with cardiometabolic risks and represent a possible indication of microvascular dysfunction in MS patients. Objective: To confirm this possible association, we evaluated the association between IMA levels and MS. Design: We performed a case-control study (32 healthy individuals and 74 with MS) to evaluate the association between MS, IMA and other biomarkers [high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), oxidized low-density lipoprotein (OxLDL), low-density lipoprotein autoantibodies (anti-OxLDL), interleukin-6 (IL-6), lipid profile and glucose]. Results: The MS group showed higher levels of IMA (0.618 ± 0.1355), hs-CRP (1.721 ± 0.964), OxLDL (0.662 ± 0.461), anti-OxLDL (27.822 ± 17.010) and IL-6 (53.20 ± 14.52) than did control subjects (IMA = 0.338 ± 0.0486 ; hs-CRP = 0.172 ± 0.0716 ; OxLDL = 0.193 ± 0.261 ; anti-OxLDL = 3.359 ± 2.277 and IL-6 = 17.06 ± 3.17 ($p < 0.01$). Significant correlations were also observed between IMA and total cholesterol ($r = 0.561$, $P < 0.0001$), LDL-cholesterol ($r^2 = 0.418$, $P = 0.0001$), triglycerides ($r^2 = 0.674$, $P = 0.0001$), glucose ($r^2 = 0.574$, $P = 0.0001$), hs-CRP ($r^2 = 0.649$, $P = 0.0001$), OxLDL ($r^2 = 0.585$, $P = 0.0001$), anti-OxLDL ($r^2 = 0.575$, $P = 0.0001$), IL-6 ($r^2 = 0.723$, $P = 0.0001$), systolic blood pressure ($r^2 = 0.522$, $P < 0.0001$). Conclusion: We found an association between IMA and MS. Additional studies including prospective genetic variation approaches need to be performed to help elucidate this association between IMA and MS and its potential clinical role.

KEY-WORDS: metabolic syndrome, IMA, inflammatory biomarker, OxLDL, OxLDL autoantibodies.

INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MS) describes a cluster of cardiometabolic risk factors that contribute to the accelerated development of atherosclerosis, coronary artery disease and type 2 diabetes (1). Chronic hypertension and diabetes produce both macrovascular and microvascular pathophysiological changes, and therefore, a better understanding of the consequences of MS and diabetes in vascular physiology is of great importance (2). Indeed, diabetes markedly affects microcirculation as well as flow in large conduit arteries supplying vital organs such as the heart, brain and kidney (3).

A growing number of studies suggest that ischemia-modified albumin (IMA) is a biomarker of cardiovascular diseases because the N-terminus of this protein is damaged under conditions of ischemia and unable to bind metals. Previous studies have suggested that ischemia-modified albumin (IMA) is associated with acute ischemia (4,5), and its ability to discriminate myocardial infarction appears to be greater than that of C-reactive protein (CRP) (6). Investigations have demonstrated that serum IMA concentrations increase acutely after percutaneous coronary intervention in patients with spontaneous ischemia (7,8) and in patients with skeletal muscle ischemia. Additionally, it should be interpreted with caution in patients with peripheral vascular disease (9,10). Recent studies have associated increased levels of IMA with mortality in patients with end-stage renal disease (ESRD) (11), as a significant parameter in the early diagnosis of acute mesenteric ischemia (12), and a powerful indicator of short-term mortality in ST-segment elevation myocardial infarction (13). Other prospective investigations found that the combination of heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP) and IMA measurements after initiation of chest pain may be highly effective for risk stratification in patients with acute coronary syndromes and normal cardiac troponin T levels (14). However, emerging investigations suggest that IMA is not only a marker of cardiac ischemia, as shown by Piwowar and collaborators (15) who studied the association between IMA levels and type 2 diabetes, and by our group in a study of the association between this biomarker and

hypercholesterolemia (16). In both cases, diabetic and hypercholesterolemic patients, IMA levels were higher than in healthy subjects. These studies suggested that the albumin molecule in the plasma of diabetic patients is modified in the chronic hypoxia conditions provoked mainly by hyperglycemia and oxidative stress in diabetes.

As a large number of cardiovascular patients have some cardiometabolic risk that pertains to MS diagnosis, we postulated here that IMA levels could be associated with these cardiometabolic risks and that elevated levels are a possible indication of microvascular dysfunction in MS patients. To confirm this possible association, we performed additional biochemical analyses of lipids and inflammatory markers previously found to be associated with MS.

METHODS

Study population

A case-control study was performed in Rio Grande do Sul, Brazil. Subjects were enrolled prospectively in this study from the Cardiology Service, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) and biochemical analysis laboratory (LABIMED Ltda). Subjects were enrolled in two groups, according to the presence of MS risk factors: 32 healthy individuals in the control group, and 74 individuals in the MS group. Mean age for control was 55.2 ± 8.8 years, and for MS group 57.6 ± 8.3 years ($p=0.142$). The sample included 34 men and 72 women. All patients were in a stable clinical status without signs of acute infections and acute ischemia. The control group consisted of healthy subjects with neither inflammatory states nor abnormalities in lipid and carbohydrate metabolism, as evidenced in routine medical check-ups. We excluded subjects with hypoalbuminemia (<34 g/L) and anemia, since previous studies suggested their

interference in IMA analysis (18, 19). The Ethics Committee of PUCRS approved the study protocol (Protocol No. 07/044069). Informed consent was obtained from all individuals whose data were collected prospectively.

