

ANTONIO EDUARDO PEREIRA PESARO

**Estudo da atividade inflamatória e plaquetária em pacientes com
doença arterial coronária estável, submetidos a tratamento com
duas estratégias hipolipemiantes intensivas:
sinvastatina 80 mg e ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg**

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Vicente Serrano Jr.

Co-orientador: Dr. Juliano Lara Fernandes

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pesaro, Antonio Eduardo Pereira

Estudo da atividade inflamatória e plaquetária em pacientes com doença arterial coronária estável, submetidos a tratamento com duas estratégias hipolipemiantes intensivas : sinvastatina 80 mg e ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg / Antonio Eduardo Pereira Pesaro. -- São Paulo, 2010.

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

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: Carlos Vicente Serrano Junior.

Co-orientador: Juliano de Lara Fernandes

Descritores: 1.Colesterol 2.Sinvastatina 3.Doença da artéria coronariana

4.Agregação plaquetária 5.Inflamação

USP/FM/SBD-037/10

*Quem é hábil no que é benéfico, desejando alcançar
o estado de paz, age assim: capaz, correto, honrado,
com a linguagem nobre, gentil e sem arrogância...*

*... sem ser exigente por natureza, frugal no seu modo de vida,
os sentidos acalmados, sábio, moderado, sem cobiçar ganhos...*

*... todos os seres vivos que existem, fracos ou fortes, sem
exceção... que todos os seres tenham os corações plenos de*

bem-aventurança

Sidarta Gautama

Karaniya Metta Sutta

Dedicatória

À minha família e especialmente à minha mãe, Lucília, pelo amor incondicional e pelo apoio permanente nos bons momentos e naqueles mais difíceis.

À minha grande mestra, Tessa Hiper, que sempre iluminou as sombras do caminho.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Vicente Serrano Jr, orientador e amigo. Sempre sereno, tolerante e generoso. Confiou-me a oportunidade de ser pesquisador e também de participar como médico assistente.

Ao amigo e Co-orientador Juliano Lara Fernandes, pelo companheirismo, disponibilidade e incentivo ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. José Carlos Nicolau, Diretor da Unidade de Coronariopatias Agudas do InCor- HCFMUSP, pela oportunidade de pesquisar no departamento.

Aos Profs. Drs. Protásio Lemos da Luz e Luiz Antonio Machado César pela oportunidade de pesquisar nos ambulatórios dos departamentos de Coronária e Aterosclerose.

Ao Prof. Dr. Alexandre Biasi, amigo fiel e pesquisador incansável, por seus conselhos epidemiológicos e estatísticos.

À Prof. Célia Maria Strunz, por viabilizar a realização do projeto em sua fase laboratorial.

À equipe do Laboratório de Lípidos, Prof. Raul C. Maranhão, Profa. Carmen Vinagre e Srta. Fernanda Pozzi, sempre disponíveis e atenciosos, contribuíram com parte dos achados mais importantes desse projeto.

A toda equipe do laboratório de análises clínicas do InCor. Especialmente, às queridas Regina e Marilza, que contribuíram profundamente para o sucesso desse projeto.

A toda equipe de pesquisa e laboratório do Hospital Israelita Albert Einstein: Dra. Luciana Marti, Srta. Daiane Donna Guilhen e especialmente ao Prof. Alexandre Holthausen, colega de pesquisa e plantão, e grande amigo, pela ajuda na análise das células endoteliais progenitoras.

A toda equipe do Laboratório de Coagulação do HCFMUSP: Dra. Tânia R. F. da Rocha, Prof. Élbio D' Amico e especialmente ao querido amigo Dr. Herlon S. Martins da Disciplina de Emergências Clínicas do HCFMUSP, pela competência no processo de análise da agregação plaquetária.

Ao Prof. Dr. Heraldo P. Souza e à Dra. Denise Frediani Barbeiro do laboratório da Disciplina de Emergências Clínicas do HCFMUSP pelo auxílio fundamental na análise de marcadores inflamatórios.

Aos colegas e amigos da Unidade de Coronariopatias Agudas do InCor- HCFMUSP, e em especial ao Dr. Roberto Rocha Giraldez, pelas inúmeras conversas muito produtivas ao longo de todos esses anos.

Às queridas Maria Auxiliadora Ferraz e Alexandrada da Unidade de Coronariopatias Agudas do InCor, sempre inteligentes, sempre presentes e disponíveis.

Às queridas Claudia Cizotto e Helenice Teixeira, secretárias da Unidade de Coronariopatias Agudas do InCor pela eficiência, bom humor e paciência para resolver tantos problemas que surgiram ao longo desses anos.

À Neusa Dini, Eva de Oliveira e Juliana Lattari Sobrinho da Comissão de Pós Graduação do InCor, pela disposição, simpatia e competência na ajuda aos alunos.

Aos alunos de iniciação científica, Rodrigo Sunahara e Paulo Parra, pela fundamental contribuição nesse projeto.

Ao grande amigo e colega de profissão, Marcelo Katz, por sempre me lembrar quando, como e onde.

Aos pacientes que espontânea e gentilmente participaram desta Tese, meus sinceros agradecimentos e profundo respeito.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento desse estudo.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Redução de risco cardiovascular com o tratamento hipolipemiante.....	1
1.2. Novas metas de LDL-C em pacientes com doença arterial coronária: tratamento agressivo	2
1.3. Estratégias terapêuticas para redução agressiva de LDL-C.....	3
1.4. Exemplos de pleiotropismo: efeitos anti-inflamatórios e antiagregante plaquetário das estatinas.....	7
1.4.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória das estatinas.....	10
1.4.2. Relevância da proteína-C reativa (PCR) na aterosclerose.....	10
1.4.3. PCR: aspectos epidemiológicos.....	11
1.4.4. Efeito das estatinas sobre a PCR e redução de risco cardiovascular.....	12
1.4.5. Efeito das estatinas sobre novos marcadores inflamatórios.....	13
1.4.6. Efeito das estatinas sobre as células endoteliais progenitoras (CEPs).....	19
1.4.7. Efeitos das estatinas sobre agregação plaquetária.....	20
1.5. Comparação dos efeitos pleiotrópicos do tratamento com estatina	21

isolada e da associação de estatina/ezetimiba: evidências conflitantes.....	
1.5.1. Efeitos sobre a PCR.....	22
1.5.2. Efeitos sobre outros marcadores inflamatórios.....	22
1.5.3. Efeito sobre as CEPs.....	23
1.5.4. Efeitos sobre agregação plaquetária.....	23
1.6. Racional do estudo.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo do estudo.....	26
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	28
3.1 População do estudo.....	28
3.2 Randomização	31
3.3 Desenho do estudo.....	31
3.4. Análises laboratoriais.....	32
3.4.1. Exames gerais.....	32
3.4.2. Marcadores inflamatórios: PCR, IL-6, IL-1, IL-10, MCP-1, sICAM-1, sCD-40L, LDLox.....	33
3.4.3. Agregação plaquetária: PFA-100.....	38
3.4.4. Células Endoteliais Progenitoras.....	38
3.5. Análise estatística.....	42
3.5.1. Variáveis específicas.....	42
3.5.2. Desfechos.....	43
3.5.3. Métodos estatísticos.....	44
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Aspectos gerais.....	45
4.2 Perfil lipídico.....	50

4.3	Marcadores inflamatórios e CEPs.....	52
4.4	Agregação plaquetária.....	57
5.	DISCUSSÃO.....	61
5.1.	Aspectos gerais.....	62
5.2.	Efeitos anti-inflamatórios da S80 e de E10/S20.....	64
5.3.	Efeitos antiplaquetários de S80 e E10/S20.....	66
5.3.1.	Interação entre o colesterol e a atividade plaquetária.....	66
5.3.2.	Efeitos pleiotrópicos das estatinas sobre plaquetas.....	67
5.3.3.	Evidências clínicas do efeito antiplaquetário das estatinas.....	68
5.3.4.	Avaliação da agregação plaquetária pelo PFA-100.....	69
5.3.5.	Ação antiplaquetária da associação E10/S20.....	70
5.4.	Células endoteliais progenitoras.....	72
5.5.	Implicações Clínicas.....	73
5.6.	Limitações.....	74
6.	CONCLUSÕES.....	76
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetil salicílico
ACC	American College of Cardiology
AHA	American Heart Association
Apo	Apolipoproteína
AT-1	Angiotensina -1
AVC	Acidente vascular cerebral
CD-40L	Glicoproteína CD-40 Ligante
CEC	Célula endotelial circulante
CEPs	Células endoteliais progenitoras
CPH	Célula progenitora hematopoética
CPK	Creatinofosfoquinase
DAC	Doença arterial coronária
DP	Desvio padrão
E10/S20	Ezetimiba 10 mg/ sinvastatina 20 mg
EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
FSC	Foward scatter
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade-colesterol
HMG-CoA	β -hidroximetilglutaril coenzima A
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
iECA	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IIQ	Intervalo inter-quartil
IL	Interleucina
IM	Infarto do miocárdio
IMC	Índice de massa corporal
InCor	Instituto do Coração
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade-colesterol
LDLox	Lipoproteína oxidada de baixa densidade
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1

PCR	Proteína C-reativa
PFA	Platelet function analyzer;
pg/mL	Picograma por mililitro
RM	Revascularização cirúrgica do miocárdio
S80	Sinvastatina 80 mg
SCA	Síndrome coronária aguda
sCD-40L	Glicoproteína CD-40 ligante solúvel
sICAM-1	Molécula de adesão intercelular -1 solúvel
SSC	Side scatter
Tg	Triglicérides
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
Th1	T helper 1
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade-colesterol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Painel contendo a combinação de anticorpos utilizada na citometria de fluxo.....	40
Tabela 2. Características basais da população estudada.....	46
Tabela 3. Perfil metabólico e bioquímico da população estudada.....	47
Tabela 4. Comparação dos exames gerais entre o início e após seis semanas de tratamento em pacientes que terminaram o estudo.....	48
Tabela 5. Comparação do perfil lipídico entre o início e após seis semanas de tratamento nos pacientes que terminaram o estudo.....	51
Tabela 6. Comparação dos marcadores de atividade inflamatória, PFA-100 e CEPs, entre o início e após seis semanas de tratamento em pacientes que terminaram o estudo.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismo de ação das estatinas.....	4
Figura 2.	Mecanismo de ação do ezetimiba.....	5
Figura 3.	Ação das estatinas no bloqueio da síntese de colesterol e na produção de isoprenóides.....	8
Figura 4.	Randomização da população do estudo.....	30
Figura 5.	Análise por citometria de fluxo.....	42
Figura 6.	Alteração percentual do perfil lipídico.....	50
Figura 7.	Alteração percentual dos marcadores inflamatórios.....	55
Figura 8.	Correlação entre as reduções de proteína C-reativa (PCR) e LDL colesterol, antes e após tratamento com sinvastatina 80 mg (S80) e ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg (E10/S20).....	57
Figura 9.	Correlação entre as reduções de LDL oxidado e LDL colesterol, antes e após tratamento com sinvastatina 80 mg e ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg	57
Figura 10.	Alteração percentual do PFA-100.....	58
Figura 11.	Correlação entre as alterações do tempo de oclusão do PFA-100 (segundos) e do LDL colesterol.....	59
Figura 12.	Correlação entre as alterações do tempo de oclusão do PFA-100 (segundos) e dos triglicérides.....	60

Resumo

Pesaro AEP. Estudo da Atividade Inflamatória e Plaquetária em Pacientes com Doença Arterial Coronária Estável, Submetidos a Tratamento com Duas Estratégias Hipolipemiantes Intensivas: Sinvastatina 80 mg e Ezetimiba 10 mg/Sinvastatina 20 mg. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 104p.

Introdução. Em pacientes com doença arterial coronária (DAC) estável, não está claro se os efeitos da redução do colesterol sobre a inflamação, agregação plaquetária e células endoteliais progenitoras (CEPs) diferem entre duas estratégias hipolipemiantes: ezetimiba associada à sinvastatina em dose moderada e sinvastatina isolada em dose elevada. **Objetivo.** Avaliar os efeitos de sinvastatina em dose elevada comparada a ezetimiba associado à sinvastatina em dose moderada sobre a inflamação, agregação plaquetária e CEPs. **Métodos e Resultados.** Pacientes com DAC estável (n=83, 63 ± 9 anos, 48 homens), em uso de sinvastatina 20 mg, foram randomizados para tratamento com sinvastatina 80 mg (S80) ou ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg (E10/S20), por seis semanas. O perfil metabólico e lipídico, a proteína C-reativa (PCR), molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM)-1, proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, interleucinas (IL) -1, -6 e -10, glicoproteína CD-40 ligante solúvel (sCD-40L), LDL oxidado (LDLox), células endoteliais progenitoras (CEPs) e a agregação plaquetária pelo “platelet function analyzer” (PFA)-100 foram avaliados antes e após o tratamento. Os níveis basais de lipídios, marcadores inflamatórios, CEPs e PFA-100 foram similares em ambos os grupos. Após o tratamento com S80 e E10/S20, ambos os grupos apresentaram: (1) Redução significativa e similar de LDL-C (-23 ± 30% vs -29 ± 13%, respectivamente; p=0,46), Apo-B (-22 ± 15% vs -18 ± 17%, respectivamente; p=0,22) e LDLox (-18 ± 47% vs -

15 ± 33%, respectivamente; p=0,65); (2) Redução modesta, similar e não significativa de PCR (-16% [IIQ: -42 - 7] vs -11% [IIQ= -37 - 26], respectivamente; p= 0,3). Nenhuma alteração significativa foi encontrada nos marcadores inflamatórios restantes ou nas CEPs. (3) O PFA-100 elevou-se significativamente com E10/S20, mas não com S80 (27 ± 43% vs 8 ± 33%, respectivamente; p=0,02). **Conclusão.** Nossos dados demonstram que em pacientes com DAC estável: (1) Tanto S80 como E10/S20 são igualmente eficientes na redução de LDL-C e apresentam efeitos anti-inflamatórios semelhantes; (2) E10/S20 apresentou efeito antiagregante plaquetário mais eficiente do que S80. Portanto, apesar de apresentarem efeitos hipolipemiantes e anti-inflamatórios semelhantes, E10/S20 promoveu maior efeito pleiotrópico antiagregante plaquetário do que S80, a despeito da dose quatro vezes menor de estatina na combinação. Novos estudos são necessários para elucidar os efeitos antiplaquetários da ezetimiba.

Descritores: colesterol, sinvastatina, doença da artéria coronária, agregação plaquetária, inflamação.

Summary

Pesaro AEP. Study of the inflammatory and platelet activity in patients with stable coronary artery disease, treated with two antilipemic strategies: Simvastatin 80 mg and ezetimibe 10 mg/simvastatin 20 mg. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 104p.

Background. Among patients with stable coronary artery disease (CAD), it is not clear if the effects of cholesterol reduction on inflammation, platelet aggregation and endothelial progenitor cells (EPCs) differ between combined ezetimibe plus moderate-dose simvastatin and high-dose simvastatin alone.

Objective. We sought to test the effects of a higher simvastatin dosage compared with combined treatment with ezetimibe plus a moderate simvastatin dose, on inflammation, platelet aggregation and EPCs. **Methods and Results.** CAD patients (n=83, 63 ± 9 years, 48 men), on simvastatin 20 mg, were randomly allocated to receive the combination ezetimibe 10 mg/simvastatin 20 mg (E10/S20) or simvastatin 80 mg (S80), for 6 weeks. Lipid profile, inflammatory markers (C-reactive protein [CRP], interleukin -1 β , -6 and -10, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, soluble intercellular adhesion molecule (sICAM)-1, soluble CD-40 ligand [sCD-40L] and oxidized LDL [oxLDL]), platelet aggregation (*platelet function analyzer* [PFA]-100) and EPCs were determined before and after treatment. Baseline lipids, inflammatory markers and PFA-100 were similar in both groups. After treatment, S80 and E10/S20 patients presented: (1) significant and similar reductions on LDL-C (-23 ± 30% vs -29 ± 13%, respectively; p=0.46), Apo-B (-22 ± 15% vs -18 ± 17%, respectively; p=0.22) and oxLDL (-18 ± 47% vs -15 ± 33%, respectively; p=0.65), and (2) modest lowering on CRP (-16% [IIQ: -42 - 7] vs -11% [IIQ= -37 - 26], respectively; p= 0.3). No significant changes were denoted among other inflammatory markers or EPCs. (3) PFA-100

increased significantly with E10/S20 but not with S80 ($27 \pm 43\%$ vs $8 \pm 33\%$, $p=0.02$). **Conclusions.** These data show that among stable CAD patients: (1) both E10/S20 and S80 are equally effective in reducing LDL-C, and have similar anti-inflammatory effects. (2) E10/S20 is more effective than S80 in inhibiting platelet aggregation. Thus, despite similar lipid lowering and anti-inflammatory effects, and a dose four times less of simvastatin, E10/S20 induced a greater pleiotropic platelet inhibition than S80. The potentially favorable antiplatelet effects of E10/S20 merit further study.

Key Words: cholesterol, simvastatin, coronary artery disease, platelet aggregation, inflammation.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Redução de risco cardiovascular com o tratamento hipolipemiante

Desde o início da década de 90, reduzir o colesterol é uma prioridade na prevenção de doenças ateroscleróticas. Estudos iniciais com diversos fármacos hipolipemiantes (fibratos, colestipol e estatinas) demonstraram que a redução da lipoproteína de baixa densidade-colesterol (LDL-C) em cerca de 25 mg/dL, estava associada à redução de até 50% no risco cardiovascular¹. Os pacientes que mais se beneficiaram foram aqueles de alto risco, particularmente os portadores de doença arterial coronária (DAC).

Em 1993, uma diretriz internacional destacou a importância da redução de LDL-C na prevenção secundária em pacientes com angina estável². Entretanto, não havia consenso a respeito das metas ideais de LDL-C. Durante a década de 90, os ensaios clínicos randomizados com estatinas em pacientes com DAC estável foram capazes de reduzir o LDL-C em até 25%, e o risco relativo de morte em até 30%^{3,4,5}. Entretanto, o nível de LDL-C inicial nesses estudos (cerca de 190 mg/dL) foi bem superior aos encontrados em ensaios da década subsequente.