The diagnostic criteria for MS was made using the Third Report of the U.S. National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (NCEP ATP III) following three or more criteria (20): abdominal obesity analyzed by waist circumference (men >102 cm; women >88 cm), triglycerides (TG) (≥ 150 mg/dL), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (men <40 mg/dL; women <50 mg/dL), blood pressure $\geq 130/85$ mmHg; and fasting glucose (≥ 110 mg/dL). We also analyzed subjects with severe hypertension (systolic blood pressure [SBP] ≥ 160 mmHg and/or diastolic blood pressure [DBP] ≥ 100 mmHg and coronary disease, i.e., individuals with a previous diagnosis of acute myocardial infarct (AMI), angina, intermittent claudication or stroke; and dyslipidemia, subjects with elevated total cholesterol, LDL-c or TG, as well as those who used cholesterol-lowering drugs. Details of these evaluations were given in a previous study by our group (21).

Biochemical determinations

Blood samples were collected after a 12-h overnight, fasting by venous puncture into gray and red top Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus potassium oxalate or no anticoagulant, respectively. Specimens were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2,500 g, and aliquots of serum samples were stored at -20°C for a maximum of 4 weeks before IMA measurement. This procedure was performed since samples frozen at -20°C are stable, although IMA values have been reported to be slightly higher in stored versus fresh samples (22). Plasma glucose, serum total cholesterol and serum triglyceride concentrations were measured by standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics[®] reagents in a fully automated analyzer

(Vitros 950[®] dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA). High-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol) was measured in plasma supernatant after precipitation of apolipoprotein B-containing lipoproteins with dextran sulfate and magnesium chloride as previously described (23). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol) was estimated using the Friedewald equation (24). hs-CRP was measured by nephelometry (Dade Behring, Newark, DE, USA). Interleukin-6 (IL-6) was measured by capture ELISA, according to the manufacturer's instructions (Biomyx Technology, San Diego, CA, USA). OxLDL was also determined by capture ELISA according to the manufacturer's instructions (Merckodia AB, Uppsala, Sweden), as described by Holvoet et al. (25). OxLDL autoantibodies (anti-OxLDL) were determined using ELISA as described by Wu and Lefvert (26). Serum IMA was measured in non-diluted samples by a colorimetric assay previously described by Bar-Or et al. (27) on a Cobas Mira[®] Plus Instrument, according to the method described by Fagan et al. (28) and validation described by Gidenne et al. (29). This method consisted of adding 50 μ L of 0.1% cobalt chloride (Sigma, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in H_2O to 200 μ L of serum, gently mixing, and waiting 10 min for adequate albumin-cobalt binding (ACB). Fifty microliters of dithiothreitol (DTT) (Sigma, 1.5 mg/ml H_2O) were added for color development, and the reaction was quenched 2 min later by adding 1.0 mL of 0.9% NaCl. All incubations were performed at 37°C. Absorbance was read in a spectrophotometer at 470 nm (Hitachi U-2800A[®], Hitachi High-Technologies Corporation, Japan), using a serum-cobalt blank without DTT, and the results reported in absorbance units (ABSU). The colorimetric assay format quantitatively measures unbound cobalt remaining after albumin-cobalt binding has occurred. Thus, with reduced albumin-cobalt binding, there is more unbound cobalt, resulting in an elevated absorbance. IMA assay was standardized in the Department of Pharmaceutical Science and a standard curve was prepared in the range of 6.0-60.0 g CoCl_2 /ml. One IMA unit was defined as "g of free" Co (II) in the reaction mixture per ml of serum sample. The assay was linear within this range. Inter-assay coefficient of variance (CV) to test the reproducibility was calculated by repeating a patient sample (IMA 15.6 Units), six assays in duplicate, and was found to be < 15%, which was slightly on the high side but within acceptable levels. These

conditions were similar to those described previously by Chawla et al., (30). Strict attention to sample handling procedures was given in experimental procedures to maintain consistency of the analysis (29).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS/PC statistical package, version 12.0 (SPSS, Inc., IL). Data were analyzed statistically by Student's t test to determine the differences between case-control groups. Spearman's correlation was assessed to evaluate the correlations between IMA and lipid (total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, tryglicerides, OxLDL, anti-OxLDL), glycemia, inflammatory (hs-CRP, IL-6), BMI and blood pressure (SBP and DBP) variables to confirm the possible association of this biomarker with biochemical, anthropometric and physiological variables used in MS diagnosis. Multivariate analysis was performed to analyze the possible effects of gender, age and presence of type 2 diabetes mellitus on IMA levels, using a multiple logistic regression method (Backward Wald). We considered type 2 diabetes and hypercholesterolemia (ranging from 250 to 529 mg/dL) as possible intervening variables, since a positive association between IMA levels and these chronic diseases has been previously described (16). Statistical analyses were performed where all p-values were two-tailed, and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Baseline characteristics of case-control study subjects are shown in Table 1. As expected, the MS group had significantly higher levels of BMI, SBP, DBP, total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides. The only variable that did not show significant differences between the case-control groups was HDL-cholesterol. IMA, hs-CRP, OxLDL, anti-OxLDL and IL-6 levels were significantly higher in MS than control subjects, as seen in Table 2.

Table 1 here

Table 2 here

We observed a significant correlation between IMA and total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, glucose, hs-CRP, OxLDL, anti-OxLDL, and IL-6 and SBP. We did not find a significant correlation between HDL- cholesterol and DBP and IMA levels (Table 3).

Table 3 here

In our controls subjects, we did not include the obese ($> 30 \text{ kg/m}^2$). However, in the MS group: 8 (10.8%) had a BMI $< 25 \text{ kg/m}^2$; 25 (33.8%) were overweight ($>25 \text{ kg/m}^2 < 30 \text{ kg/m}^2$) and 41 (55.4%) were obese ($> 30 \text{ kg/m}^2$). When we compared the IMA levels just in the control group, considering BMI, we did not find statistical differences ($< 25 \text{ kg/m}^2 = 0.335 \pm 0.049$ and overweight = 0.355 ± 0.045 , $p=0.398$). Similarly, when we compared the IMA levels just in the case group, considering BMI, we did not find statistical differences ($<25 \text{ kg/m}^2 = 0.625 \pm 0.120$ and overweight = 0.572 ± 0.203 , obese = 0.645 ± 0.0598 , $p=0.477$). Additionally, the Pearson correlation between IMA and BMI in the MS case group as well as in control group was not significant ($r^2=0.013$, $p=0.944$ and $r^2=-0.31$, $p=0.865$, respectively).