Em 1999, as diretrizes da American Heart Association/American College of Cardiology (AHA/ACC)⁶ para o tratamento da angina estável ressaltaram a importância do uso de estatinas para redução de LDL-C, sugerindo metas mais rigorosas, abaixo de 100 mg/dL.

1.2. Novas metas de LDL-C em pacientes com DAC: tratamento agressivo

Em 2002 foi publicado o “Heart Protection Study” (HPS)⁷, que avaliou o tratamento com sinvastatina vs placebo, em pacientes com DAC ou alto risco cardiovascular. A média do LDL-C dos pacientes randomizados foi de 130 mg/dL. Um terço dos pacientes foram incluídos com LDL-C abaixo de 115 mg/dL. Nesse estudo, houve redução de mortalidade no grupo que usou sinvastatina (redução de LDL-C ao redor de 38 mg/dL) de 12% e redução de óbito por doença coronária de 17%. O benefício também foi presente no grupo de pacientes que apresentava LDL-C abaixo de 100 mg/dL no momento da inclusão.

De modo semelhante, o estudo PROVE-IT⁸ revelou a superioridade do tratamento com atorvastatina 80 mg, comparado à pravastatina 40 mg, após infarto do miocárdio (IM). O menor índice de eventos adversos cardiovasculares foi obtido no grupo atorvastatina, particularmente naqueles que alcançaram níveis de LDL-C inferior a 70 mg/dL.

Com base nos estudos citados, as modificações nas recomendações da AHA/ACC para o tratamento da dislipidemia em 2004, consideraram portadores de doença arterial oclusiva associada a múltiplos fatores de risco, diabetes ou síndrome metabólica, como pacientes de muito alto risco cardiovascular, e reduziram as metas de LDL-C nesse grupo para 70 mg/dL⁹. Recentemente, a Sociedade Brasileira de Cardiologia publicou a IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose¹⁰, onde pacientes com DAC estável foram considerados de muito alto risco cardiovascular. Nesse grupo de pacientes, essa diretriz recomendou que a meta de LDL-C fosse inferior a 70 mg/dL, o que frequentemente requer reduções de LDL-C acentuadas, ao redor de 50-60%⁸.

1.3. Estratégias terapêuticas para redução agressiva de LDL-C

Nos últimos anos, duas classes de fármacos destacaram-se na terapêutica hipolipemiante para redução de LDL-C: as estatinas e a ezetimiba.

As estatinas reduzem o LDL-C através da inibição da β -hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, uma das enzimas chave na síntese intracelular do colesterol. Sua inibição reduz o conteúdo intracelular de colesterol e, como conseqüência, há aumento do número de receptores de LDL-C nos hepatócitos que então removem mais lipoproteína de muito baixa densidade-colesterol (VLDL-C) e LDL-C da circulação (Figura

1)¹⁰. Estatinas reduzem o LDL-C em 15% a 55%. Elas ainda reduzem os triglicérides (Tg) em 7% a 28% e elevam a lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL-C) em 2% a 10%⁹. Como descrito previamente, essa é a classe de fármacos hipolipemiantes com a maior evidência de benefício cardiovascular, originada de grandes estudos randomizados¹⁻¹⁰.

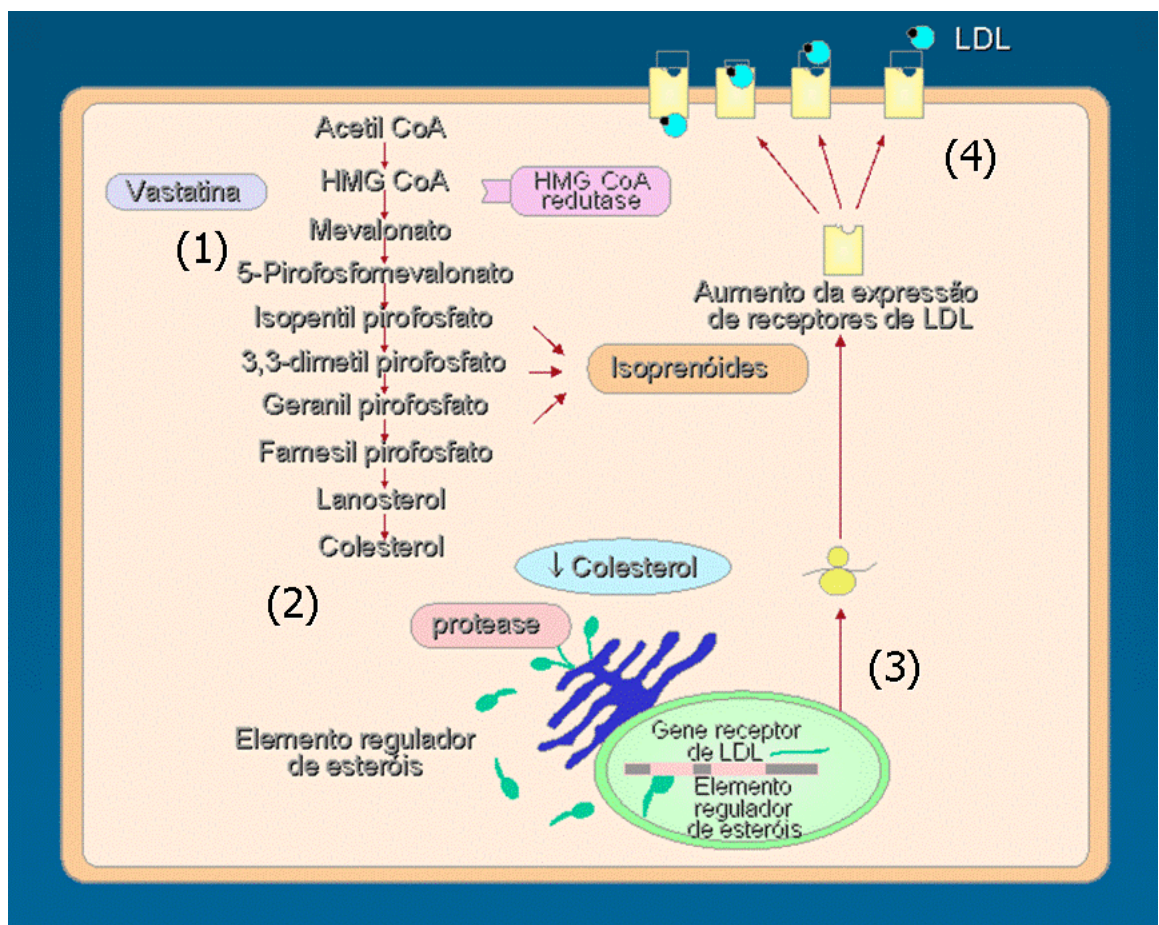


Figura 1. Mecanismo hipolipemiante das estatinas no fígado. A figura ilustra a ação das estatinas em quatro etapas: (1) Inibição da HMG CoA redutase, (2) redução do colesterol intra-celular, (3) aumento da síntese de receptores hepáticos de LDL-C, (4) aumento da captação de LDL-C pelo fígado. Adaptado de Vaughan JC. J Am Coll Cardiol. 2000;35(1): 1-10.

A ezetimiba é um fármaco que age reduzindo a absorção intestinal de colesterol advindo da dieta e de fontes biliares (Figura 2). Ela não interfere na absorção de ácidos biliares, ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis ou Tg¹¹. Sua ação ocorre no intestino delgado pelo bloqueio das proteínas receptoras Niemann-Pick¹². A ezetimiba reduz o LDL-C eficientemente, em cerca de 20 %¹³. Apesar da propriedade hipolipemiante estabelecida, ainda não há evidências do benefício desses fármacos na redução de eventos cardiovasculares adversos.

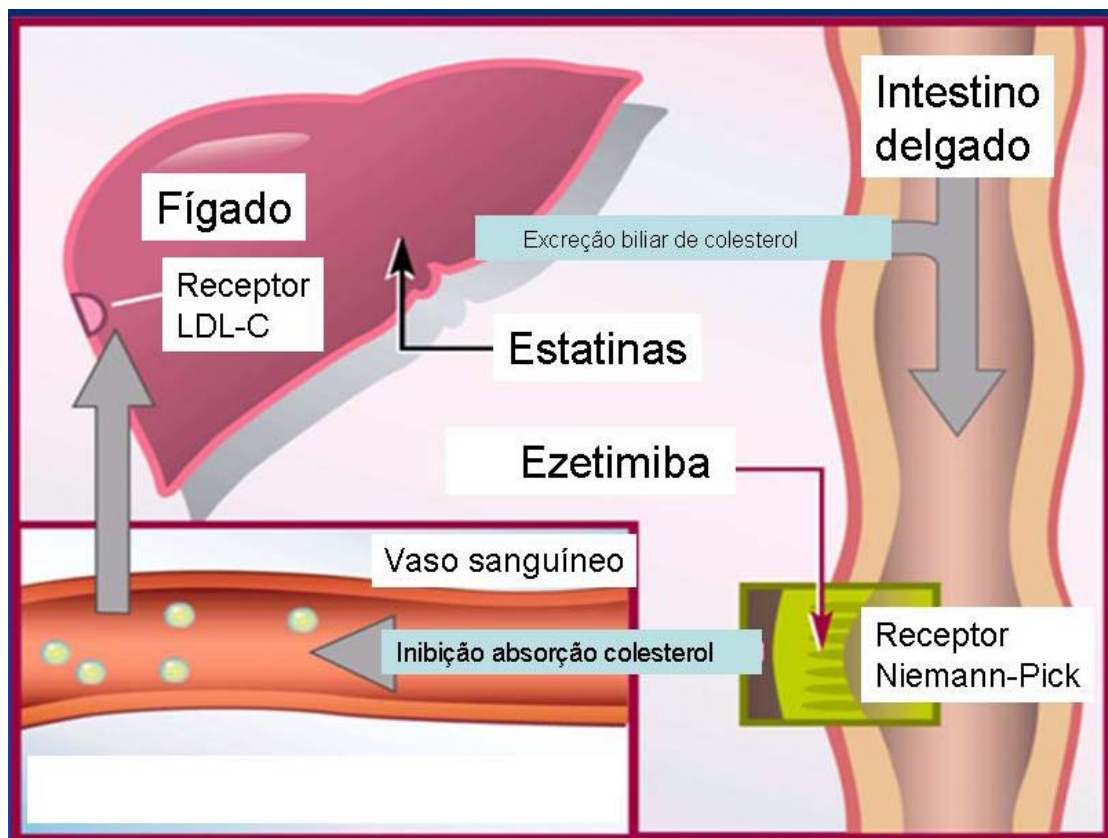


Figura 2. Mecanismo de ação da ezetimiba. A figura ilustra o bloqueio dos receptores Niemann-Pick no intestino delgado, reduzindo a absorção de colesterol. Adaptado de: Shepherd. J Eur J Cardiol Suppl. 2001;3(suppl E):E2–E5.

Em virtude da necessidade clínica de alcançar as novas metas rigorosas de LDL-C em pacientes com DAC, atualmente três estratégias farmacológicas estão disponíveis para redução agressiva de LDL-C^{8,14,15}:

- Estatinas em doses elevadas. Exemplos, sinvastatina 80 mg (S80) e atorvastatina 80 mg.
- Novas estatinas de potência elevada. Exemplo, rosuvastatina 20 mg.
- Associação de estatinas em doses moderadas e ezetimiba. Exemplo, ezetimiba 10 mg/ sinvastatina 20 mg (E10/S20).

Essas estratégias foram rapidamente incorporadas à prática clínica. Entretanto, ainda não se sabe se os diferentes tratamentos apresentam benefícios clínicos semelhantes. As melhores evidências clínicas de benefício concentram-se, até o momento, nas estatinas “tradicionais”. Por outro lado, altas doses de estatinas levam a um maior risco de acometimento hepático e muscular⁸. Novos estudos para comparação do benefício clínico dessas estratégias estão em andamento¹⁶.

1.4. Exemplos de pleiotropismo: efeitos anti-inflamatório e antiagregante plaquetário das estatinas

O conceito de que a redução de LDL-C com estatinas diminui o risco cardiovascular está bem estabelecido. Entretanto, desde o início da década de 90, diversos estudos indicaram que os efeitos benéficos desses fármacos poderiam ir além da redução de colesterol. Uma meta-análise demonstrou que pacientes tratados com estatinas apresentavam menor risco de IM em relação a aqueles tratados com outros fármacos hipolipemiantes, a despeito da redução semelhante de colesterol¹⁷. Posteriormente, uma regressão multivariada do estudo WOSCOPS¹⁸ demonstrou que o benefício da pravastatina não poderia ser explicado apenas pela redução lipídica. Adicionalmente, quando analisados subgrupos de pacientes que chegaram a níveis de colesterol semelhantes ao final do estudo, notou-se maior benefício naqueles tratados com pravastatina do que no grupo placebo. De modo semelhante, uma análise do estudo LIPID¹⁹ demonstrou que a redução de colesterol poderia explicar apenas 67% do benefício cardiovascular da pravastatina. Em suma, as evidências descritas indicaram que as estatinas poderiam exercer efeitos protetores independentes do colesterol.

De fato, os benefícios das estatinas no tratamento da aterosclerose não estão concentrados apenas na redução lipídica, mas também na regulação da produção de mevalonato e isoprenóides, como o farnesilpirofosfato e a geranyl-geranylpirofosfato. A diminuição da atividade dos isoprenóides leva a consequente inibição de importantes proteínas

sinalizadoras da família das GTPases, como a Rho (RhoA e Rac) e a Ras, entre outras, reguladoras da sinalização para proliferação de células musculares lisas, alterações do citoesqueleto, transporte trans-membrana, apoptose, síntese da NAD(P)H oxidase (modulação de oxidação) e óxido nítrico²⁰. Conseqüentemente, as estatinas atuam diretamente sobre a função endotelial, inflamação vascular, coagulação e ativação plaquetária, entre outros.

Vias metabólicas bloqueadas pelas estatinas

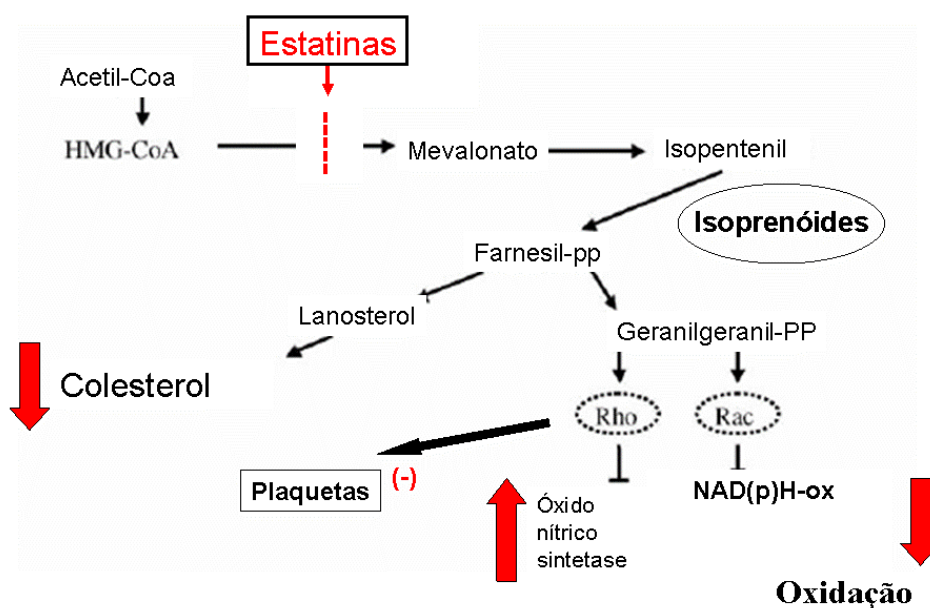


Figura 3. Ação das Estatinas no bloqueio da síntese de colesterol e na produção de isoprenóides. A redução dos isoprenóides inibe a ativação de proteínas sinalizadoras como a Rho e a Rac. Essa inibição modula a atividade da óxido nítrico sintetase e NAD(p)H oxidase (ox), com conseqüente redução da oxidação e melhora da função endotelial. Em relação à função plaquetária, a inibição da Rho modula a expressão de receptores de membrana (por exemplo, as glicoproteínas IIb e IIIa) e a fosforilação da miosina de cadeia leve (alterações da geometria celular). Adaptado de Endres M. *Atherosclerosis*. 2006;Suppl7(1): 31-35

Por outro lado, o efeito das estatinas sobre a agregação plaquetária vem sendo amplamente investigado nos últimos anos. Inibir a agregação plaquetária é um dos pontos fundamentais do tratamento da DAC. O uso do ácido acetil salicílico (AAS) em pacientes com DAC estável reduziu o risco de eventos cardiovasculares em mais de 30% em grandes estudos randomizados^{21,22}. Entretanto, é freqüente a presença da resistência ao AAS^{23,24} e ao clopidogrel²⁵, o que está associado a pior prognóstico cardiovascular^{26,27}. Portanto, medicações com efeito antiagregante adicional ao efeito dos antiplaquetários tradicionais poderiam ser úteis na prevenção de eventos adversos em pacientes com DAC. Nesse sentido, as estatinas podem reduzir a resistência ao AAS²⁸, já que exercem efeitos antiplaquetários por diversos mecanismos, dependentes da redução lipídica (alterações na composição lipídica da membrana plaquetária, nos canais Na^+/H^+ , influxo de cálcio e síntese de tromboxane) ou mesmo independentes do colesterol (modulação da óxido nítrico sintetase, da oxidação de LDL-C, e da isoprenilação da proteína Rho-GTPase)^{29,30}, que serão abordados na discussão dos resultados.

Entretanto, persistem questões importantes a cerca dos efeitos das estatinas sobre a agregação plaquetária e inflamação: (1) Qual seria a dose antiplaquetária e anti-inflamatória ideal de uma estatina? (2) Todas elas teriam efeito pleiotrópico semelhante sobre a função plaquetária? (3) A redução de colesterol com a associação ezetimiba/estatina promove efeito antiplaquetário? De fato, essas questões a cerca das estatinas não foram respondidas até o momento. Além disso, não sabemos se o ezetimiba

promove efeitos pleiotrópicos comparáveis aos das estatinas. Idealmente, essa comparação deveria ser feita entre doses equivalentes de ambos os fármacos, com efeitos hipolipemiantes semelhantes. Foi esse princípio, pouco freqüente nas publicações disponíveis, que utilizamos no desenho de nosso estudo.