Multivariate regression showed that the association between higher IMA levels and metabolic syndrome was independent of the variables sex, age, obesity, type 2 diabetes and hypercholesterolemia ($p=0.0405$).

A multivariate analysis to see if the significance of increased IMA levels would be maintained after correcting for BMI was performed. Statistical significance was maintained after this correction (IMA Wald=12.394, $p=0.001$; BMI Wald=3.866, $p=0.049$). Additionally, we performed a statistical analysis considering BMI stratification in each group (control and MS) separately. In the control group, 5 subjects were overweight ($> 25 \text{ kg/m}^2 < 30 \text{ kg/m}^2$) and 27 had BMI values $< 25 \text{ kg/m}^2$. Statistical analysis showed similar IMA values in these groups ($<25\text{kg/m}^2=0.335\pm 0.049$, overweight= 0.355 ± 0.454 , $p=0.398$). As the number of overweight subjects was very low, a Pearson correlation analysis between IMA and BMI values was performed in the control group. We did not observe a significant correlation ($r^2=0.013$, $p=0.944$). Therefore, in our sample, the IMA levels showed an association with MS independent of BMI.

DISCUSSION

We describe here an association between IMA levels and metabolic syndrome in subjects without acute ischemia. Several clinical studies have evaluated the performance of the ACB assay in cardiac patients, mostly examining the role of IMA in assessing ischemia, especially acute coronary disease (4-6). Our team also found higher IMA values in myocardial infarction patients in comparison to control subjects (6).

The biological explanation of this association is related to a decrease in tissue oxygen perfusion, triggering albumin modification. Here, we analyzed the possible association of IMA levels and MS that did not present an acute biological condition, as myocardial infarction, but a micro-

environment that could increase tissue hypoxia. The correlations found between IMA and other biomarkers found here suggest that higher IMA levels could be a consequence of altered homeostasis present in MS, mainly related to inflammatory and oxidative stress processes. Additionally, the higher IMA levels in MS could indicate at least an important sub-clinical condition of a peripheral oxygenation insufficiency, for example.

The role of micro-environment alteration in the increase of IMA values was corroborated in recent studies, for example, Serne et al. (31) who suggested that microvascular dysfunction which play a role in regulating coronary blood flow, is a potential pathophysiological mechanism of MS. In this case, microvascular dysfunction would be the underlying mechanism for the associations between hypertension, obesity and impaired insulin-mediated glucose availability. This hypothesis was corroborated by Pirat et al. (16) that found an impaired coronary flow reserve (CFR) associated to MS. Therefore, the presence of vascular dysfunction associated with MS could be an explanation for the increased levels of IMA and other inflammatory markers observed in this study. Additionally, Piwowar et al. (16) found that diabetic patients had a higher level of IMA than did control subjects, independent of other metabolic risk factors. In a previous investigation, we also found an association between higher IMA levels and hypercholesterolemia, comparing control subjects with cholesterol levels ranging from 104 to 178 mg/dL and a hypercholesterolemia group with cholesterol levels ranging from 250 to 529 mg/dL.

In the present study, we found an association between MS and higher IMA levels, independent of type 2 diabetes and hypercholesterolemia. Based on these associations and on the results obtained here, which showed an association between higher levels of IMA and MS, we can postulate that the dysfunction that may lead to microvascular dysfunction could trigger an increase in levels of this protein. Taking into account these results found in diabetes, hypercholesterolemia and MS, increased levels of IMA are not necessarily of cardiac origin and could have various origins.

The precise mechanism of IMA generation and the nature of IMA itself are not clear. Investigations suggest that structural modifications of albumin can occur as a result of endothelial and extracellular hypoxia, acidosis, reduced oxygen tension, various ion-pump disruptions and generation of reactive oxygen species (ROS) (32). A previous experimental study suggested that ROS, mainly hydroxyl radicals, may modify human serum albumin chemically, resulting in IMA formation (34).

MS patients have elevated oxidative damage (37). Additionally, epidemiological investigations, such as the *Framingham Study*, have also reported that BMI and diabetes are closely associated with systemic oxidative stress, (38) and that ROS may be the mechanistic link between MS and diet patterns associated with hypertension (high salt intake) and obesity (high fat intake).

Our study supports the notion of an association between MS and oxidative stress, since we observed higher levels of lipid molecules generated and associated with oxidative stress, such as OxLDL and anti-OxLDL, as well as molecules inflammatory response, such as hs-CRP and IL-6. Here, we also observed a significant positive correlation between all these molecules and IMA levels. Oxidative stress may be a determinant of hs-CRP levels and promote pro-atherosclerotic inflammatory processes at the earliest stages of coronary heart disease development, and it has been previously associated with MS and type 2 diabetes (16). A meta-analysis of prospective studies has demonstrated an increased risk of coronary heart disease (CHD) with increased levels of hs-CRP and elevated pro-inflammatory cytokines, including IL-6 (39). These results suggest that MS heightens oxidative stress and inflammatory burden in obese adults and corroborate the results described here.

A question that we explored is if higher IMA levels could be related to BMI values. Unfortunately, our control sample did not include obese subjects, since we looked for an association between MS and IMA levels. For this reason, we performed additional statistical analysis, considering BMI stratification, and our results suggested that IMA and BMI values are not independent related to MS. However, we cannot rule out a possible association between obesity and IMA levels in subjects

without other MS diagnostic parameters. Therefore, this question needs to be further studied in complementary investigations.

It is important to ponder some considerations associated with our methodological design. We conducted an exploratory case-control study with a relatively small number of subjects. However, a primary limitation of the present study is its cross-sectional design and the inherent possibility that genetic and/or lifestyle factors may have influenced the results described here. Our research group, for example, has reported previous findings suggesting an association between overweight/obesity or MS and genetic polymorphism involving oxidative, lipid and vascular metabolism (22). In an effort to minimize confounding variables, we studied subjects of similar age and non-smokers, who were not currently taking medication that, could influence inflammatory and oxidative markers (i.e., statins). Additionally, all MS subjects included in this study had a similar level of routine physical activity (considered sedentary subjects) and were seen by a medical service associated with a cardiology service. Healthy control subjects were also evaluated and did not show any dysfunction or MS-related morbidity.

Other important considerations about our results that showed an association between IMA levels and MS are the possible intervening factors associated with modulations of IMA levels, including pharmacological exposure or drug therapy. A study of 37 patients with stable coronary artery disease undergoing non-invasive evaluation and submitted to a pharmacological stress test was performed. The authors found that plasma IMA levels change significantly during pharmacologic stress testing (40). However, investigations about the possible influence of drug therapy on IMA levels are still incipient. Other important intervening variables affecting IMA levels could be lipid levels, such as triglycerides. Investigations suggest that triglycerides have primarily a storage function with toxicity resulting mainly from long-chain nonesterified fatty acids (NEFA) and their products such as ceramides and diacylglycerols. As the MS criteria include higher triglycerides levels, this variable could potentially interfere with IMA levels. However, in a previous study performed by Gidenne et al.

(30), no significant interference with IMA levels was observed for triglyceride levels. Our previous study that analyzed the IMA values between normolipid and hypercholesterolemic subjects corroborated this data since we did not find a positive association between triglycerides and IMA levels.

In conclusion, our population-based data show that higher concentrations of IMA are associated with MS and other biomarkers that increase cardiovascular risk. Since metabolic risk factors are highly prevalent in patients with acute coronary diseases, to clarify if the higher IMA levels found in these subjects could be influenced by the presence of pre-existing metabolic risk factors such as MS, it is of fundamental importance to perform studies with a large sample.

Acknowledgments: The authors thank the team of the Cardiology Service of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul and the LABIMED Ltda., located in Santa Maria-RS, Brazil. Dr. A. Leyva provided English editing of the manuscript.

Sources of funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–**CNPq** (No. 471233/2007-2, No. 311231/2006-3, No. UFSM 3081.009087/2008-99), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–**CAPES** (166/08), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul – **FAPERGS** (grants and fellowships).

Disclosures: The present study does not have real or apparent conflicts of interest.

REFERENCES

1. **Hajer GR, van Haften TW, Visseren FL** 2008 Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29(24):2959-2971.
2. **Luscher TF and Steffel J** 2008 Sweet and Sour: unraveling diabetic vascular disease. *Circ Res* 102:9-11.
3. **Luscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F** 2003 Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation* 108:1655-1661.
4. **Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR, Collinson PO, Kaski JC** 2003 Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation* 107:2403–2405.
5. **Pollack CV, Peacock W and Summers R** 2003 Ischemia-modified albumin is useful in risk stratification of emergency department chest pain patients. *Acad Emerg Med* 10:555–556.
6. **Mastella AK, Moresco RN, Bisognin da Silva D, Becker AM, Duarte MM, Giovelli LL, da Silva HS, Rossato L, Moretto MB, Paz da Silva JE** 2009 Evaluation of ischemia-modified albumin in myocardial infarction and prostatic diseases. *Biomed Pharmacother* Jan 20. [Epub ahead of print]

-
7. **Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, Yang J, Ortega-Lopez AM, Shinoda H, Honda SA, Rios CN, Sugiyama CE, Ha CE** 2003 Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clin Chem* 49:581–585.
 8. **Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, Antman EM** 2003 The search for a biomarker of cardiac ischemia. *Clin Chem* 49: 537–539.
 9. **Roy D, Quiles J, Aldama G, Sinha M, Avanzas P, Arroyo-Espliguero R, Gaze D, Collinson P, Carlos Kaski J** 2004 Ischemia modified albumin for the assessment of patients presenting to the emergency department with acute chest pain but normal or non-diagnostic 12-lead electrocardiograms and negative cardiac troponin T. *Int J Cardiol* 97:297–301.
 10. **Roy D, Quiles J, Sharma R, Sinha M, Avanzas P, Gaze D, Kaski JC** 2004 Ischemia modified albumin concentrations in patients with peripheral vascular disease and exercise induced skeletal muscle ischaemia. *Clin Chem* 50: 1656–1660.
 11. **Sarma R, Gaze DC, Pellerin D, Mehta RL, Gregson H, Streather CP, Collinson PO, Brecker SJ** 2006 Ischemia-modified albumin predicts mortality in ESRD. *Am J Kidney Dis* 47(3):493-502.
 12. **Gunduz A, Turkmen S, Turedi S, Mentese A, Yulug E, Ulusoy H, Ulusoy H, Karahan SC, Topbas M** 2009 Time-dependent variations in ischemia-modified albumin levels in mesenteric ischemia. *Acad Emerg Med* Apr 21. [Epub ahead of print].
 13. **Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Jimenez-Sosa A, Samimi-Fard S, Idaira HB** 2009 Does ischemia-modified albumin add prognostic value to the thrombolysis in myocardial

Infarction risk score in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty? *Biomarkers* 14(1):43-48.

14. **Liyan C, Jie Z, Xiaozhou H** 2009 Prognostic value of combination of heart-type fatty acid-binding protein and ischemia-modified albumin in patients with acute coronary syndromes and normal troponin T values. *J Clin Lab Anal* 23(1):14-18.