1.4.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória das estatinas

Para mensurar a ação anti-inflamatória das estatinas, diversos marcadores foram investigados nas últimas décadas^{32,41}. Entre eles, destacamos em nosso estudo, a proteína C-reativa (PCR), a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, a proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, as interleucinas (IL) 1 β , 6 e 10, a glicoproteína CD-40 ligante solúvel (sCD-40L) e o LDL oxidado (LDLox). Além disso, as células endoteliais progenitoras (CEPs) também relacionam-se a inflamação vascular e sofrem influência das estatinas^{91,93}. Dentre esses marcadores, a PCR foi o mais estudado na maior parte das publicações, particularmente, nos grandes estudos randomizados^{35,37}.

1.4.2. Relevância da PCR na aterosclerose

A PCR é o marcador inflamatório com maior evidência de associação com a aterosclerose e suas manifestações clínicas. Leucócitos ativados na placa de ateroma sintetizam diversas citocinas inflamatórias. Dentre elas, a IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF) destacam-se por estimular hepatócitos a produzirem PCR³¹.

Entretanto, a PCR não é apenas um marcador da presença de aterosclerose, mas um mediador que atua em diversas etapas inflamatórias, favorecendo a progressão do ateroma. Dentre seus sítios de ação, promove disfunção endotelial desestabilizando a óxido nítrico sintetase endotelial, o que reduz a liberação do óxido nítrico e aumenta a liberação da endotelina-1; aumenta a expressão da molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM)-1 nas células endoteliais; eleva a expressão da MCP-1; estimula a adesão de leucócitos e a captação de LDLox pelos macrófagos; aumenta a liberação, pelos monócitos, de citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF, e favorece a fagocitose celular e a ativação de complemento; inibe a reendotelização de placas rotas e reduz células endoteliais progenitoras; incrementa o fator tecidual³². Resumindo, a PCR atua como propulsora da inflamação vascular, particularmente interagindo com outros diversos mediadores inflamatórios.

1.4.3. PCR: aspectos epidemiológicos

Desde a década de 90, estudos correlacionaram a PCR a fatores de risco cardiovasculares tradicionais, como idade, tabagismo e hipertensão³³. Posteriormente, grandes estudos prospectivos com milhares de pacientes demonstraram que a PCR é capaz de identificar pacientes de maior risco cardiovascular, independentemente e mais eficientemente do que os níveis de colesterol^{34,35}. Esse achado confirmou-se posteriormente em distintas populações de homens, mulheres, orientais e europeus³⁶.

1.4.4. Efeito das estatinas sobre a PCR e redução de risco cardiovascular

Existe ampla evidência que estatinas são capazes de reduzir os níveis de PCR^{37,38}. Entretanto, ainda não está estabelecido se esse efeito é promovido exclusivamente pela redução de colesterol, ou se também há efeitos pleiotrópicos adicionais. Alguns estudos sugerem que haja um efeito anti-inflamatório independente do LDL-C. O uso de sinvastatina após IM, por exemplo, foi associado à redução precoce de PCR, em duas semanas, independentemente da redução de colesterol no período³⁹. Por outro lado, a interrupção precoce de sinvastatina após um IM pode levar à elevação “rebote” desse marcador, também pouco relacionada ao LDL-C⁴⁰. Em pacientes dislipidêmicos, um estudo com atorvastatina versus placebo demonstrou redução significativa da PCR no grupo tratado com estatina, pouco relacionada à redução de LDL-C⁴¹.

Em relação ao benefício associado especificamente à redução de PCR pelas estatinas, no estudo PROVE-IT, Ridker et al avaliaram 3.745 pacientes após IM³⁷. O estudo demonstrou o benefício da redução da PCR, independente da redução do LDL-C. Níveis de PCR abaixo de 2 mg/L foram alcançados de maneira mais eficiente com atorvastatina 80 mg do que com pravastatina 40 mg. O grupo de pacientes que alcançou PCR abaixo de 2 mg/L apresentou menor risco cardiovascular durante o seguimento. Os resultados sugeriram que a redução da PCR poderia ser importante como nova meta na prevenção secundária de eventos cardiovasculares.

Recentemente, o estudo JUPITER³⁸, com 17.802 pacientes hígidos, sem dislipidemia (LDL-C<130 mg/dL), mas com PCR acima de 2 mg/L, avaliou os efeitos da rosuvastatina versus placebo ao longo de dois anos. Rosuvastatina foi capaz de reduzir IM, angina instável, acidente vascular cerebral (AVC) ou óbito cardiovascular em 23%, além da redução de LDL-C em 50% e de PCR em 37%. Esses resultados sugerem que a PCR possa ser útil na estratificação de risco de indivíduos aparentemente saudáveis, que possivelmente se beneficiariam da redução acentuada de LDL-C e da PCR.

1.4.5. Efeito das estatinas sobre novos marcadores inflamatórios

Estatinas não atuam apenas sobre a PCR. Outros marcadores inflamatórios associados à aterosclerose foram identificados e podem ser

reduzidos com estatinas, efeitos possivelmente independentes da redução de LDL-C.

✓ **Interleucinas 6, 1 β e 10**

A IL-6 é uma citocina com atividade humoral e celular, associada à inflamação e lesão tecidual. Ela é produzida em resposta a infecções, IL-1, interferon-gama e TNF. É uma mediadora da resposta de fase aguda e determinante da síntese hepática de PCR. Em um estudo prospectivo, a IL-6 foi preditora de IM em homens saudáveis, independente de tabagismo ou dislipidemia⁴². Ela, entre outras proteínas de fase aguda, está aumentada na síndrome coronária aguda (SCA)^{43,44}. Uma dosagem de IL-6 após uma SCA pode identificar pacientes de maior risco para eventos adversos, ou mesmo os que se beneficiam mais de estratégias intervencionistas⁴⁵. Resultados conflitantes foram identificados em relação aos efeitos das estatinas sobre a IL-6. Estudos com pacientes dislipidêmicos em prevenção primária demonstraram que o tratamento com sinvastatina ou atorvastatina, por curto espaço de tempo (três semanas a três meses), é eficaz na redução de IL-6, independentemente da redução de colesterol^{46,47}. Curiosamente, um deles demonstrou que esse efeito é precoce e ocorre desde as primeiras horas de tratamento⁴⁸. Por outro lado, diversos estudos com pacientes com SCA, não identificaram qualquer efeito do uso de estatinas sobre a IL-6^{49,50}. Um deles, com 2.402 pacientes tratados com atorvastatina 80 mg, não demonstrou qualquer vantagem sobre o placebo na redução de IL-6 após 16 semanas de tratamento⁵¹. Finalmente, em um pequeno estudo com pacientes com DAC

estável, após oito semanas de atorvastatina não houve redução significativa de IL-6⁵².

De modo semelhante à IL-6, a IL-1 β encontra-se entre as citocinas pró-inflamatórias mais estudadas, sendo expressa particularmente por células T (resposta Th-1) e monócitos. A IL-1 β já foi identificada em placas de ateroma e seus níveis correlacionam-se a eventos cardiovasculares⁵³. Previamente, atorvastatina reduziu os níveis séricos de IL-1 β após 8 semanas de tratamento em pacientes dislipidêmicos⁴¹.

A IL-10 é produzida por células T (resposta Th2), células B e monócitos. Ela é considerada uma citocina protetora no contexto da aterosclerose, já que inibe eficientemente a resposta imunológica Th1⁵⁴, reduzindo citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6)⁵⁵ e eventos ateroscleróticos *in vitro* e *in vivo*⁵⁶. Em pacientes com SCA, níveis elevados de IL-10 foram relacionados a menor risco de recorrência de eventos cardiovasculares⁵⁷. Por fim, em pacientes com cardiomiopatia isquêmica, fluvastatina foi capaz de elevar os níveis de IL-10 após 12 semanas de tratamento⁵⁸.

✓ **CD-40 ligante**

A CD-40L, ou CD154, é uma glicoproteína da família do TNF, expressa particularmente, em membranas de células T ativadas. A ligação entre a CD-40L de células T e a CD-40 de macrófagos é fundamental para a ativação desses e perpetuação da cascata inflamatória da aterosclerose (secreção de citocinas, metaloproteinases, moléculas de adesão e fator

tecidual)⁵⁹. Em relação às plaquetas, a CD-40L expressa em sua superfície sofre uma clivagem e origina a CD-40L solúvel (sCD-40L). Estima-se que mais de 95% da sCD-40L circulante derive de plaquetas. Além disso, os níveis de sCD-40L estão diretamente relacionados ao risco de doença cardiovascular⁶⁰. Até o momento, a relação de estatinas e sCD-40L não foi elucidada. Entretanto, o uso de estatinas já foi relacionado a redução da expressão de CD-40L em linfócitos T de pacientes com DAC⁶¹.

✓ ***Molécula de adesão intercelular solúvel (sICAM)-1***

A sICAM-1 é uma molécula mediadora da adesão e transmigração de leucócitos para o endotélio vascular, processo crítico envolvido na aterosclerose. Ela é expressa na membrana da célula endotelial, em resposta a citocinas inflamatórias (IL-1, TNF e interferon-gama). Estudos demonstraram a presença da molécula em diversos componentes da placa aterosclerótica⁶². A sICAM-1 já foi identificada como fator de risco para IM, com implicações prognósticas^{63,64}.

O efeito de estatinas sobre moléculas de adesão foi investigado por diversos autores em diferentes cenários clínicos. Serrano et al^{65, 66}, demonstraram que sinvastatina reduz a expressão de moléculas de adesão em monócitos ativados por LDL-C, em pacientes com dislipidemia e também naqueles com DAC, sendo esta redução correlacionada com a redução de LDL-C. Em relação à sICAM-1, dois pequenos estudos com indivíduos hipertensos ou dislipidêmicos não demonstraram qualquer efeito do tratamento com sinvastatina e pravastatina sobre a sICAM-1,

independentemente das doses utilizadas ou do tempo de tratamento (oito semanas ou um ano)^{67,68}. Por outro lado, em um estudo com 107 pacientes dislipidêmicos, após 6 semanas de tratamento, sinvastatina reduziu significativamente a ICAM-1⁶⁹. Posteriormente, esse efeito anti-inflamatório foi confirmado em 2.117 pacientes de alto risco cardiovascular (inclusive DAC) submetidos ao tratamento com atorvastatina por 12 semanas⁷⁰.

✓ ***Proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1***

A MCP-1 tem a função de recrutar monócitos para sítios inflamatórios, como a placa de ateroma. Além disso, ela ativa monócitos favorecendo a expressão de fator tecidual e ânions superóxido, o que pode predispor à instabilidade de placa e eventos coronarianos. Um estudo prévio demonstrou que a MCP-1 foi um marcador de risco independente para eventos adversos em pacientes com síndromes coronarianas agudas⁷¹. Em outro, houve correlação direta entre a MCP-1 e fatores de risco cardiovascular tradicionais, PCR e aterosclerose detectada com o escore de cálcio em tomografia computadorizada⁷². Em relação ao tratamento hipolipemiante, um estudo mostrou redução significativa da MCP-1 após utilização de estatinas em pacientes hipertensos⁶⁷. Entretanto, após um ano de tratamento, de Lemos et al⁷³ não encontraram qualquer redução de MCP-1 em mais de 3.000 pacientes.

✓ **LDL oxidado**

O LDLox está intimamente relacionado aos processos inflamatórios ateroscleróticos de recrutamento e ativação monocitária, apoptose e atividade pró-trombótica⁷⁴. Sua oxidação inicial por produtos oxidativos da parede arterial (advindos do endotélio, células musculares lisas e macrófagos) estimula a expressão de moléculas de adesão e de proteínas quimiotáticas, além do fator estimulador de colônias monocitárias. Através dos receptores “scavenger” e CD-36, o LDLox é fagocitado por macrófagos que originam células espumosas. O LDLox também promove a apoptose de células endoteliais, espumosas e musculares lisas⁷⁴. A instabilização da placa e o processo trombótico também sofrem influência da LDLox⁷⁵, capaz de estimular a produção de fator tecidual, reduzir a presença de trombosmodulina e promover a agregação plaquetária.

Em humanos, a elevação de LDLox plasmática foi associada à presença de DAC, SCA e placas vulneráveis^{76,77,78}. Um dos trabalhos mais relevantes foi publicado recentemente por Tsimikas et al⁷⁹, e demonstrou que os níveis circulantes de LDLox foram significativamente associados com obstruções coronárias.

Em relação ao efeito das estatinas sobre a LDLox, estudos demonstraram que esses fármacos reduzem a LDLox em diversas populações (dislipidêmicos, coronariopatas e diabéticos), após curto período de tratamento (até três meses), com diferentes classes de estatinas (pravastatina, atorvastatina e sinvastatina)^{80,81}. Curiosamente, dois estudos não detectaram redução maior de LDLox, com o aumento da dose de estatina^{82, 83}.

1.4.6. Efeito das estatinas sobre as células endoteliais progenitoras (CEPs)

As CEPs são células tronco derivadas da medula óssea com capacidade de diferenciação em células endoteliais. Essas células concentram-se particularmente em locais de lesão tecidual, promovendo re-endotelização e neovasculogênese^{84,85}. As evidências indicam que as CEPs contribuem com aproximadamente 25% das células endoteliais envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos⁸⁶.

A capacidade de migração e a quantidade de CEPs são reduzidas pela presença de fatores de risco cardiovasculares ou mesmo pela DAC⁸⁷. Dislipidemia, hipertensão e diabetes foram considerados fatores independentemente associados à redução das CEPs⁸⁸. Recentemente, dois estudos comprovaram que a quantidade de CEPs no sangue correlaciona-se inversamente com o risco cardiovascular em pacientes com DAC^{89,90}.

Em relação ao efeito das estatinas sobre as CEPs, estudos *in vitro* demonstraram que estatinas são capazes de promover proliferação, migração e sobrevivência dessas células^{91,92,93}. Entretanto, estudos clínicos encontraram resultados conflitantes. Um estudo em pacientes com angina estável, por exemplo, utilizou atorvastatina 40 mg por quatro semanas, com aumento de 50% na quantidade de CEPs após o tratamento⁹⁴. Porém, outro estudo em pacientes com DAC avaliou o efeito de estatina após período mais prolongado e detectou redução significativa das CEPs. Esse efeito

reductor correlacionou-se diretamente com o tempo (redução significativa após três meses, mas não após um mês) e com a dose do fármaco⁹⁵.

Um dos mecanismos responsáveis pela redução da quantidade, diferenciação e atividade das CEPs é explicado pela ação prejudicial da LDLox sobre essas células. Curiosamente, esse efeito pode ser atenuado pela atuação das estatinas. Imanishi et al⁹⁶ demonstraram que as CEPs são inibidas por LDLox. Esse efeito foi abolido pela utilização *in vitro* de atorvastatina. Mais recentemente, os mesmos autores comprovaram que a LDLox acelera o envelhecimento e morte de CEPs. Também nesse caso, atorvastatina foi capaz de atenuar os efeitos da LDLox⁹⁷.

1.4.7 Efeitos das estatinas sobre agregação plaquetária

Diversos estudos *in vitro* e em animais demonstraram que estatinas são capazes de reduzir a função plaquetária. Apesar de não conhecermos integralmente os mecanismos envolvidos nessa inibição, existem evidências de redução do fibrinogênio, expressão da trombina, ciclooxigenase, tromboxane (Tx) A₂ e elevação de prostaciclina^{98,99,100}. Por outro lado, a agregação plaquetária está relacionada a diversos mecanismos que sofrem ação das estatinas, tais como o conteúdo plaquetário de colesterol, a fluidez da membrana plaquetária, a peroxidação de LDL-C e a afinidade do HDL-C e LDL-C por receptores da membrana plaquetária, com conseqüente ativação de vias de sinalização intracelular^{101,102,103}.

Os reais efeitos antiplaquetários das estatinas em humanos são controversos e ainda não estabelecidos na literatura. Os estudos disponíveis avaliaram pequenas populações, utilizaram metodologias de avaliação plaquetária distintas e pouco reprodutíveis, e encontraram resultados discrepantes^{28,104,105}. Tirnaksiz et²⁸ al utilizaram o PFA-100 em pacientes com DAC e demonstraram redução da resistência ao AAS com atorvastatina. Entretanto, Malmström et al¹⁰⁵ não identificaram qualquer efeito de S80 sobre a função plaquetária avaliada por outra técnica, a citometria de fluxo, em pacientes diabéticos.

1.5. Comparação dos efeitos pleiotrópicos do tratamento com estatina isolada e da associação de estatina/ezetimiba: evidências conflitantes

Embora a associação de sinvastatina em dose moderada com ezetimiba reduza o LDL-C de maneira semelhante a altas doses da estatina isolada, pode haver diferenças nos efeitos pleiotrópicos promovidos pelos dois fármacos. Além disso, poucos autores investigaram se há algum efeito pleiotrópico associado ao uso de ezetimiba.

1.5.1. Efeitos sobre a PCR

Em um estudo com 668 pacientes, E10/S10 e S80 foram comparados e reduziram o LDL-C de modo semelhante, ao redor de 50%, sem diferenças na redução da PCR¹³. Entretanto, um subgrupo, submetido à terapêutica apenas com ezetimiba, obteve redução de LDL-C de 19,2%, mas apesar disso, não obteve redução significativa de PCR em relação ao placebo¹³. De modo semelhante, uma sub-análise de um estudo de prevenção primária em pacientes diabéticos, demonstrou que no grupo de tratamento hipolipemiante agressivo, a eficiência para redução de PCR das duas estratégias implantadas (estatina isolada vs estatina associada a ezetimiba) foi semelhante¹⁰⁶.

1.5.2. Efeitos sobre outros marcadores inflamatórios

Não há estudos que tenham avaliado o efeito da ezetimiba sobre IL-6, -10, sICAM-1, MCP-1 ou sCD-40L. Apenas um estudo demonstrou que a associação entre fluvastatina e ezetimiba é capaz de reduzir IL-1. Entretanto os autores não concluem se esse efeito foi dependente da redução de LDL-C¹⁰⁷.

1.5.3. Efeito sobre as CEPs

Em relação às CEPs, resultados conflitantes foram encontrados em cenários clínicos distintos. Um pequeno estudo que comparou o tratamento por quatro semanas com S10 vs E10, em pacientes com insuficiência cardíaca¹⁰⁸, evidenciou aumento de CEPs com sinvastatina, mas não com ezetimiba, a despeito da redução semelhante de LDL-C nos dois grupos. Por outro lado, um estudo em pacientes com síndrome metabólica, mostrou que S80 e E10/S10 reduziram LDL-C e elevaram as CEPs de modo semelhante¹⁰⁹.

1.5.4. Efeitos sobre agregação plaquetária

O efeito da ezetimiba sobre a função plaquetária é incerto e foi pouco estudado previamente. Hussein et al¹¹⁰ demonstraram que ezetimibe reduz a agregação plaquetária (agregometria), a peroxidação de LDL e o conteúdo plaquetário de colesterol. Surpreendentemente, o efeito antiplaquetário não ocorreu quando ezetimiba foi associado à sinvastatina. Em um estudo com 34 pacientes com diabetes tipo II e DAC, tanto S80 como E10/S10 não promoveram qualquer efeito antiplaquetário¹⁰⁵. Entretanto, em outra publicação com uma população maior (n=56), atorvastatina 40 mg, ao contrário de ezetimiba 10 mg/ atorvastatina 10 mg, foi capaz de reduzir a P-selectina e a agregação plaquetária (agregometria óptica)¹¹¹.

1.6 Racional do estudo

Pacientes com DAC estável devem ser tratados com o objetivo de reduzir LDL-C intensivamente, para menos de 70 mg/dL. Frequentemente, essa meta demanda uma redução de cerca de 50% do LDL-C basal. Para tanto, S80 e E10/S20 são igualmente eficientes. Porém, não sabemos qual das duas estratégias tem melhor efeito pleiotrópico sobre a inflamação e agregação plaquetária.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

Em pacientes com DAC estável em uso de S20, comparar os efeitos do incremento de sinvastatina para 80 mg (S80) com o acréscimo de ezetimiba 10 mg (associação E10/S20) sobre o perfil lipídico, marcadores inflamatórios, agregação plaquetária e CEPs.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. População do estudo

Trata-se de um estudo unicêntrico, onde todos os pacientes foram selecionados nos ambulatórios responsáveis pelo tratamento de pacientes com DAC, em um hospital terciário, especializado em cardiologia. No período de agosto de 2007 a janeiro de 2009, oitenta e três pacientes foram consecutivamente randomizados para dois grupos (S80 e E10/S20), segundo os seguintes critérios de inclusão (Figura 4):

- Pacientes com diagnóstico de DAC estável (evento coronário prévio há mais de três meses, cineangiocoronariografia com evidência de obstruções acima de 50% da luz coronariana ou quadro clínico compatível com angina estável classe funcional I ou II da Sociedade Canadense de Cardiologia)
- LDL-C inicial entre 70 e 160 mg/dL (calculado por método indireto, através da fórmula de Friedewald)
- Uso de sinvastatina 20 mg ao dia por pelo menos quatro semanas

Pacientes foram excluídos se apresentassem:

- Evento cardiovascular nos últimos três meses
- Triglicérides > 400 mg/dL
- Hemoglobina glicada acima de 7,5%
- Disfunção ventricular esquerda sistólica (fração de ejeção inferior a 50% pelo ecocardiograma)
- Condições inflamatórias: neoplasias, doenças do tecido conectivo, tratamento com imunossupressores ou corticosteróides
- Creatinina sérica acima de 1,5 mg/dL
- Doença hepática crônica ou transaminases elevadas (acima de três vezes do limite superior)
- Creatinoquinase (CPK) três vezes ou mais, acima do limite superior
- Uso de warfarina ou outros potentes inibidores da citocromo p450 (imidazólicos, macrolídeos)
- Disfunção tireoidiana
- Hipersensibilidade à estatina ou ezetimiba
- Idade inferior a 30 anos ou superior a 80 anos
- Índice de massa corpórea acima de 40 kg/m²
- Tratamento vigente com sinvastatina em dose superior a 20 mg, outras estatinas ou fibratos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes puderam deixar o estudo a qualquer momento de acordo com seu desejo.

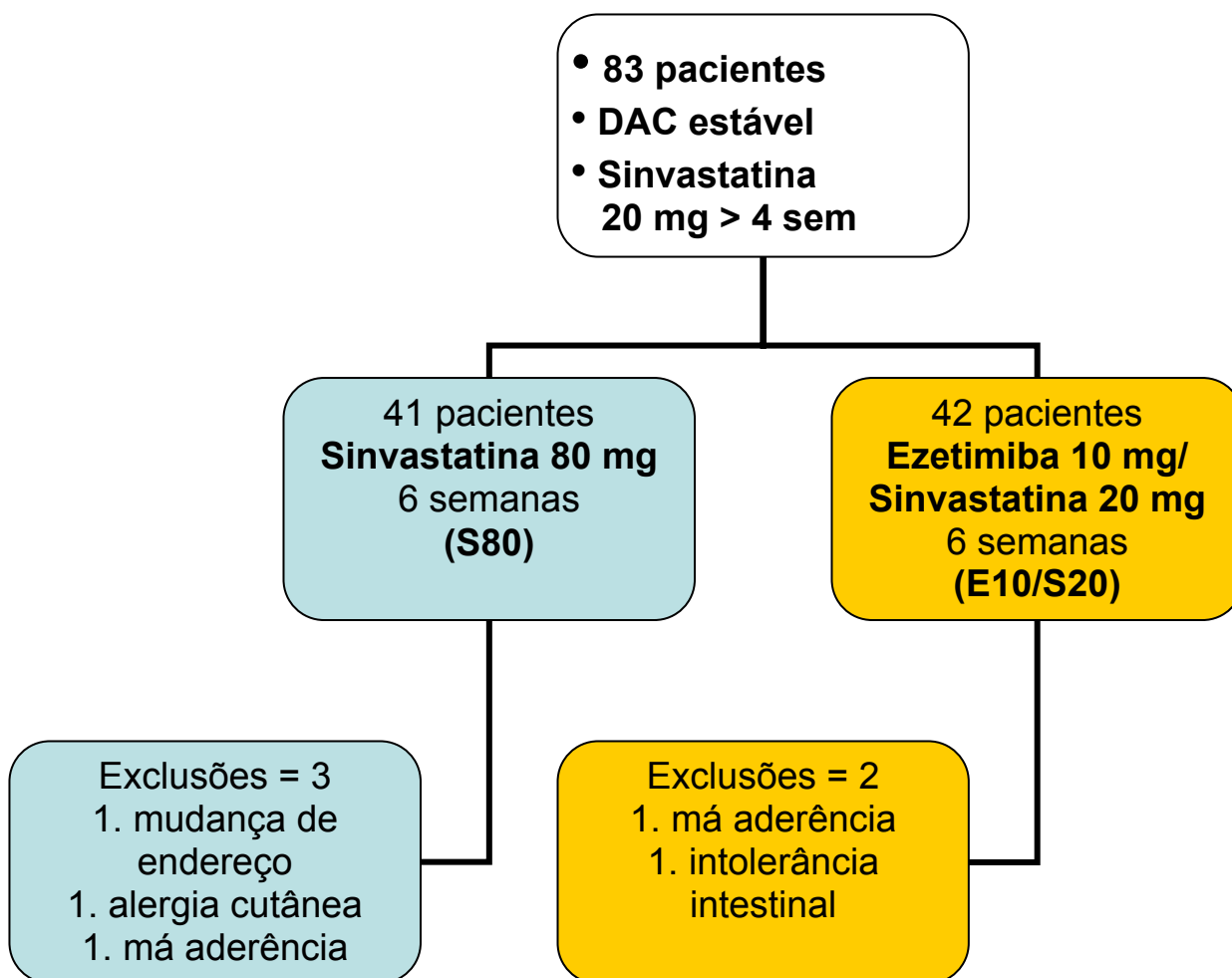


Figura 4. Randomização da população do estudo.

3.2. Randomização

A randomização (Figura 4) ocorreu da seguinte forma: duas cédulas foram preenchidas com as siglas S80 ou E10/S20, dobradas de tal forma que ocultassem seu conteúdo e inseridas em uma urna. A cada inclusão, um colaborador externo retirava, aleatoriamente, uma cédula da urna e revelava ao investigador principal o grupo de alocação sorteado. Após a inclusão, a cédula era depositada novamente na urna.

3.3 Desenho do estudo

Após a entrada no estudo, foram registradas as características individuais dos pacientes, como idade e sexo, assim como as medicações em uso.

Em seguida, foram colhidos urina em frascos estéreis e sangue periférico em tubos secos e com ácido etilenediaminotetraacético (EDTA). Os tubos foram separados em três grupos e conduzidos para processamentos distintos: Uma parte do sangue foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm e 4°C. Após a separação, soro e plasma foram armazenados a -80°C até o momento de análise dos marcadores inflamatórios. Uma segunda parte do sangue foi centrifugado e armazenado para subsequente citometria de fluxo. A terceira parte constituiu-se de um tubo com EDTA imediatamente submetido à análise pelo PFA-100.

Os pacientes, em uso de sinvastatina 20 mg, foram randomizados numa razão de 1:1 para receber S80 ou E10/S20 por seis semanas. Não houve cegamento para pacientes ou médicos pesquisadores. Os pacientes foram orientados a utilizar as medicações no período noturno, em dose única. As medicações do estudo foram integralmente doadas pela *Merck Sharp Dohme do Brasil*. Todas as outras medicações e decisões clínicas ocorreram a critério do médico assistente do paciente. Após seis semanas, os pacientes fizeram a segunda e última visita para coleta de sangue e urina, encerrando a participação no estudo.

3.4. Análises Laboratoriais

3.4.1. Exames gerais

No momento da inclusão no estudo, foram analisados os perfis bioquímico, hematológico e a função tireoidiana dos pacientes. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Na segunda visita, ao término do tratamento, os exames foram repetidos.

3.4.2. Marcadores inflamatórios: PCR, IL-6, IL-1 β , IL-10, MCP-1, sICAM-1, sCD-40L, LDLox

Proteína C-reativa

A dosagem da PCR foi realizada através da técnica de imunonefelometria no nefelômetro BN II (Dade Behring, EUA), utilizando kit de PCR de alta sensibilidade, constituído por suspensão de partículas de poliestireno revestidas com anticorpo monoclonal de rato contra a PCR humana.

Nesta técnica amostras de soro são colocadas em cuvetas com o antisoro anti-PCR e imunocomplexos são formados. Um feixe de luz gerado por um laser é dirigido para a cuveta. Ao encontrar o complexo antígeno-anticorpo, a luz é dispersa. A intensidade da luz dispersa é proporcional à quantidade de complexos antígeno-anticorpo. Um padrão com quantidades conhecidas de antígeno e o sinal de luz dispersa foi utilizado. A distribuição da intensidade da luz dispersa depende da relação entre o tamanho da partícula do complexo antígeno-anticorpo e o comprimento de onda da luz emitida pelo laser. O limite de detecção do método ultra-sensível é de 0,2 mg/L.

✓ *Interleucinas e CD-40 Ligante solúvel*

Para as dosagens de IL-6 (sensibilidade de 2 pg/ml; variabilidade intra-ensaio de 6,2%) e IL1- β (sensibilidade de 1,5 pg/ml; variabilidade intra-ensaio de 4,8%), foi utilizada a técnica de quimioluminescência realizada no

equipamento de automação IMMULITE (DPC MedLab, EUA). A escolha do método baseou-se na alta sensibilidade do mesmo e na sua possível introdução na rotina laboratorial, visto que o equipamento que realiza as análises é totalmente automatizado. A técnica de quimioluminescência consiste em um ensaio imunoenzimático, no qual em uma primeira etapa a amostra é pipetada automaticamente na unidade de teste, juntamente com tampão de reação (matriz orgânica) e com o conjugado (anti-IL-6 acoplada à enzima fosfatase alcalina). No interior da unidade de teste existe uma pérola recoberta com anti-IL-6 (anticorpo monoclonal de camundongo), na qual irá se ligar a IL-6 presente na amostra e o anticorpo marcado com fosfatase alcalina (sanduíche). Após incubação a 37°C com agitação intermitente, a unidade de teste é centrifugada em seu eixo vertical em alta velocidade. Nesta etapa todo o material que não se ligou à pérola é forçado a subir pelas paredes da unidade de teste, capturado em um reservatório e descartado. Em uma série de lavagens remove-se eficientemente o material remanescente e o substrato quimioluminescente é adicionado. A enzima fosfatase alcalina hidrolisa o substrato gerando um produto instável o qual, após estabilização, emite fóton de luz (amplificados), medido por um fotomultiplicador que transforma a luz emitida pelos fótons em impulsos elétricos. Os impulsos elétricos são lidos como “contagens” de luz por segundo.

A citocina IL-10 (BD Biosciences, EUA; sensibilidade de 3,0 pg/ml e variabilidade de 4,0%) e o sCD-40L (R&D Systems, EUA; sensibilidade de 8,0 pg/ml e variabilidade não disponível) foram dosados por ELISA. Placas

de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-IL10 ou com sCD-40L humano recombinante, por 12 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20. Os sítios livres do plástico foram bloqueados com PBS contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco) para IL-10 ou 1% de BSA (soro albumina bovina, Sigma) para sCD-40L, por uma hora. A placa foi, então, lavada para remoção da solução de bloqueio. Em seguida, 50µl das amostras e dos padrões foram colocados nos respectivos poços e incubados por 2 horas. Ao final do período as placas foram lavadas novamente. Foram adicionados 25µl do anticorpo de detecção conjugado com a peroxidase, e incubou-se por 1 hora para IL-10 e 2 horas para sCD-40L. As placas foram lavadas e ao final, adicionados o substrato da peroxidase, tetrametilbenzidina, deixando reagir por 30 minutos. Ao final da incubação foi adicionada a solução de parada (H₂SO₄-2N). A quantificação foi realizada pela leitura da absorbância (450nm) e os resultados expressos em picogramas de antígeno por miligrama de proteína.

✓ ***Proteína quimiotática de monócitos-1 e molécula de adesão intercelular-1***

A MCP-1 (sensibilidade de 2,31 pg/ml; variabilidade intra-ensaio de 4,7%) e sICAM-1 (sensibilidade de 330,0 pg/ml; variabilidade intra-ensaio de 5,6%) solúveis foram dosadas pelo método de ELISA utilizando kits da R&D

Systems (EUA). As análises foram realizadas através de imunoenensaio enzimático para a determinação quantitativa de sICAM-1/MCP-1 humana solúvel no soro. Um anticorpo monoclonal é adsorvido na microplaca. A sICAM-1/ MCP-1 presente na amostra se liga ao anticorpo adsorvido na microplaca. Um reagente conjugado monoclonal é adicionado e se liga a sICAM-1/MCP-1 capturada pelo primeiro anticorpo. Após incubação, a enzima não ligada é removida durante um processo de lavagem e um substrato reagente com o HRP é adicionado nos poços. Forma-se um produto colorido proporcional à quantidade de sICAM-1/ MCP-1 presente na amostra que é medido por um leitor de placa de ELISA em 450 nm.

✓ **LDL oxidada**

A LDLox 1 (sensibilidade de 0,3 U/l; variabilidade intra-ensaio de 6,1%) foi mensurada por método Elisa disponível comercialmente (Mercodia, EUA). Foram avaliados anticorpos anti-LDL oxidada, por enzima imunoenensaio (Mercodia Oxidized LDL Competitive ELISA), que tem como base o anticorpo monoclonal 4E6. O LDLox nas amostras compete com uma quantidade determinada de LDL fixada nos espaços de microtítulos através da ligação de anticorpos específicos marcados com biotina. Após a etapa de lavagem, que remove componentes da amostra que não reagiram, a ligação do anticorpo marcado com biotina é detectada pela estreptavidina conjugada com HRP. Após uma segunda incubação e uma nova etapa de lavagem, o

conjugado é detectado pela reação com o substrato 3,3'- 5,5'- tetrametilbenzidina. A reação se encerra com a adição de ácido para que se obtenha um desfecho colorimétrico, lido espectrofotometricamente. Foram realizados, assim, preparados de: solução conjugado enzimático, na qual foram misturados “conjugado enzimático 11x” (1,2 mL) e “conjugado enzimático tampão” (12 mL); solução com anticorpos, em que “anticorpos 6x” (1000 microlitros) e “anticorpos tampão” (6 mL) foram misturados; “Lavado tampão”, resultado da mistura de 1 frasco (40 mL) com 800 mL de água destilada. O sangue coletado foi centrifugado, e o plasma resultante armazenado em tubos criogênicos a - 80⁰c. O descongelamento das amostras foi feito a 4⁰c. Preparadas as soluções e diluídas as amostras (25 microlitros de plasma + 1000 microlitros de solução tampão), partimos para as seguintes etapas: incubação no shaker por 2 horas, em temperatura ambiente; lavagem por 6 vezes com 350 microlitros (wash buffer); foram adicionados 100 microlitros da solução enzima conjugado; incubação no shaker por 1 hora, em temperatura ambiente; novamente foi realizado o wash buffer; foi adicionado substrato TMB, de 200 microlitros; incubação por 15 minutos em temperatura ambiente; adicionado “stop solution” (que da cor, constituindo o desfecho), 50 microlitros, colocando-se, então, no shaker por 5 segundos. A leitura foi feita em 450 nanômetros.

3.4.3. Agregação plaquetária: PFA-100

O PFA-100 (Siemens Healthcare Diagnostics, EUA) é um método que se baseia no uso de sangue total, sem preparo prévio, inserido diretamente em um dispositivo automático específico. O sangue é então submetido a forças de cisalhamento, análogas a fenômenos fisiológicos de cisalhamento vascular. Apesar de não avaliar especificamente o efeito direto do AAS sobre a via da ciclooxigenase, o PFA-100 pode medir o tempo de formação do trombo a partir de múltiplos estímulos previsíveis (colágeno, ADP, epinefrina)^{112, 113}. Nesse estudo, utilizamos o cartucho colágeno-epinefrina (2 mcg de colágeno eqüino tipo I/10 mcg de bitartrato de epinefrina) para ativar o sistema plaquetário. O tempo de oclusão de uma abertura do dispositivo foi quantificado em segundos (normal para colágeno-epinefrina colhido em citrato de sódio a 3.8% <150 segundos¹¹⁴). O PFA-100 é um método simples, rápido, que requer pequena quantidade de sangue. Quanto maior o tempo do PFA-100, menor a velocidade de agregação plaquetária.