15. **Gunduz A, Turedi S, Mentese A, Altunayoglu V, Turan I, Karahan SC, Topbas M, Aydin M, Eraydin I, Akcan B** 2008 Ischemia-modified albumin levels in cerebrovascular accidents. *Am J Emerg Med* 26(8):874-878.

16. **Piwowar A, Knapik-Kordecka M, Warwas M** 2008 Ischemia-modified albumin level in type 2 diabetes mellitus - Preliminary report. *Dis Markers* 24(6):311-317.

17. **Duarte MM, Rocha JB, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IB, Loro VL, Schetinger MR** 2009 Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 42(7-8):666-671.

18. **Pirat B, Bozbas H, Simsek V, Yildirim A, Sade LE, Gursoy Y, Altin C, Atar I, Muderrisoglu H** 2008 Impaired coronary flow reserve in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* Feb 21. [Epub ahead of print]

-
19. **Gaze DC, Crompton L, Collinson P** 2006 Ischemia-modified albumin concentrations should be interpreted with caution in patients with low serum albumin concentrations. *Med Princ Pract* 15(4):322-324.
20. **Cichota LC, Moresco RN, Duarte MM, da Silva JE** 2008 Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal* 22(1):1-5.
21. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP): Expert panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATPIII). *JAMA* 2001;285:2486–2497.
22. **Valle Gottlieb MG, Bodanese LC, Araújo Leite LE, Augustin Schwanke CH, Escobar Piccoli JD, Marques da Rocha MI, IBM Cruz** 2009 Association between the Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor and metabolic syndrome in free-living community elderly. *Metab Syndr Relat Disord* Apr 3. [Epub ahead of print]
23. **Beetham R, Monk C, Keating L, Bengner JR, Kendall J** 2006 Effects of storage at -20°C on ischaemia-modified albumin results. *Ann Clin Biochem* 43:500–502.
24. **Bachorik PS, Albers JJ** 1986 Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol* 129:78-100.

-
25. **Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS** 1972 Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502.
26. **Holvoet P, Stassen JM, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J** 1998 Oxidized low density lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:100-107.
27. **Wu R, Lefvert AK** 1995 Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein (OxLDL): characterization of antibody isotype, subclass, affinity and effect on the macrophage uptake of oxLDL. *Clin Exp Immunol* 102:174-180.
28. **Bar-Or D, Lau E, Winkler JV** 2000 A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia—a preliminary report. *J Emerg Med.* 19:311-315.
29. **Fagan GJ, Wayment H, Morris DL, Crosby PA** 2002 The albumin cobalt binding test: analytical performance of a new automated chemistry assay for the detection of ischemia modified albumin (IMA). *JCLA* 25(2):178-187.
30. **Gidenne S, Ceppa F, Fontan E, Perrier F, Burnat P** 2004 Analytical performance of the Albumin Cobalt Binding (ACB) test on the Cobas MIRA Plus analyzer. *Clin Chem Lab Med* 42(4):455-461.

-
31. **Chawla R, Navendu G, Rajneesh C, Shweta G** 2006 Ischemia modified albumin: A novel marker for acute coronary syndrome. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 21(1):77-82.
32. **Serne EH, de Jongh RT, Eringa EC, Stehouwer CD** 2007 Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension* 50:204-211.
33. **Apple FS and Quist HE** 2002 Release characteristics of cardiac biomarkers and ischemia-modified albumin as measured by the albumin cobalt-binding test after a marathon race. *Clin Chem* 48:1097-1100.
34. **Christenson RH and Duh SH** 2001 Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin Chem* 47:464-470.
35. **Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF** 2006 Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart* 92:113-114.
36. **Roberts CK, Sindhu KK** 2009 Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 22 (21-22):705-712.
37. **Armutcu F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A** 2008 Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 46(6):785-790.

-
38. **Keaney F Jr, Larson MG, Vasani RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ** 2003 Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *ArteriosclerThromb Vasc Biol* 23:434-439.
39. **Danesh J, Wheeler JG, Hirschfeld GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A** 2004 C-Reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350:1387-1397.
40. **Sbarouni E, Georgiadou P, Panagiotakos D, Kyzopoulos S, Tsiapras D, Voudris V, Kremastinos DT** 2008 Ischemia modified albumin in relation to pharmacologic stress testing in coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 396 (1-2):58-61.

Table 1 Baseline characteristics of study participants.

Variable	Groups		P
	Control Mean±SD	MS Mean±SD	
N	32	74	
Gender	Males	11 (34.4)	0.595
	Females	21 (65.6)	
BMI (kg/m ²)	22.1±4.6	32.6±6.1	0.0001
Waist circumference (cm)	78.8±7.9	107.2±12.3	0.0001
SBP (mmHg)	117.5±8.0	147.8±26.8	0.001
DBP (mmHg)	74.6±18.5	85.9±15.9	0.01
Glucose (mg/dL)	81.7±7	133.7±68.7	0.001
Total cholesterol (mg/dL)	148.5±17.8	200.4±58.1	0.001
HDL-cholesterol (mg/dL)	50.5±9.3	48.2±12.9	0.371
LDL-cholesterol (mg/dL)	78.2±11.5	114.4±49.5	0.001
Triglycerides (mg/dL)	99.4±43.5	214.9±34.8	0.001

SBP= systolic blood pressure; DBP= diastolic blood pressure; SD= standard deviation; the statistical comparison was performed by Student's t test.

Table 2 Ischemia-modified albumin and lipid and inflammatory biomarkers in MS and healthy controls.

Variable	Groups		<i>p</i>
	Control Mean±SD	MS Mean±SD	
IMA (ABSU)	0.338±0.0486	0.618±0.1355	0.0001
hs-CRP (mg/dL)	0.172±0.0716	1.721±0.964	0.0001
IL-6 (pg/mL)	17.06±3.17	53.20±14.52	0.0001
OxLDL (mg/dL)	0.193±0.261	0.662±0.461	0.0001
Anti-OxLDL (mg/L)	3.359±2.277	27.822±17.010	0.001

SD= standard deviation; the statistical comparison was performed by Student's t test.