3.4.4. Células endoteliais progenitoras

Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo anticoagulante (EDTA).

Etapa 1: Para o isolamento das células linfomononucleares, a amostra de sangue foi diluída com o mesmo volume de meio de cultura RPMI (Gibco, Carlsbad, CA). Após diluição do sangue, cada 10ml deste material diluído foi transferido para um tubo cônico (15ml) contendo 5ml de gradiente de densidade Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, United Kingdom). Os tubos foram centrifugados por 30 minutos, 500g à 22°C. Em seguida, a interface rica em células linfomononucleares foi removida e ressuspendida em meio de cultura. Após a realização da contagem, as células foram congeladas com meio contendo 10% de DMSO.

Etapa 2: Após o término da inclusão de pacientes, as amostras foram descongeladas em tubos contendo meio de cultura RPMI (Gibco, Carlsbad, CA), contendo 40% de soro fetal bovino. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos, 500g a 22°C, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura, e ajustadas para a concentração de 2×10^7 /ml.

Etapa 3 (citometria): Os experimentos de citometria foram conduzidos utilizando anticorpos monoclonais (conjugados aos respectivos fluoróforos, conforme indicado na tabela 1) disponíveis comercialmente e o protocolo de marcação foi realizado de acordo com as indicações do fabricante. Uma amostra de 300µl, contendo cerca de 6×10^6 células foi distribuída em três tubos (2 x 10^6 células/tubo); em seguida as células foram marcadas com os anticorpos monoclonais/fluorescências de interesse (Tabela 1). Depois foram incubadas a 4°C, protegidas da luz, por 30 minutos, lavadas com solução tampão e fixadas em paraformaldeído 1%.

Tabela 1. Painel contendo a combinação de anticorpos/fluorescências utilizada na citometria de fluxo. O tubo 1 contém anticorpos para detecção de células endoteliais progenitoras e hematopoiéticas; o tubo 2 para detecção de células endoteliais circulantes; o tubo 3 contém anticorpo de ligação inespecífica utilizado como parâmetro basal para ajuste dos resultados de ligações específicas dos tubos 1 e 2.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	Anticorpos	Anticorpos	Anticorpos
Flourescências			
FITC	CD31	CD146	IgG1
PE	VEGFR2	VEGFR2	IgG1
PE-Cy5	CD3/CD19	CD3/CD19	IgG1
PE-Cy7	CD34	CD34	IgG1
APC-Cy7	CD14	CD14	IgG1

Os anticorpos monoclonais/fluorescências utilizados nos diversos tubos foram os seguintes: CD31/FITC (BD R&D System, EUA), CD146/FITC (BD Pharmingen, EUA), VEGFR2/PE (R&D System, EUA), CD3/PE-Cy5 (BD Pharmingen, EUA), CD19/PE-Cy5 (BD Pharmingen, EUA), CD34/PE-Cy7 (BD Pharmingen, EUA), CD14/APC Cy-7 (BD Pharmingen, EUA) e os isotipos controles relacionados.

Os tubos foram submetidos à citometria no citometro de fluxo FACSARIA (BD Biosciences, EUA), de modo que foram adquiridos no mínimo 500.000 eventos (células avaliadas) por tubo. A análise foi realizada

utilizando-se primeiro a delimitação de uma área de *Dispersão Lateral* (*Side Scatter*, SSC), que é o eixo que determina a granulosidade celular vs *Dispersão Frontal* (*Foward Scatter*, FSC), que é o eixo que determina o tamanho celular (Figura 5).

Os eventos presentes nesta primeira área (P1) foram analisados nos gráficos subseqüentes. No segundo gráfico (figura 5, direita), a análise dos dados de P1 foi realizada a partir dos anticorpos monoclonais/fluorescências, do seguinte modo:

- I. Exclusão de todas as células positivas para CD3/PE-Cy5 e CD19/PE-Cy5 (exclusão de linfócitos)
- II. Seleção de células positivas para CD146/FITC ou CD31/FITC (endoteliais)

Dependendo da combinação de anticorpos das análises subsequentes, estas células (todas negativas para CD3 e CD19) foram classificadas de acordo com sua positividade para os outros marcadores:

- Células progenitoras hematopoéticas (CPHs): positivas para CD14, CD31, VEGFR2 (KDR) e CD34.
- Células endoteliais progenitoras (CEPs): negativas para CD14 e positivas para CD31, VEGFR2 (KDR) e CD34.
- Células endoteliais circulantes (CECs): negativas CD14 e CD34; positivas para CD146 e VEGFR2 (KDR).

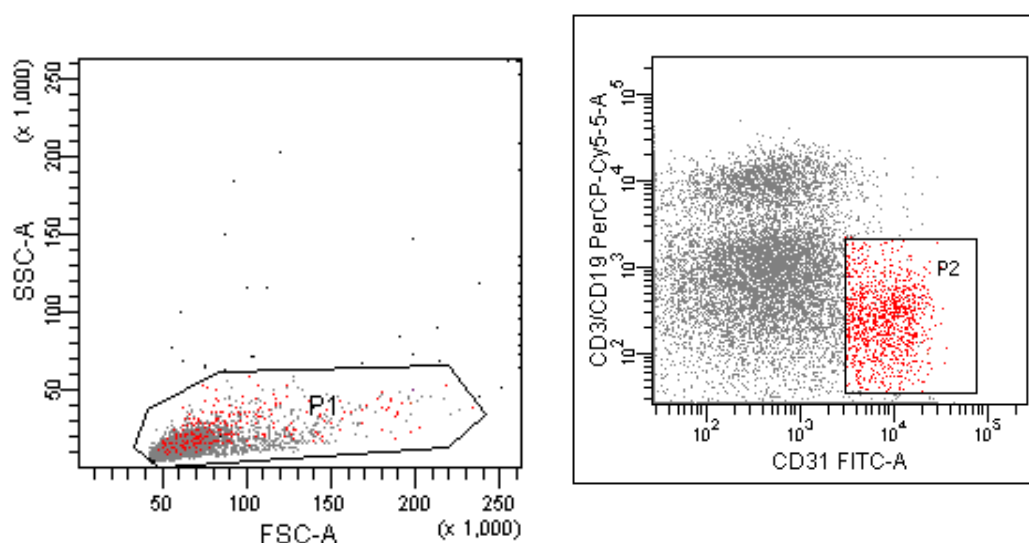


Figura 5. Análise por citometria de fluxo - O primeiro gráfico mostra a delimitação de área (P1) em Dispersão Lateral (*Side Scatter*, SSC) vs Dispersão Frontal (*Foward Scatter*, FSC) que seleciona as células por granulosidade e tamanho, respectivamente. Os eventos presentes nesta primeira área foram analisados no gráfico da direita de acordo com a marcação de anticorpos específicos/fluorescências. Nesse caso representados CD3 e CD19 (marcados com PE-Cy5) e CD31 marcado com FITC.

3.5. Análise estatística

3.5.1. Variáveis específicas

- Clínicas: idade, sexo, fatores de risco para aterosclerose (hipertensão, tabagismo, diabetes).
- Laboratoriais: Uréia, creatinina, sódio, potássio, hemograma, glicemia, hemoglobina glicosilada, colesterol total, LDL-C, HDL-C, Tg, PCR, IL-6, IL-1 β , IL-10, MCP-1, sICAM-1, sCD-40L, LDLox, PFA-100 e CEPs.

3.5.2. Desfechos

- Primários: Análise de marcadores inflamatórios (PCR, IL-6, IL-1 β , IL-10, MCP-1, sICAM-1, sCD-40L, LDLox), PFA-100, CEPs.
- Secundários: Análise da variação de glicemia, hemoglobina glicada, colesterol total, LDL-C, HDL-C, Tg, apo-A/B e fibrinogênio.

3.5.3. Métodos estatísticos ^{115, 116,}

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas, analisamos os valores mínimos, máximos, médias (desvios-padrão) e medianas (percentis 25/75). Para as variáveis qualitativas foram calculadas frequências absolutas e porcentagens.

O tamanho amostral foi calculado a partir do teste t pareado (sigma stat), considerando um poder de 80% e alfa de 5%. Dessa maneira, planejamos incluir 72 pacientes, para detectar uma diferença entre as médias geométricas de PCR de 2 mg/l, com desvio padrão de 3 mg/l ^{41, 117}.

Para análise intragrupo (pré vs pós tratamento), foram utilizados o teste t pareado (para variáveis com distribuição normal) e o teste de Wilcoxon (para variáveis não paramétricas). Para comparação entre as duas terapêuticas foram utilizados: (1) regressão linear múltipla com ajuste para os valores de base da variável (análise de covariância - ancova); (2) teste de Wilcoxon rank-sum quando a variável não apresentava distribuição normal.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos gerais

Oitenta e três pacientes (48 homens, idade média de 63 ± 9 anos) foram randomizados, sendo que cinco foram excluídos após a randomização por má aderência ou intolerância gastrointestinal às medicações (Figura 4).

Portanto, 78 pacientes remanesceram para análise estatística. Trinta e oito pacientes receberam S80 e 40 pacientes receberam E10/S20. Os pacientes foram analisados quanto à presença de diabetes, antecedentes cardiovasculares, sexo, idade, terapêutica cardiovascular e perfil metabólico. (Tabelas 2 e 3). Nas Tabelas 2 e 3, observamos que os parâmetros clínicos e o perfil metabólico basais dos pacientes são semelhantes em ambos os grupos, com exceção da circunferência abdominal, discretamente maior no grupo E10/S20. A Tabela 4 mostra que as enzimas hepáticas, glicemia e hemoglobina glicada não sofreram alterações clinicamente significativas nos dois grupos. A CPK elevou-se modestamente com S80, mas não se alterou com E10/S20. Entretanto, nenhum paciente interrompeu o tratamento por elevação de CPK (Tabela 4).

Tabela 2. Características basais da população estudada.

Variável (%)	Sinvastatina 80 mg (n=38)	Ezetimiba 10/ sinvastatina 20 mg (n=40)	p
Homens	21 (55)	27 (68)	0,26
Idade, anos	61 ± 10	64 ± 8	0,19
Antecedentes			
Diabete	20 (52)	16 (40)	0,26
IM	29 (76)	24 (60)	0,21
Angioplastia	16 (42)	16 (40)	0,90
Revascularização miocárdica	13 (34)	16 (40)	0,59
AVC	3 (8)	3 (8)	0,97
HAS	26 (68)	36 (90)	0,28
Tabagismo	8/35 (23)	5/39 (13)	0,25
Atividade física	19/35 (54)	15/38 (40)	0,17
Medicações			
iECA/BRA	32 (84)	35 (88)	0,38
AAS	35 (92)	37 (93)	0,30
Tienopirídínicos	1 (2,6)	1 (2,5)	0,40
Omeprazol	9 (24)	11 (28)	0,24
Exame Físico			
IMC, kg/m ²	27,8 ± 2,7	28,6 ± 3,7	0,28
Circunferência abdominal, cm	92,1 ± 8,9	97,2 ± 8,4	0,02

Valores expressos em média ± DP ou valor absoluto (%),

IM: Infarto do miocárdio; AVC: acidente vascular cerebral; HAS: hipertensão arterial sistêmica; LDL-C: colesterol LDL; HDL-C: colesterol HDL; iECA: inibidor da enzima conversora de angiotensina; BRA: bloqueador do receptor de angiotensina; AAS: ácido acetil salicílico; IMC: índice de massa corpórea.

Tabela 3. Perfil metabólico e bioquímico da população estudada.

Variável	Sinvastatina 80 mg (n=38)	Ezetimiba 10/ sinvastatina 20 mg (n=40)	p
Exames gerais			
Glicemia, mg/dL	106 (92-130)	102 (95-118)	0,58
Hb glicada, %	6 (5,7-6,7)	5,9 (5,7-6,4)	0,59
Colesterol total, mg/dL	170 (155-212)	174 (157-195)	0,74
LDL-C, mg/dL	101 (85-130)	99 (89-117)	0,83
HDL-C, mg/dL	45 (38-50)	42 (37-48)	0,87
Triglicérides, mg/dL	117 (85-150)	139 (108-168)	0,07
Apo-A, g/L	1,6 (1,4-1,7)	1,6 (1,4-1,7)	0,26
Apo-B, g/L	0,9 (0,7-1,0)	0,9 (0,8-1,0)	0,58
Creatinina, mg/dL	1,0 (0,8-1,1)	1,0 (0,9-1,1)	0,88
CPK, U/L	106 (63-134)	113 (75-148)	0,67
Fibrinogênio, mg/dL	361 (310-436)	329 (289-384)	0,04
TGO, U/L	20 (17-25)	24 (20-27)	0,01
TGP, U/L	38 (35-42)	42 (36-48)	0,07
Plaquetas/ mm ³	249 ± 63	225 ± 50	0,56

Valores expressos em média ± DP ou mediana (p 25-75), LDL-C: colesterol LDL; HDL-C: colesterol HDL; Hb glicada: hemoglobina glicada; LDL-C: colesterol LDL; HDL-C: colesterol HDL; Apo: apolipoproteína; CPK: creatinofosfoquinase; TGO: transaminase glutâmico oxalacética; TGP: transaminase glutâmico pirúvica;

Tabela 4: Comparação dos exames gerais entre o início e após seis semanas de tratamento em pacientes que terminaram o estudo

	Sinvastatina 80 mg (S80) (n=38)	Ezetimiba 10/ sinvastatina 20 mg (E10/S20) (n=40)	p: S80 vs E10/S20
CPK, U/L			
Pré-tratamento	106 (63 - 134)	113 (75 - 148)	0,67
Pós-tratamento	131 (68 - 156)	110 (80 - 144)	
p: pós vs pré	<0.01	0.58	
Alteração mediana, %	19 (2 - 41)	3 (12 - 25)	0,25
Glicemia, mg/dL			
Pré-tratamento	106 (92 - 130)	102 (95 - 118)	0,58
Pós-tratamento	100 (90 - 127)	100 (92 - 123)	
p: pós vs pré	0.30	0.34	
Alteração mediana, %	- 2 ± 16	1 ± 9	0,62
Hb glic, %			
Pré-tratamento	6 (5.7 - 6.7)	5.9 (5.7 - 6.4)	0,59
Pós-tratamento	6.1 (5.7 - 6.7)	5.6 (5.6 - 6.3)	
p: pós vs pré	0,09	0,90	
Alteração mediana, %	2 ± 7	0 ± 6	0,48
Fibrinogênio, mg/dL			
Pré-tratamento	361 (310 - 436)	329 (289 - 384)	0,04
Pós-tratamento	364 (318 - 398)	324 (284 - 388)	
p: pós vs pré	0.95	0.61	
Alteração mediana, %	2.6 ± 25	1 ± 13	0,53
TGO, U/I			
Pré-tratamento	20 (17-25)	24 (20-27)	0,01
Pós-tratamento	21 (20 - 27)	25 (21 - 30)	
p: pós vs pré	0.13	<0.01	
Alteração mediana, %	7 (-11 - 25)	11 (-2 - 17)	0,60
TGP, U/I			
Pré-tratamento	38 (35-42)	42 (36-48)	0,07
Pós-tratamento	40 (36 - 43)	44 (36 - 56)	
p: pós vs pré	0.33	0,48	
Alteração mediana, %	4 (-8 - 13)	9 (0 - 17)	0,55

CPK: creatinofosfoquinase; TGO: transaminase glutâmico oxalacética; TGP: transaminase glutâmico pirúvica; Hb glic: Hemoglobina glicada

4.2. Perfil lipídico

Analisamos o impacto de cada uma das medicações no perfil lipídico (Tabela 5; Figura 6). Sinvastatina 80 mg e E10/S20 reduziram significativamente e de modo similar, o colesterol total (20% [IIQ = 9 - 27] vs 20% [IIQ = 13 - 27], respectivamente; $p=0,76$) e o LDL-C ($23 \pm 30\%$ vs $29 \pm 13\%$; respectivamente; $p=0,46$). Não houve alteração significativa nos níveis de HDL-C. Os Tg foram reduzidos significativamente por E10/S20, mas não por S80 ($14 \pm 31\%$ vs $4 \pm 32\%$, respectivamente; $p=0,67$).

A Apo-A não se modificou significativamente ao longo do tempo. A Apo-B foi reduzida significativamente e de modo similar nos dois grupos ($22 \pm 15\%$ vs $18 \pm 17\%$; para S80 e E10/S20, respectivamente; $p=0,22$).

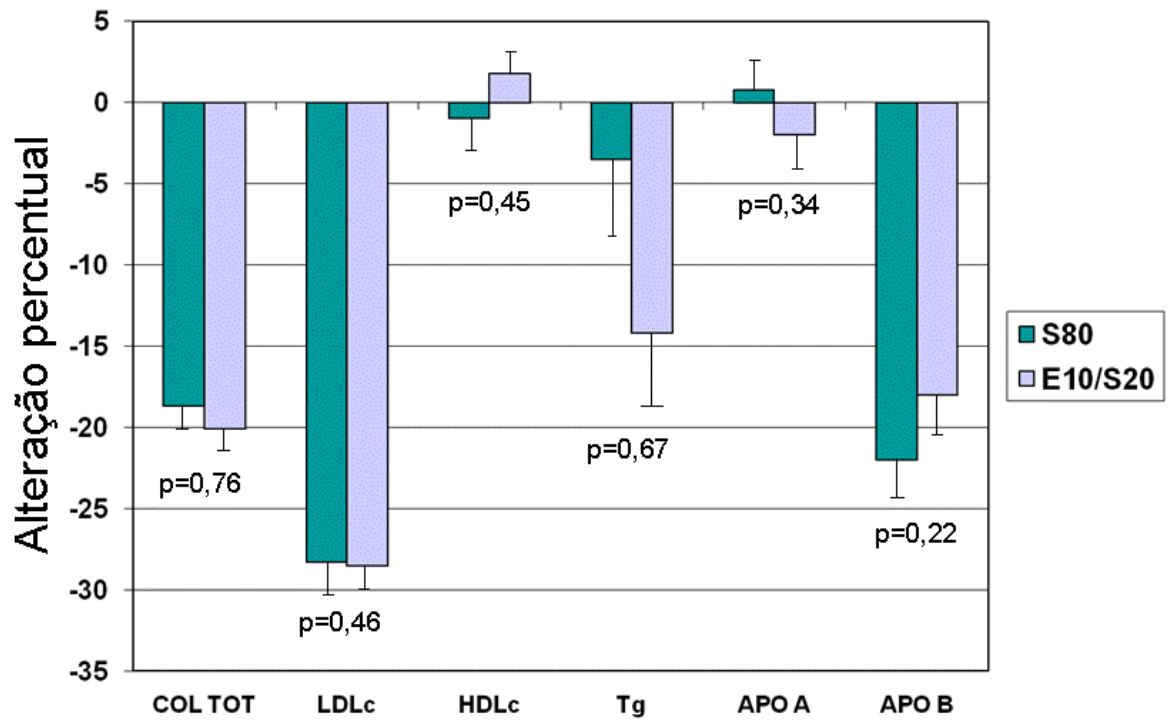


Figura 6. Comparação da alteração percentual do perfil lipídico entre os grupos. Observam-se reduções significativas e similares entre os grupos do colesterol total, LDL-C e Apo B. Os Tg foram reduzidos significativamente apenas no grupo E10/S20, mas não houve diferença estatística entre os grupos. As barras representam o erro padrão da média. S80: sinvastatina 80 mg; E10/S20: ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg; COL TOT: colesterol total; LDLc: colesterol LDL; HDLc: colesterol HDL; Tg: Triglicérides; Apo: apolipoproteína.