Table 3 Correlation between Metabolic Syndrome ischemia-modified albumin and biochemical and anthropometric variables.

Independent variable	Correlation	
	r^2	p
Cholesterol total (mg/dL)	0.561	<0.0001
HDL-cholesterol (mg/dL)	-0.194	0.230
LDL-cholesterol (mg/dL)	0.418	0.001
Triglycerides (mg/dL)	0.674	0.0001
Glucose (mg/dL)	0.574	0.001
hs-CRP (mg/dL)	0.649	<0.0001
OxLDL (mg/dL)	0.585	0.0001
anti-OxLDL (mg/dL)	0.575	<0.0001
IL-6 (pg/mL)	0.723	<0.0001
SBP (mmHg)	0.522	<0.0001
DBP (mmHg)	0.177	0.168
Waist circumference	0.716	<0.0001

BMI= body mass index; SBP= systolic blood pressure; DBP=diastolic blood pressure.

Anexo 1 – Entrevista Estruturada

AMBULATÓRIO DE RISCO CARDIOMETABÓLICO		Nº _____
PROTOCOLO - AVALIAÇÃO INICIAL		
NOME: _____	IDADE: _____	DATA: _____
DN: ____/____/19__ SEXO: () M () F COR: () B () NB	PRONTUÁRIO: _____	
ENDEREÇO: _____		
FONE: _____ CONTATO (fone/nome) _____		
HDA/ MOTIVO DA CONSULTA: _____		

MEDICAÇÕES EM USO: (NOME E DOSE)		
() DIURÉTICO: _____		
() BETABLOQUEADOR: _____		
() IECA: _____		
() ACC: _____		
() ARA: _____		
() ALFA-AGONISTAS: _____		
() VASODILATADORES: _____		
() METIFORMINA: _____		
() GLITAZONAS: _____		
() ACARBOSE: _____		
() ORLISTAT: _____		
() ACOMPLIA (RIMONABANT): _____		
() OUTROS: _____		

REVISÃO SISTEMAS:		
() ASTENIA	() ALTERAÇÕES DO PESO	() CEFALÉIA () EDEMA
() ESCOTOMAS	() VERTIGENS	() EPISTAXE
() TOSSE	() PALPITAÇÕES	() DOR ANGINOSA
() DOR ATÍPICA	() PIROSE	() APNÉIA DO SONO
() NÁUSEAS/VÔMITOS	() DISFAGIA	() POLIFAGIA
() POLIDIPSIA	() MENOPAUSA	() URINA ESCURA
() POLIÚRIA	() OLIGÚRIA	() CORRIMENTO
() NOCTÚRIA	() PERDA LIBIDO	() DISPNEIA
() POLACIÚRIA	() SUDORESE EXCESSIVA	() PERDA VISUAL
() IMPOTÊNCIA	() ALT MENSTRUAIS	() ALTERAÇÕES TGI
() OUTROS: _____		
HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA / FATORES DE RISCO:		
() HAS: Tempo diagnóstico: _____ Tratamento: () regular () irregular		
() TABAGISMO ATUAL: N°cigarros/dia: _____ Tempo/anos: _____		
() TABAGISMO PRÉVIO: Tempo de uso: _____ Tempo abandono: _____		
() DAC: _____		
() ICC: _____		
() AVC: _____		
() Dç Vasc Perif: _____		
() IRC: _____		
() DISLIPIDEMIA: _____		
() HIPERURICEMIA/GOTA: _____		
() DPOC: _____		
() HEPATOPATIA: _____		
() DOENÇA DA TIREÓIDE (Qual): _____		
() DOENÇA DA OFTALMOLÓGICA (Qual): _____		
() INTOLERÂNCIA À GLICOSE: _____		
() NEOPLASIA (Qual): _____		
() OUTRAS: _____		

HISTÓRIA SOCIAL:

() ESCOLARIDADE (anos de estudo): _____
 () PROFISSÃO: _____
 () CONSUMO ÁLCOOL: (g/dia) _____
 () USO DROGAS: Tipo: _____
 () SEDENTARISMO () ATIVIDADE HABITUAL () ATIVIDADES REGULARES

HISTÓRIA FAMILIAR:

() HAS: _____
 () DAC: _____
 () AVC: _____
 () DM - I () DM - II: _____
 () DISLIPIDEMIA: _____
 () DOENÇA RENAL: _____
 () NEOPLASIA: _____
 () OUTRAS: _____

EXAME FÍSICO: GERAL:

PESO: _____ ALT: _____ IMC: _____ FC: _____
 CIRC. BRAQUIAL: _____ QUADRIL: _____ CINTURA: _____
 PA¹: ____/____ mmHg PA²: ____/____ mmHg
 SOPRO CAROTÍDEO: () AUSENTE () DIREITA () ESQUERDA
 TIREÓIDE: () NORMAL () BÓCIO () NÓDULO
 BULHAS: () BNF () B1HIPO () B2HIPO () B1HIPER () B2HIPER () B3 () B4
 RITMO: () REGULAR () IRREGULAR
 SOPRO: () SIST () DIAST LOCAL: _____ INTENSIDADE: ____/6+
 AP: _____
 ABD: _____
 SOPRO: () AORTA () RENAL D () RENAL E () FEMORAIS
 PULSOS PERIFÉRICOS: _____
 EDEMA MEMBROS: () SIM () NÃO () INTENSIDADE: ____/4+
 FUNDOSCOPIA (CLASSIFICAÇÃO DE KV - GRAUS)
 (1) ESTREITAMENTO ARTERIOLAR (2) CRUZAMENTO A-V PATOLÓGICO
 (3) HEMORRAGIA E/OU EXSUDATO RETINA (4) PAPIEDEMA
 DÉFICIT MOTOR: () SIM () NÃO LOCAL: _____
 OUTROS ACHADOS RELEVANTES: _____