Tabela 5: Comparação do perfil lipídico entre o início e após seis semanas de tratamento nos pacientes que terminaram o estudo

	Sinvastatina 80 mg (S80) (n=38)	Ezetimiba 10/ sinvastatina 20 mg (E10/S20) (n=40)	p: valores basais
Colesterol mg/dL	Total,		
Pré-tratamento	170 (155-212)	175 (157 - 195)	0,74
Pós-tratamento	143 (117 - 160)	143 (127-157)	
p: pós vs pré	<0,01	<0,01	
LDL-C, mg/dL			
Pré-tratamento	101 (85 - 130)	99 (89 - 117)	0,83
Pós-tratamento	76 (61 - 90)	72 (62 - 80)	
p: pós vs pré	<0,01	<0,01	
HDL-C, mg/dL			
Pré-tratamento	45 (38 - 50)	42 (37 - 48)	0,87
Pós-tratamento	42 (38 - 48)	43 (38 - 49)	
p: pós vs pré	0,16	0,38	
Tg, mg/dL			
Pré-tratamento	117 (85 - 150)	139 (108 - 168)	0,07
Pós-tratamento	104 (91 - 127)	112 (77 - 149)	
p: pós vs pré	0,07	0,01	
Apo-A, mg/dL			
Pré-tratamento	1,6 (1,4 - 1,7)	1,6 (1,4 - 1,7)	0,26
Pós-tratamento	1,58 (1,4 - 1,7)	1,5 (1,4 - 1,7)	
p: pós vs pré	0,97	0,17	
Apo-B, mg/dL			
Pré-tratamento	0,9 (0,7 - 1,0)	0,7 (0,6 - 0,8)	0,58
Pós-tratamento	0,7 (0,6 - 0,8)	0,9 (0,7 - 1,0)	
p: pós vs pré	<0,01	<0,01	

Valores expressos em média \pm DP ou mediana (p 25-75), LDL-C: colesterol LDL; HDL-C: colesterol HDL; Hb glicada: Hemoglobina glicada; LDL-C: colesterol LDL; HDL-C: colesterol HDL; Apo: apolipoproteína.

4.3. Marcadores inflamatórios e CEPs

Analisamos os marcadores PCR, IL-6, IL-1 β , IL-10, sCD-40L, MCP-1, sICAM-1 e LDLox (Tabela 6, Figura 7). Observamos nos grupos S80 e E10/S20, respectivamente: (1) uma redução significativa e similar de LDLox ($18 \pm 47\%$ vs $15 \pm 33\%$; $p=0,65$); (2) discreto incremento de sICAM-1 ($10 \pm 14\%$ vs $10 \pm 16\%$; $p=0,95$); (3) discreta redução não significativa e similar da PCR (-16% [IIQ= -42 - 7, $p=0,1$] vs -11% [IIQ= -37 - 26, $p=0,5$], respectivamente; $p= 0,3$).

Em relação aos outros marcadores inflamatórios e às CEPs, verificamos que não se modificaram significativamente ao longo do tempo e que não apresentaram diferenças entre os dois grupos comparados. A IL-1 β e as CECs foram indetectáveis em ambos os grupos, antes e após o tratamento.

As análises de correlação demonstraram que a redução de PCR não se correlacionou com a redução de LDL-C ($r= 0,13$; $p=0,28$; Figura 8). A redução de LDLox correlacionou-se modestamente com a redução de LDL-C ($r= 0,27$; $p=0,02$; Figura 9).

Tabela 6. Comparação dos marcadores de atividade inflamatória, PFA-100 e CEPs, entre o início e após seis semanas de tratamento em pacientes que terminaram o estudo.

	Sinvastatina 80 mg (S80) (n=38)	Ezetimiba 10/ sinvastatina 20 mg (E10/S20) (n=40)	p: valores basais
PCR, mg/L			
Pré-tratamento	2,3 (0,7 - 5,5)	1,7 (0,72 - 3,65)	0,27
Pós-tratamento	1,8 (0,5 - 4,1)	1,27 (0,8 - 3,7)	
p: pós vs pré	0,1	0,5	
IL-6, pg/mL			
Pré-tratamento	2,9 (2,0 - 4,3)	2,1 (2,0 - 3,5)	0,18
Pós-tratamento	2,3 (2,0 - 4,2)	2,0 (2,0 - 4,3)	
p: pós vs pré	0,55	0,23	
IL-10, pg/mL			
Pré-tratamento	5,3 (4,0 - 9,3)	4,5 (3,5 - 5,8)	0,10
Pós-tratamento	5,0 (3,7 - 7,2)	5,6 (3,9 - 7,2)	
p: pós vs pré	0,11	0,23	
sCD-40L, pg/ml			
Pré-tratamento	10,8 (8,9 - 15,5)	11,0 (9,5 - 15,1)	0,63
Pós-tratamento	10,8 (8,6 - 14,8)	11,2 (9,4 - 16,4)	
p: pós vs pré	0,53	0,56	
sICAM-1, pg/mL			
Pré-tratamento	443 (419 - 471)	456 (343 - 519)	0,75
Pós-tratamento	465 (429 - 543)	441 (402 - 535)	
p: pós vs pré	0,01	0,01	
MCP-1, pg/mL			
Pré-tratamento	230 (190 - 170)	200 (175 - 295)	0,52
Pós-tratamento	240 (185 - 275)	235 (190 - 285)	
p: pós vs pré	0,47	0,11	
LDLox, ui			
Pré-tratamento	75 (54 - 99)	67 (54 - 100)	0,93
Pós-tratamento	55 (37 - 76)	58 (38 - 83)	
p: pós vs pré	<0,01	<0,01	
PFA-100, segundos			
Pré-tratamento	131 (94 - 204)	145 (103 - 191)	0,83

Pós-tratamento	145 (89 - 198)	171 (122 - 244)	
p: pós vs pré	0,9	<0,01	
CPE/10⁴ células			
Pré-tratamento	2,9 ± 1,8	2,7 ± 1,5	0,57
Pós-tratamento	2,4 ± 1,9	2,6 ± 2,3	
p: pós vs pré	0,18	0,78	
CPH/10⁴ células			
Pré-tratamento	1,8 ± 2,6	1,5 ± 1,2	0,67
Pós-tratamento	1,9 ± 1,9	2,2 ± 2,5	
p: pós vs pré	0,68	0,10	

Valores expressos em média ± DP ou mediana (p 25-75), PCR: Proteína C-reativa, IL: Interleucina; MCP: Proteína quimioatrativa de monócitos; sICAM-1: molécula de adesão intercelular solúvel-1; LDLox: Lipoproteína oxidada de baixa densidade, PFA-100 CT: Platelet function analyzer closure time; CPH: Células progenitoras hematopoiéticas; CPE: Células progenitoras endoteliais.

NOTA: IL-1 e Células endoteliais circulantes, indetectáveis antes e após tratamento nos dois grupos.

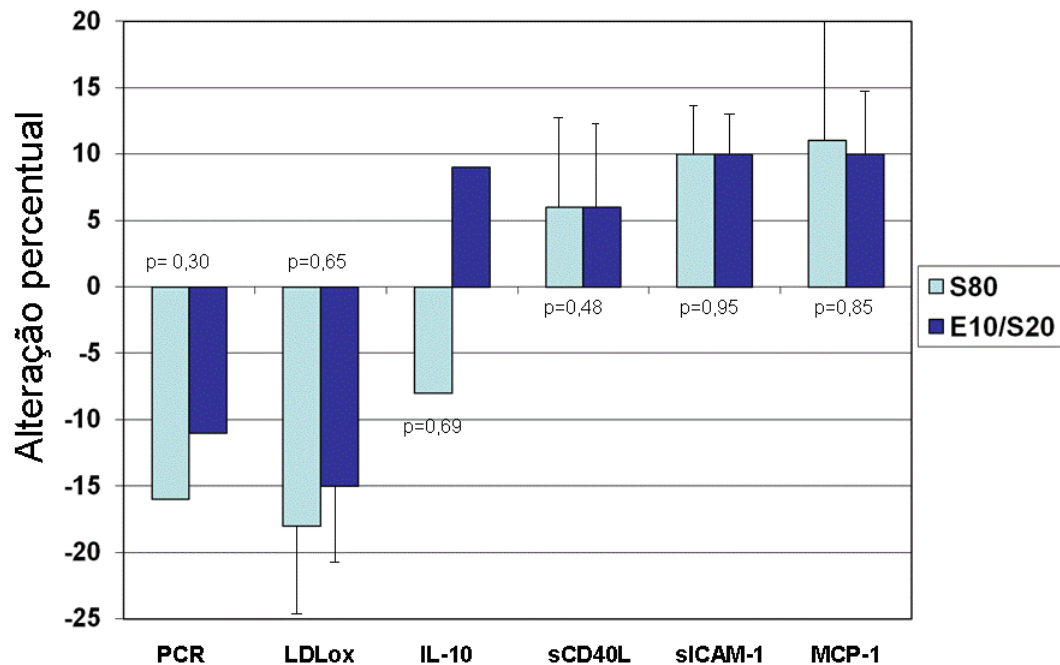


Figura 7. Alteração percentual dos marcadores inflamatórios. Observa-se redução significativa e similar do LDLox. A sICAM-1 elevou-se discretamente, de modo similar e significativo. O restante dos marcadores apresentados não apresentou alterações significativas. A interleucina-1 β foi indetectável e a -6 não apresentou alteração; ambas não estão representadas na figura. As barras representam o erro padrão da média (EP). O EP não foi demonstrado para PCR e IL-10, pois esses marcadores apresentaram distribuição acentuadamente assimétrica. S80: sinvastatina 80 mg; E10/S20: ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg; PCR: Proteína C-reativa; IL: Interleucina; sCD40L: CD-40 ligante solúvel; MCP-1: Proteína quimioatrativa de monócitos-1; sICAM-1: molécula de adesão intercelular-1 solúvel; LDLox: Lipoproteína oxidada de baixa densidade.

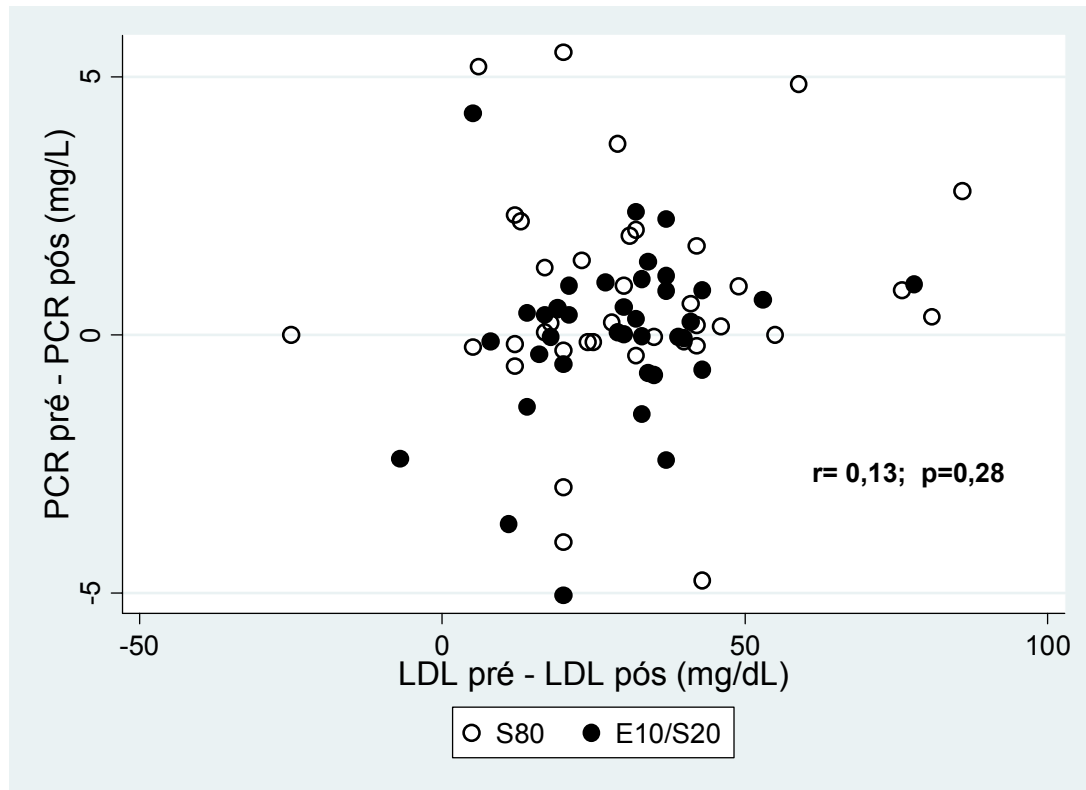


Figura 8. Correlação entre as reduções de proteína C-reativa (PCR) e LDL colesterol (LDL), antes e após tratamento com sinvastatina 80 mg (S80) e ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg (E10/S20).

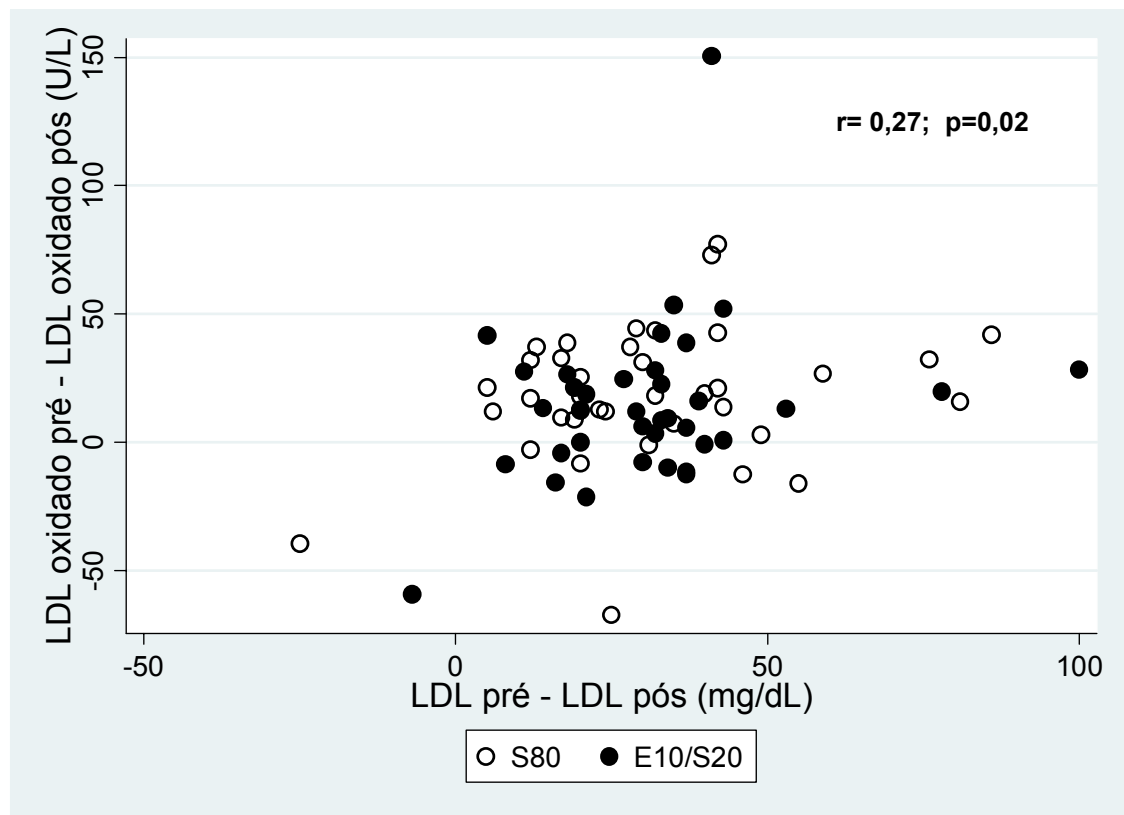


Figura 9. Correlação entre as reduções de LDL oxidado e LDL colesterol, antes e após tratamento com sinvastatina 80 mg (S80) e ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg (E10/S20).

4.4. Agregação plaquetária

Os níveis basais de PFA-100 foram similares em ambos os grupos (145 s vs 131 s, para E10/S20 e S80 respectivamente; $p=0,83$), apesar do uso de AAS em 95% dos pacientes (tabela 2). O PFA-100 (Figura 10) apresentou uma elevação mais expressiva com E10/S20 do que com S80 ($27 \pm 43\%$ vs $8 \pm 33\%$, $p=0,02$; respectivamente). As análises de correlação

demonstraram que o incremento de PFA-100 não se correlacionou com a redução de LDL-C ($r= 0,01$; $p=0,93$; Figura 11), mas sim, modestamente, com a redução de Tg ($r= 0,25$; $p=0,04$; Figura 12).

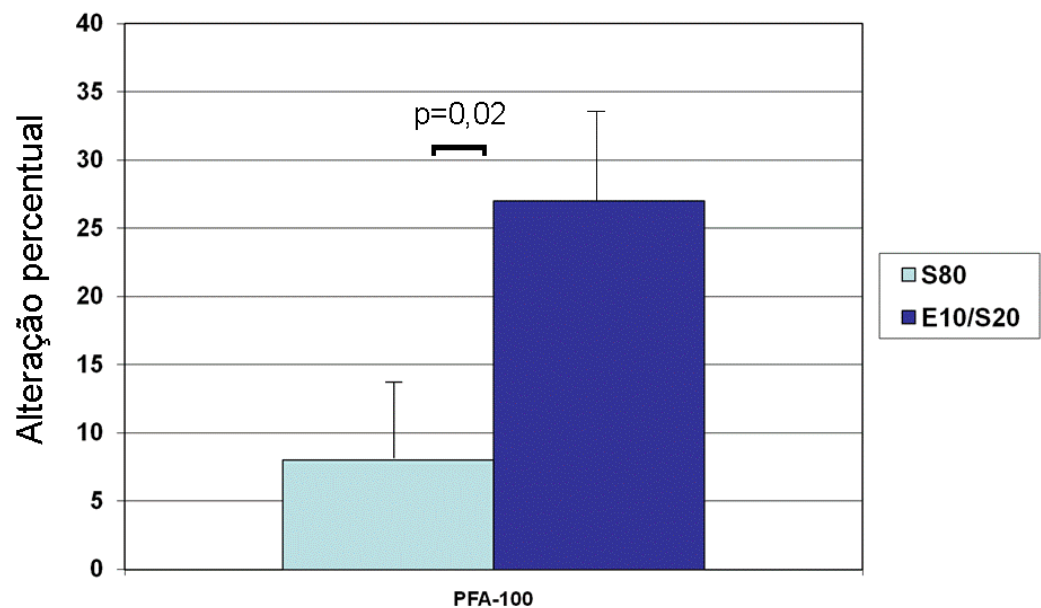


Figura 10. Alteração percentual do PFA-100. Observa-se incremento significativo do tempo de oclusão do PFA-100 no grupo E10/S20, superior ao do grupo S80, onde o incremento não foi significativo. Quanto maior o tempo do PFA-100, menor a velocidade da agregação plaquetária. S80: sinvastatina 80 mg; E10/S20: ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg; PFA: platelet function analyzer.

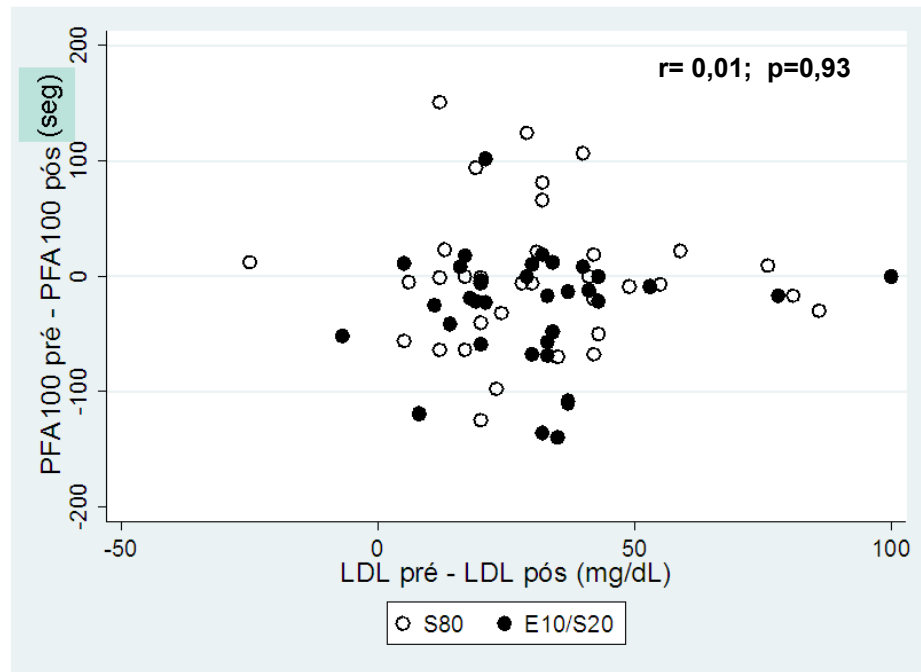


Figura 11. Correlação entre as alterações do tempo de oclusão do PFA-100 (segundos) e do LDL colesterol. PFA: platelet function analyzer; seg: segundos; LDL: LDL colesterol; S80: sinvastatina 80 mg; E10/S20: ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg

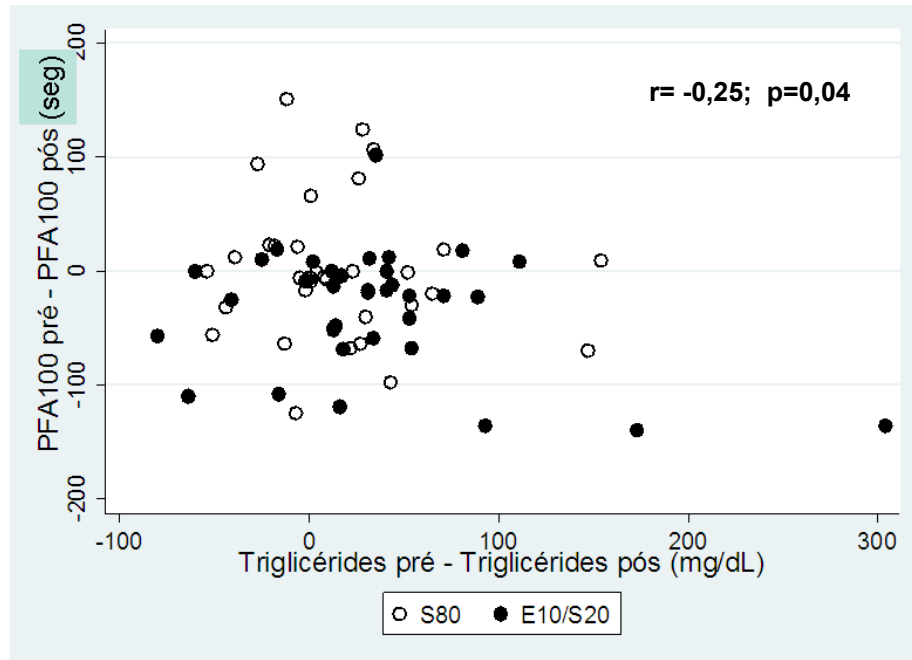


Figura 12. Correlação entre as alterações do tempo de oclusão do PFA-100 (segundos) e dos triglicérides. PFA: platelet function analyzer; seg: segundos; S80: sinvastatina 80 mg; E10/S20: ezetimiba 10 mg/sinvastatina 20 mg.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos gerais

Em nosso estudo destacamos três achados principais. Em pacientes com DAC estável, em uso de S20, e que possuíam LDL-C ao redor de 100 mg/dL, após 6 semanas de tratamento, S80 e E10/S20: (1) foram igualmente eficientes na redução adicional de LDL-C; (2) promoveram um incremento modesto e similar do efeito anti-inflamatório e (3) inibiram a agregação plaquetária de modo distinto, onde E10/S20 foi mais efetivo do que S80.

✓ ***Um estudo desenhado para avaliar efeitos pleiotrópicos***

Previamente, diversos investigadores observaram que os efeitos pleiotrópicos das estatinas ocorriam simultaneamente aos seus efeitos hipolipemiantes. Por isso, assegurar que os efeitos pleiotrópicos são completamente independentes da redução de LDL-C é uma tarefa desafiadora. O surgimento da ezetimiba, como alternativa às estatinas, permitiu que alguns autores comparassem doses hipolipemiantes equivalentes entre os dois fármacos, avaliando possíveis efeitos pleiotrópicos independentes da redução de colesterol.

Araújo et al¹¹⁸, por exemplo, avaliaram 23 pacientes dislipidêmicos submetidos a tratamento com S80 ou E10/S10. Os investigadores observaram reduções equivalentes de LDL-C e PCR nos dois grupos e demonstraram uma melhora da função endotelial (vasodilatação fluxo-mediada da artéria braqueal) de modo semelhante nas duas estratégias. Por outro lado, um outro estudo comparou S10 vs E10, em pacientes com insuficiência cardíaca¹⁰⁸, e evidenciou melhora da função endotelial com S10, mas não com E10, a despeito da redução semelhante de LDL-C nos dois grupos. Ainda mais, recentemente Liu et al¹¹⁹ compararam S40 e E10/S10 em 60 pacientes dislipidêmicos, sem uso prévio de estatina, e obtiveram maior redução da atividade da proteína *Rho quinase* e melhora da função endotelial com S40, a despeito de reduções semelhantes de LDL-C e PCR nos dois grupos.

Em nosso estudo, conforme o previsto, ambas as estratégias medicamentosas tiveram efeitos semelhantes sobre o colesterol. Particularmente o LDL-C, inicialmente semelhante nos dois grupos randomizados, apresentou redução equivalente entre as medicações ao final do tratamento. Isso nos permitiu concluir que possíveis diferenças entre os grupos nos desfechos estudados, fossem independentes da redução de LDL-C. Por outro lado, a ausência de diferença entre os grupos em relação à variação dos desfechos, indicaria que esse efeito previamente considerado pleiotrópico, possa estar intimamente relacionado à redução de colesterol, não caracterizando efeito específico de uma classe de fármacos.

5.2. Efeitos anti-inflamatórios da S80 e de E10/S20

Em relação aos marcadores inflamatórios estudados, notamos que os efeitos das duas estratégias foram semelhantes. Não houve efeito redutor de ambas as terapêuticas sobre IL-1 β , IL-6, MCP-1, sCD-40L, sICAM-1, ou mesmo elevação de IL-10 ao longo do tempo. Isso pode ter ocorrido pelas seguintes razões: (1) Os níveis basais de alguns desses marcadores não estavam elevados, o que indica que essa população não apresentava atividade inflamatória acentuada no momento da randomização. Essa hipótese poderia ser explicada pela estabilidade clínica dos pacientes, pelo tratamento adequado da DAC, hipertensão e diabetes, pelo uso prévio de sinvastatina 20 mg e pelo relativo baixo nível de LDL-C no momento da inclusão. De fato, os níveis basais de PCR em nossa população eram relativamente baixos, quando comparados a outros estudos. No estudo SANDS¹⁰⁶, por exemplo, após tratamento hipolipemiante intensivo (LDL-C < 70 mg/dL) em pacientes diabéticos, os níveis de PCR foram reduzidos em 25%, atingindo níveis semelhantes aos da nossa população, antes da randomização. (2) O tempo de tratamento pode não ter sido suficiente para detectarmos redução de alguns dos marcadores inflamatórios. (3) Alguns efeitos anti-inflamatórios da sinvastatina podem estar concentrados na dose de 20 mg. Eventualmente o incremento dessa dose não promoveria redução inflamatória adicional. Blanco-Colio et al⁷⁰, por exemplo, demonstraram que a redução de sICAM-1 por atorvastatina foi possível com a dose de 10 mg.

As doses crescentes, até 80 mg, não demonstraram qualquer efeito adicional. De modo semelhante, no *Aggrastat to Zocor (A to Z trial)*, De Lemos et al identificaram diferenças mínimas de MCP-1 entre os grupos S80 e S20⁷³. De fato, nossos achados a cerca da sICAM-1 confirmaram a ausência de redução do marcador com doses elevadas de estatina. Curiosamente, ambos os grupos apresentaram discreta elevação do marcador, o que em parte poderia ser explicado pela proximidade dos níveis séricos encontrados com níveis considerados normais pelo fabricante.

A análise da LDLox evidenciou que ambas as terapêuticas reduziram, igualmente e significativamente, seus níveis ao longo do tempo. O achado é original, já que não há evidência prévia na literatura sobre os efeitos da ezetimiba sobre o LDLox. A análise de correlação demonstrou modesta, mas significativa, correlação entre a redução de LDLox e de LDL-C na população geral. Desse modo, destaca-se que a redução da forma oxidada do LDL-C ocorre no tratamento hipolipemiante intensivo, independente da estratégia utilizada. O benefício ocorre mesmo em pacientes com LDL-C normal, que progredem para LDL-C muito baixo após tratamento hipolipemiante. Esse mecanismo poderia explicar parcialmente a redução de eventos cardiovasculares observada em estudos com altas doses de estatinas ou meta de LDL-C muito baixa^{7,8}.

Em relação à PCR, observamos uma redução modesta e não significativa do marcador, similar nos dois grupos. Como já descrito, a ausência de redução significativa poderia ser explicada pelos valores basais relativamente baixos, acrescidos do amplo IC do efeito redutor e do tamanho

da população estudada. Também não houve correlação entre as reduções de PCR e LDL-C. Por fim, a ausência de diferenças entre as duas estratégias no efeito terapêutico sobre a PCR coincide com resultados de um estudo recente com população mais ampla¹⁰⁶.

5.3. Efeitos antiplaquetários de S80 e E10/S20

Nosso estudo demonstrou que E10/S20 foi capaz de inibir a agregação plaquetária, o que não ocorreu com S80. Quando confrontadas, E10/S20 apresentou inibição plaquetária significativamente mais expressiva do que S80. Esse achado, inédito na literatura, não se correlaciona com mecanismos fisiopatológicos ou farmacodinâmicos previamente descritos.

5.3.1. Interação entre o colesterol e a atividade plaquetária

A elevação dos níveis de LDL-C podem aumentar a atividade plaquetária por diversos mecanismos, tais como: (1) elevação do conteúdo plaquetário de colesterol e alterações da fluidez da membrana plaquetária¹⁰²; (2) interação com receptores de LDL-C e HDL-C na membrana plaquetária, tais como os receptores de Apo-B100, Apo-E2, glicoproteínas IIb, IIIa e IV, com consequente sinalização intra-celular – ativação da *proteína quinase mitógeno-ativada p38*, levando a liberação de ácido araquidônico;

fosforilação da *quinase de adesão focal p125*, levando a alterações do citoesqueleto¹²⁰; (3) aumento da expressão de receptores de fibrinogênio na membrana plaquetária¹²⁰; (4) inibição dos canais de Na⁺/H⁺, com conseqüente acidificação relacionada a hiperreatividade plaquetária¹²¹, e (5) aumento do influxo de cálcio. De fato, os tratamentos hipolipemiantes, particularmente com estatinas, atuam nessas diversas vias reduzindo a atividade plaquetária¹²¹.

5.3.2. Efeitos pleiotrópicos das estatinas sobre plaquetas

Além dos mecanismos dependentes da redução lipídica, as estatinas exercem diversos efeitos pleiotrópicos relacionados à inibição da atividade plaquetária.

✓ *Proteínas Rho, Ras e óxido nítrico*

A redução da produção de mevalonato e isoprenóides pelas estatinas, leva a conseqüente inibição da isoprenilação de importantes proteínas sinalizadoras na plaqueta, como a Rho e a Ras, assim como a modulação da NAD(P)H oxidase e elevação de óxido nítrico²⁰. A inibição da Ras pode levar a modulação da expressão da glicoproteína IIb/IIIa, fundamental para agregação plaquetária. A inibição da Rho reduz a fosforilação da *miosina de cadeia leve*, com conseqüente alteração no citoesqueleto e na geometria plaquetária¹²⁰. A elevação de óxido nítrico, e

peroxinitrito, reduz a fosforilação de proteínas sinalizadoras com conseqüente redução da ativação plaquetária¹²².

✓ ***Inibição da ativação plaquetária por LDLox***

Entre os efeitos anti-inflamatórios das estatinas, destaca-se a inibição da oxidação de LDL-C, como descrito previamente. Além disso, estatinas reduzem a expressão de receptores de LDLox na membrana plaquetária, tais como o CD36 e o LOX-1 (*lectin-like oxidized LDL receptor-1*)¹²³. Essa inibição pode reduzir efeitos pró-agregantes do LDLox e de seu componente ativador de plaquetas, o ácido lisofosfatídico, tais como: ativação da via da proteína Rho, elevação do influxo de cálcio e ativação da calmodulina. Esses mecanismos contribuem para fosforilação da miosina de cadeia leve e para interação actina-miosina, fundamentais para as mudanças geométricas presentes na ativação plaquetária¹²⁰.

5.3.3. Evidências clínicas do efeito antiplaquetário das estatinas

Apesar dos múltiplos mecanismos antiplaquetários relacionados à redução de LDL-C e ao pleiotropismo das estatinas, as evidências clínicas do efeito antiplaquetário da redução lipídica com estatinas são controversas e baseiam-se em estudos pequenos^{28,105,110,111}. Mais notável, é a diversidade de métodos de avaliação plaquetária utilizados nesses estudos, frequentemente de uso experimental, trabalhosos e não aprovados para a

prática clínica. Ressalta-se que os métodos disponíveis não apresentam boa correlação entre eles, já que cada um avalia de modo particular, etapas distintas da agregação^{104,124}.

5.3.4. Avaliação da agregação plaquetária pelo PFA-100

Em nosso estudo, utilizamos o PFA-100, um método aprovado pelo *Federal Drug Administration*, facilmente reprodutível e não operador dependente, além de amplamente investigado¹²⁵. Ressaltamos que o PFA-100 apresenta sensibilidade de 95% e especificidade de 89% para avaliação de agregação plaquetária, quando comparado com a tradicional agregometria, que apresenta sensibilidade de 94% e especificidade de 88%¹²⁶. O PFA-100 é um método completamente automático, que inclui ativadores plaquetários diversos (ADP, epinefrina e colágeno), utiliza sangue sem preparo específico, e conta com a presença de forças de cisalhamento em seu dispositivo. Apesar dessas qualidades, não há consenso na literatura em relação ao melhor método de análise plaquetária, além de haver insuficiente correlação entre eles^{104,105}. Até o momento, nenhum deles foi estabelecido para a prática clínica ou para ajustes posológicos de antiagregantes.

Apesar do uso de AAS (100 mg/dia) em 95% da população avaliada, a mediana do PFA-100 basal estava dentro dos limites de normalidade em 56% dos pacientes. De fato, altas taxas de resistência ao AAS foram

descritas previamente^{23-25,104}, particularmente em pacientes utilizando baixas doses do fármaco¹²⁷.