IMPRESSÃO GERAL: CRITÉRIOS: N°

() HAS () ICHO () HDL () TRIGLICERÍDEOS () CIRC ABD
 () DM

ORIENTAÇÕES:

CONDUTA MEDICAMENTOSA:

EXAMES: () LABORATÓRIO () ECG () RX TÓRAX () ECOCARDIO
 () OUTROS: _____

PLANO:

AVALIAÇÃO LABORATORIAL:

DATA						
Ht						
Hb						
Na						
K						
Ca						
Mg						
Ur						
Cr						
GJ						
CT						
LDL						
HDL						
TGL						
Ac Ur						
TSH						
PCR-us						
CPK						
TGO						
TGP						
Leptina						
Interleucina-6						
TNF α						
Adiponectina						
Fibrinogênio						
Creatininúria/24h						
Micro-album/24h						
TTGO						
Insulinemia						
Homocistinúria						
HOMA-R						
HOMA - β						
Fator de coagulação						
Anti-HCV						
HBsAg						
EQU						

EXAMES ADICIONAIS:

(/ /): ECG

FV: ___ ()BRE ()BRD ()HBAE ()HBPE
 ()SAD ()SVD ()SAE ()SVE
 RITMO: ()SINUSAL ()FA ()FLA ()OUTRO: _____
 BAV: ()1°G ()2°G-TIPO1 ()2°G-TIPO2 ()3°G
 ZONA INATIVA: ()SIM ()NÃO LOCAL: _____
 ALT RV: ()INESP ()ISQUEMICAS LOCAL: _____
 COMENTÁRIOS: _____

(/ /):RX TÓRAX

()CARDIOMEGALIA ()DERRAME PLEURAL _____
 ()CONGESTÃO PULMONAR ()CALCIFICAÇÃO AO _____
 ()OUTROS ACHADOS: _____

(/ /): ECOCARDIOGRAMA TRANSTORÁCICO

AE: ___ VES: ___ VED: ___ S: ___ PP: ___ AO: ___ FE: ___ % FEnc: ___
 CINESIA: _____
 DISF SISTÓLICA: ()SIM ()NÃO TIPO: _____
 DISF DIASTÓLICA: ()SIM ()NÃO TIPO: _____
 INSUF MITRAL: ()LEVE ()MOD ()SEVERA ()NÃO
 EST MITRAL: ()LEVE ()MOD ()SEVERA ()NÃO
 INSUF AO: ()LEVE ()MOD ()SEVERA ()NÃO
 EST AO: ()LEVE ()MOD ()SEVERA ()NÃO
 TRICÚSPIDE: _____ PULMONAR: _____
 OUTROS ACHADOS: _____

(/ /):TESTE ERGOMÉTRICO _____

(/ /):CINTILOGRAFIA MIOCÁRDICA (SPECT) _____

(/ /):CATETERISMO CARDÍACO _____

(/ /):MAPA _____

(/ /):ECODOPPLER DAS ARTÉRIAS RENAIIS _____

(/ /):ECODOPPLER DAS CARÓTIDAS/VERTEBRAIS _____

(/ /):ECOCARDIOGRAMA TRANSESOFÁGICO _____

(/ /):ANGIOTOMOGRAFIA DAS ARTÉRIAS CORONÁRIAS _____

(/ /):RESSONÂNCIA CARDÍACA _____

(/ /):CINTILOGRAFIA RENAL COM CAPTOPRIL _____

(/ /):ECOGRAFIA ABDOMINAL TOTAL _____

(/ /):TC DE ABDOMEM (Avaliação de gordura visceral) _____

(/ /):OUTROS _____

EVOLUÇÃO – SEGUIMENTO Nº

DATA: _____ NOME: _____ IDADE: _____ REG: _____
 # _____ # _____ # _____
 # _____ # _____ # _____

MEDICAÇÕES EM USO: (NOME E DOSE)

() DIURÉTICO: _____
 () BETABLOQUEADOR: _____
 () IECA: _____
 () ACC: _____
 () ARA: _____
 () ALFA-AGONISTAS: _____
 () VASODILATADORES: _____
 () METFORMINA: _____
 () GLITAZONAS: _____
 () ACARBOSE: _____
 () ORLISTAT: _____
 () ACOMPLIA (RIMONABANT): _____
 () INSULINAS: _____
 () Ação lenta () Ação intermediária () Ação rápida
 () OUTROS: _____

HDA: _____

EVENTOS CLÍNICOS DESDE A ÚLTIMA CONSULTA:

() IAM () ANGINA () AVE () CRISE HAS () ICC-EAP () CONSULTA EMERGÊNCIA () DM
 () INTERNAÇÃO: _____
 () OUTROS: _____

TABAGISMO: () ATIVO () PAROU HÁ _____
 ATIVIDADE FÍSICA: () SEDENTARISMO () HABITUAL () REGULAR
 ADESAO DIETA: () TOTAL () PARCIAL () NÃO SEGUE

EXAME FÍSICO: GERAL:

PESO: _____ IMC: _____ FC: _____ QUADRIL: _____ CINTURA: _____
 CIRC. BRAQUIAL: _____ PA¹: _____/_____ mmHg PA²: _____/_____ mmHg
 SOPRO CAROTÍDEO: () AUSENTE () DIREITA () ESQUERDA
 TIREÓIDE: () NORMAL () BÓCIO () NÓDULO
 BULHAS: () BNF () B1HIPO () B2HIPO () B1HIPER () B2HIPER () B3 () B4
 RITMO: () REG () IRREG SOPRO: () SIST () DIAST LOCAL: _____ INTENSIDADE: _____/6+
 AR: _____
 AB: _____
 SOPRO: () AORTA () RENAL D () RENAL E () FEMORAL D () FEMORAL E
 PULSOS PERIFÉRICOS: _____
 EDEMA MEMBROS: () SIM () NÃO () INTENSIDADE: _____/4+
 DÉFICIT MOTOR: () SIM () NÃO LOCAL: _____
 OUTROS ACHADOS RELEVANTES: _____

IMPRESSÃO: _____

ORIENTAÇÕES/PLANO: _____

CONDUTA MEDICAMENTOSA: _____

EXAMES: () LABORATÓRIO () ECG () RX TÓRAX () ECOCARDIO
 () OUTROS: _____

Anexo 2 - o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO 2. PROTOCOLO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO A SER ASSINADO PELOS VOLUNTÁRIOS DA PESQUISA, APÓS APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde juntamente com o Serviço de Cardiologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul está desenvolvendo um projeto de pesquisa, sob o título de: Associação entre síndrome metabólica e biomarcadores lipídicos, oxidativos, inflamatórios e isquêmico.

A proposta desse projeto surgiu, devido ao aumento da incidência e prevalência de síndrome metabólica (SM). Em termos gerais, pacientes com SM, tem um risco muito elevado de desenvolverem diabetes tipo 2 e doença cardiovascular (DCV) e está associada com micro e macroangiopatia, que leva a aceleração da doença aterosclerótica de vasos de grande calibre, afetando artérias que suprem o coração, o cérebro e membros inferiores. Como resultado, pacientes com SM têm um risco muito elevado de doença coronariana (como o infarto agudo do miocárdio), doença vascular cerebral (acidente vascular encefálico) e doença arterial periférica (com a possibilidade de sofrer amputações especialmente de membros inferiores). Com base nisto, este estudo tem como objetivo, verificar se existe associação entre a SM, albumina modificada pela isquemia (IMA), OxLDL, anti-OxLDL e moléculas inflamatórias (interleucina-6 e Proteína C ultra sensível-PCR-us). Essa pesquisa pretende contribuir tanto para o melhor conhecimento da SM como também para prevenção e tratamento mais eficaz dessas doenças.

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa, por encontrar-se no grupo controle (sem SM), ou porque exames prévios diagnosticaram este tipo de doença (com SM).

Os participantes desta pesquisa serão submetidos a um questionário para obtenção de informações como identificação, estilo de vida, prática de atividade física, saúde, história de doenças, uso de medicação e dados sócio-econômicos e culturais. Além disto, será coletado sangue para a análise bioquímica, o que causará um leve desconforto temporário devido à picada da agulha, havendo possibilidade de formação de um pequeno hematoma na região da coleta. Todos os resultados obtidos serão confidenciais e ficarão sob a tutela e total responsabilidade dos pesquisadores deste projeto, podendo a qualquer momento serem consultados e/ou eliminados da pesquisa caso você desista da sua participação como voluntária. Você tem a liberdade de abandonar a pesquisa em qualquer fase desta, sem que isto leve a penalização alguma ou qualquer prejuízo posterior a você ou a sua família.

Esta pesquisa praticamente não determina risco adicional ou dano à sua saúde e sua participação é isenta de remuneração ou ônus.

Os pesquisadores envolvidos no Projeto garantem a você o direito a qualquer pergunta e/ou esclarecimentos mais específicos dos procedimentos realizados e/ou interpretação dos resultados obtidos nos exames.

Existem benefícios imediatos, já que os resultados desta avaliação servem como uma revisão médica gratuita, além de aquisição de informações e orientações sobre prevenção de doenças. Além disso, você participando desta pesquisa estará contribuindo na identificação de possíveis fatores que levam a maior predisposição a SM, possibilitando a melhoria do conhecimento e entendimento desta doença, permitindo a prevenção e atenuação deste problema na nossa população.

Após ter recebido todas as informações relacionadas ao estudo eu, _____portadora da CI _____ certifico que os responsáveis pelo projeto, Maria Gabriela Valle Gottlieb e o Dr. Luiz Carlos Bodanese responderam a todas as minhas perguntas sobre o estudo e minha condição, e eu, voluntariamente, aceito participar dele, pois reconheço que:

1º) Foi-me fornecida uma cópia das informações ao paciente, a qual eu li e compreendi por completo.

2º) Fui informada dos objetivos específicos e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento no qual estarei envolvida, dos riscos ou desconfortos previstos, tanto quanto os benefícios esperados.

3º) Está entendido que eu posso retirar-me do estudo a qualquer momento, e isto não afetará meus cuidados médicos ou de parentes meus no presente e no futuro.

4º) Entendi que ao participar do estudo responderei a um questionário adicional, serei examinada clínica e laboratorialmente. O desconforto que poderei sentir é o da picada da agulha e a formação de um pequeno hematoma.

5º) Todas as informações a meu respeito serão confidenciais.

6º) Fui informada que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

7º) Foi-me garantido que não terei gastos em participar do estudo.

8º) Foi-me dada à garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou qualquer dúvida acerca dos riscos e benefícios da pesquisa e o meu tratamento. Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, poderei chamar os pesquisadores integrantes da equipe de pesquisa pelo telefone (51) 3320 5120. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicada

pela minha participação, poderei chamar _____Maria Gabriela Valle Gottlieb___ no telefone (51) 81393018.

Concordo que os meus dados obtidos neste estudo sejam documentados. Declaro, ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome do Paciente:_____

Assinatura do Paciente/Representante Legal:_____

Data_____

Pesquisador(a)
Responsável:_____

Assinatura

Data_____

Este formulário foi lido para _____ em
__/__/__, Porto Alegre-RS, por _____,
enquanto eu estava presente.

Nome _____ da
Testemunha_____

Assinatura _____ da
Testemunha_____

Data:_____