5.3.5. Ação antiplaquetária da associação E10/S20

Nesse momento, não é possível determinar porque E10/S20 apresentou expressiva inibição plaquetária, ao contrário de S80. Porém, algumas hipóteses podem ser levantadas:

✓ *Efeito antiagregante de ezetimiba*

Ezetimiba pode ter efeitos pleiotrópicos antiagregantes desconhecidos até o momento. Apesar da redução sérica de colesterol ter sido semelhante nos dois grupos, pode haver diferenças no efeito desses fármacos sobre a interação plaqueta-colesterol (conteúdo plaquetário de colesterol, viscosidade da membrana plaquetária, intensidade da oxidação de LDL e afinidade de HDL-C e LDL-C por receptores da membrana plaquetária), o que sabidamente influencia a agregação plaquetária^{101-103,110}. Adicionalmente, existe a possibilidade de pleiotropismo da ezetimiba sobre a agregação plaquetária, aspecto ainda não elucidado na literatura. Ressaltamos que não houve correlação entre a redução de LDL-C e o incremento do PFA-100, sugerindo que mecanismos independentes da redução sérica de colesterol estejam envolvidos.

Hussein et al¹¹⁰ demonstraram que E10 reduziu a agregação plaquetária (agregometria óptica), a peroxidação de LDL-C e o conteúdo plaquetário de colesterol. A redução da agregação plaquetária se correlacionou diretamente com a redução do conteúdo plaquetário de colesterol, podendo ser esse, um dos mecanismos antiagregantes da ezetimiba.

Por outro lado, diferentemente de nossos resultados, Piorkowski et al¹¹¹ demonstraram que atorvastatina 40 mg promoveu efeito antiplaquetário (agregometria óptica), mais eficientemente do que a combinação E10/atorvastatina 10 mg, a despeito da redução similar de LDL-C. Entretanto, esses resultados não podem ser considerados definitivos em relação ao efeito da combinação ezetimiba/estatina sobre a agregação plaquetária, já que nesse estudo: (1) Uma pequena população foi avaliada, sendo que apenas 38 pacientes, dos 51 incluídos, foram submetidos à análise da agregação plaquetária; (2) Mais da metade dos pacientes foi incluída com atorvastatina 20 mg. Desse modo, houve uma avaliação do efeito de E10, na presença de uma subtração da dose de atorvastatina; (3) Os pacientes estavam em uso de AAS e clopidogrel, mas não está descrito se houve diferença no uso e nas doses dessas medicações entre os grupos; (4) Nenhum dos dois tratamentos reduziu a agregação plaquetária, quando estimulados por ADP. A inibição plaquetária de atorvastatina 40 mg ocorreu exclusivamente na presença do peptídeo ativador de trombina; (5) Finalmente, quando comparadas as reduções da agregação plaquetária entre os grupos, não houve diferença significativa.

Em suma, até o momento não há evidências suficientes para estabelecer a superioridade das estatinas ou de ezetimiba (associada ou não à estatina), a cerca da inibição plaquetária.

✓ ***Influência da redução de triglicérides pelo ezetimiba***

Houve redução significativa de Tg com E10/S20, mas não com S80. Eventualmente, interações entre Tg e plaquetas poderiam ocorrer: Kunes et al ¹²⁸ demonstraram que a redução de Tg por genfibrozil elevou a microviscosidade plaquetária e reduziu o cálcio intracelular em ratos. Subsequentemente, Karepov et al ¹²⁹ demonstraram que a hipertrigliceridemia reduz o efeito antiagregante do AAS. Curiosamente, em nosso estudo encontramos uma significativa correlação inversa, apesar de modesta, entre as alterações de Tg e PFA-100.

Desse modo, novos estudos são necessários para elucidar os reais mecanismos e efeitos de ezetimiba sobre a agregação plaquetária.

5.4. Células endoteliais progenitoras

Em relação às CEPs, não foi possível identificar mudanças significativas ao longo do tempo em nenhum dos tratamentos. Os níveis basais são comparáveis aos níveis descritos na literatura⁷⁰⁻⁷⁶. A ausência de impacto terapêutico sobre as CEPs pode estar relacionada a aspectos já comentados para outros marcadores: (1) Os pacientes, no momento da

inclusão, apresentavam baixo nível inflamatório; (2) A atuação anti-inflamatória de ambas as estratégias foi modesta para a maior parte dos marcadores; (3) Doses elevadas de estatina podem não ser superiores a baixas doses em relação à CEPs. De fato, Hristov et al⁹⁵ testaram diferentes doses de sinvastatina e observaram a elevação de CEPs com 10 mg da medicação mas não com 40 mg; (4) O tempo de seis semanas pode não ter sido suficiente para promover alteração nas CEPs. O mesmo autor citado demonstrou que esse efeito não ocorria no primeiro mês, mas estava presente após três meses de tratamento⁹⁵.

5.5. Implicações clínicas

Atualmente, são crescentes as evidências dos benefícios cardiovasculares relativos a metas de LDL-C muito baixo, em pacientes com DAC. Entretanto, existem diversas estratégias hipolipemiantes capazes de alcançar essas rigorosas metas. Dispomos de uma multiplicidade de tipos e doses de estatinas, todas capazes de reduzir intensamente o LDL-C. Além delas, a associação estatina/ezetimiba já se mostrou potente e segura. Em nosso estudo apontamos para os seguintes aspectos clínicos a cerca dessa associação: (1) Perdemos efeitos pleiotrópicos sobre inflamação ao optarmos pela associação de ezetimiba a uma dose moderada de sinvastatina, ao invés de quadruplicar essa dose da sinvastatina? Provavelmente não. Observamos que os efeitos anti-inflamatórios são

semelhantes nessas duas estratégias; (2) Os efeitos antiagregantes da sinvastatina em dose moderada poderiam ser perdidos nas doses elevadas? É possível. Observamos uma inibição plaquetária mais potente com E10/S20, do que com S80. A redução de LDL-C provavelmente contribuiu para essa inibição, mas como explicar a diferença entre os grupos? Seria um efeito pleiotrópico favorável da ezetimiba, ou a perda do efeito antiagregante da sinvastatina promovida pela elevação da dose utilizada? (3) Em nosso estudo, a redução de Tg ocorreu no grupo E10/S20, mas não no S80. Além disso, houve uma correlação modesta, mas significativa, da redução de TG, e não de LDL-C, com o incremento do PFA-100. Esses dados reforçam a importância do controle dos níveis de Tg no tratamento da doença aterotrombótica.

5.6. Limitações

A ampliação da população de nosso estudo poderia propiciar a confirmação de determinadas tendências identificadas, tais como a redução de PCR ou mesmo o incremento do PFA-100 por S80. Além disso, uma população maior atenuaria o comportamento acentuadamente variável da PCR. O fato de todos os pacientes incluídos no estudo utilizarem sinvastatina 20 mg previamente pode ter contribuído para os baixos níveis dos marcadores inflamatórios no início. A realização de *washout* da sinvastatina poderia ter sensibilizado a detecção de alterações nos

marcadores inflamatórios ao longo do tempo, o que elucidaria melhor o papel de cada dose do fármaco. Entretanto, após considerarmos diversos aspectos éticos, optamos por não realizar o *washout*, nessa população de alto risco cardiovascular. Esse estudo não foi duplo-cego, o que pode ter interferido, teoricamente, na atuação dos médicos e pacientes.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Em pacientes com DAC estável em uso prévio de S20, a comparação do incremento de sinvastatina para 80 mg com a associação E10/S20 demonstrou os seguintes achados: (1) A redução expressiva e equivalente de colesterol ocorreu em ambas as estratégias. (2) Os efeitos anti-inflamatórios foram modestos e similares nos dois grupos. Esses achados não caracterizaram efeito pleiotrópico da dose superior da sinvastatina sobre a inflamação. (3) A inibição plaquetária foi mais acentuada com E10/S20 do que com S80, a despeito das semelhanças da redução de LDL-C e dos efeitos anti-inflamatórios entre os grupos.

Novos estudos são necessários para elucidar mecanismos anti-aterotrombóticos das estratégias hipolipemiantes intensivas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Law MR, Wald NJ, Thompson SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ*. 1994;308(6925):367-72.
2. The investigation and management of stable angina. Report of a working party of the Joint Audit Committee of the British Cardiac Society and the Royal College of Physicians of London. *J R Coll Physicians Lond*. 1993;27(3):267-73.
3. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med*. 1998;339(19):1349-57.
4. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344(8934):1383-9.
5. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1001-9.

6. Gibbons RJ, Chatterjee K, Daley J, Douglas JS, Fihn SD, Gardin JM, et al. ACC/AHA/ACP-ASIM guidelines for the management of patients with chronic stable angina: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients With Chronic Stable Angina). *J Am Coll Cardiol.* 1999;33(7):2092-197.

7. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002;360(9326):7-22.

8. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, et al. Pravastatin or atorvastatin evaluation and infection therapy-thrombolysis in myocardial infarction 22 investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2004;350(15):1495-504.

9. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, et al. Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(3):720-32.

10. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88(suppl 1):S2-19.
11. Araújo RG, Casella Filho A, Chagas AC. Ezetimibe-pharmacokinetics and therapeutics. *Arq Bras Cardiol.* 2005;85(5):20-4.
12. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004;303(5661):1201-4.
13. Gagne C, Bays HE, Weiss SR, Mata P, Quinto K, Melino M, et al. Ezetimibe Study Group. Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2002;90(10):1084-91.
14. Sager PT, Melani L, Lipka L, Strony J, Yang B, Suresh R, et al. Ezetimibe Study Group. Effect of coadministration of ezetimibe and simvastatin on high-sensitivity C-reactive protein. *Am J Cardiol.* 2003;92(12):1414-8.
15. Ballantyne CM, Houry J, Notarbartolo A, Melani L, Lipka LJ, Suresh R, et al. Ezetimibe study group. Effect of ezetimibe coadministered with

atorvastatin in 628 patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. *Circulation*. 2003;107(19):2409-15.

16. Cannon CP, Giugliano RP, Blazing MA, Harrington RA, Peterson JL, Sisk CM, et al. IMPROVE-IT Investigators. Rationale and design of IMPROVE-IT (IMProved Reduction of Outcomes: Vytorin Efficacy International Trial): comparison of ezetimibe/simvastatin versus simvastatin monotherapy on cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 2008;156(5):826-32.

17. Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, et al. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1990;322(24):1700-7.

18. Packard CJ. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation*. 1998;97(15):1440-5.

19. Simes RJ, Marscher IC, Hunt D, Colquhoun D, Sullivan D, Stewart RA, et al. On behalf of the LIPID study investigators: Relationship between lipid levels and clinical outcomes in the Long-term Intervention with Pravastatin in

Ischemia Disease (LIPID) Trial. To what extent is the reduction in coronary events with pravastatin explained by on study lipid levels? *Circulation*. 2002;105(10):1162-9.

20. Davignon J. Beneficial Cardiovascular Pleiotropic Effects of Statins. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):39-43.

21. Antiplatelet Trialists Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy, I: prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ*. 1994;308(6921):81-106.

22. Juul-Moller S, Edvardsson N, Jahnmatz B, Rosen A, Sorensen S, Omblus R. Double-blind trial of aspirin in primary prevention of myocardial infarction in patients with stable chronic angina pectoris. The Swedish Angina Pectoris Aspirin Trial (SAPAT) Group. *Lancet*. 1992;340(8833):1421-5.

23. Coma-Canella I, Velasco A, Castano S. Prevalence of aspirin resistance measured by PFA-100. *Int J Cardiol*. 2005;101(1):71-6.

24. Gum PA, Kottke-Marchant R, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2001;88(3):230-5.

25. Ferguson AD, Dokainish H, Lakkis N. Aspirin and clopidogrel response variability: review of the published literature. *Tex Heart Inst J*. 2008;35(3):313-20.
- 26 Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(6):961-5.
- 27 Angiolillo DJ, Bernardo E, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Costa MA, Palazuelos J, Hernández-Antolin R, et al. Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(16):1541-7.
28. Tirnaksiz E, Pamukcu B, Oflaz H, Nisanci Y. Effect of high dose statin therapy on platelet function; statins reduce aspirin-resistant platelet aggregation in patients with coronary heart disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2009;27(1):24-8.
29. Shaw SM, Fildes JE, Yonan N, Williams SG. Pleiotropic effects and cholesterol-lowering therapy. *Cardiology*. 2009;112(1):4-12.

30. Fenton JW 2nd, Brezniak DV, Ofosu FA, Shen GX, Jacobson JR, Garcia JG. Statins and thrombin. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2005;5(2):115-20.
31. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis.* 2000;148(2): 209-14.
- 32 . Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ. Res.* 2001;89(9):763-71.
33. Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am J Cardiol.* 1999;84(9):1018-22.
34. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347(20):1557-65.
35. Ridker PM, Rifai N, Clearfield M, Downs JR, Weis SE, Miles JS, et al. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study Investigators. Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events. *N Engl J Med.* 2001;(26)344:1959-65.

36. Anand SS, Razak F, Yi Q, Davis B, Jacobs R, Vuksan V, et al. C-reactive protein as a screening test for cardiovascular risk in a multiethnic population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(8):1509-15.
37. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, et al; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 (PROVE IT-TIMI 22) Investigators. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med.* 2005;352(1):20-8.
38. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, et al. JUPITER Study Group. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.* 2008;359(21):2195-207.
39. Plenge JK, Hernandez TL, Weil KM, Poirier P, Grunwald GK, Marcovina SM, et al. Simvastatin lowers C-reactive protein within 14 days: an effect independent of low-density lipoprotein cholesterol reduction. *Circulation.* 2002;106(12):1447-52.
40. Sposito AC, Carvalho LS, Cintra RM, Araújo AL, Ono AH, Andrade JM, et al; on behalf of the Brasilia Heart Study Group. Rebound inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction after simvastatin withdrawal. *Atherosclerosis.* 2009. [Epub ahead of print]

41. Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC, et al. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis*. 2004;177(1):161-6.
42. Ridker PM, Rifai N, Stampfer J, Hennekens CH. Plasma Concentration of Interleucine-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101(15):1767-72.
43. Biasucci LM, Bittelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, et al. Elevated levels of interleucine-6 in unstable angina. *Circulation*. 1996;94(5):874-7.
44. Luo Y, Jiang D, Wen D, Yang J, Li L. Changes in serum interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with acute coronary syndrome and their responses to simvastatin. *Heart Vessels*. 2004;19(6):257-62.
45. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. Relationship between IL-6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA*. 2001;286(17):2107-13.

46. Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Muller MR, Husslein P, et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(7):1194-9.

47. Nawawi H, Osman NS, Yusoff K, Khalid BA. Reduction in serum levels of adhesion molecules, interleukin-6 and C-reactive protein following short-term low-dose atorvastatin treatment in patients with non-familial hypercholesterolemia. *Horm Metab Res.* 2003;35(8):479-85.

48. Marketou ME, Zacharis EA, Nikitovic D, Ganotakis ES, Parthenakis FI, Maliaraki N, et al. Early effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress and proinflammatory cytokines in hyperlipidemic subjects. *Angiology.* 2006;57(2):211-8.

49. Lewandowski M, Kornacewicz-Jach Z, Millo B, Zielonka J, Czechowska M, Kaliszczak R. The influence of low dose atorvastatin on inflammatory marker levels in patients with acute coronary syndrome and its potential clinical value. *Cardiol J.* 2008;15(4):357-64.

50. Meredith IT, Plunkett JC, Worthley SG, Hope SA, Cameron JD. Systemic inflammatory markers in acute coronary syndrome: association with

cardiovascular risk factors and effect of early lipid lowering. *Coron Artery Dis.* 2005;16(7):415-22.

51. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Leslie SJ, Sasiela WJ, et al. Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering Study Investigators. High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study. *Circulation.* 2003;108(13):1560-6.

52. Oka H, Ikeda S, Koga S, Miyahara Y, Kohno S. Atorvastatin induces associated reductions in platelet P-selectin, oxidized low-density lipoprotein, and interleukin-6 in patients with coronary artery diseases. *Heart Vessels.* 2008;23(4):249-56.

53. Apostolakis S, Vogiatzi K, Krambovitis E, Spandidos DA. IL-1 cytokines in cardiovascular disease: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2008;6(2):150-8.

54. Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK, et al. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1996; 97(9):2130-8.

55. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 1991;147(11):3815-22.
56. Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T, Hagenbaugh A, Territo M, Berliner JA, et al. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.19, n.12, Dec, p.2847-53, 1999.
57. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, et al. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;107:(16):2109-14.
58. Tekin A, Sezgin N, Katircibaşı MT, Tekin G, Cölkesen Y, Sezgin AT, et al. Short-term effects of fluvastatin therapy on plasma interleukin-10 levels in patients with chronic heart failure. *Coron Artery Dis*. 2008;19(7):513-9.
59. Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M, Daemen M. CD-40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;17(4):118-23.
60. Freedman JE. CD-40-CD-40L and platelet function: beyond hemostasis. *Circ Res*. 2003;92(9):944-6.
61. Türk U, Alioğlu E, Tengiz I, Ercan E, Mahmudov R, Duygu H, et al.

Statin use is associated with decreased CD-40 ligand expression on T lymphocytes of coronary atheroma plaque in patients with stable coronary artery disease. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2008;8(2):99-103.

62. O'Brien KD, Mc Donald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation.* 1996; 93(4): 672-82.

63. Ridker PM, Hennekens CH, Johnson BR, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet.* 1998; 351(9096):88-92.

64. Ray KK, Morrow DA, Shui A, Rifai N, Cannon CP. Relation between soluble intercellular adhesion molecule-1, statin therapy, and long-term risk of clinical cardiovascular events in patients with previous acute coronary syndrome (from PROVE IT-TIMI 22). *Am J Cardiol.* 2006;98(7):861-5.

65. Serrano CV Jr, Yoshida VM, Venturinelli ML, D'Amico E, Monteiro HP, Ramires JA, et al. Effect of simvastatin on monocyte adhesion molecule expression in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2001;157(2):505-12.

66. Serrano CV Jr, Pesaro AE, de Lemos JA, Rached F, Segre CA, Gomes F, et al. Native LDL-cholesterol mediated monocyte adhesion molecule overexpression is blocked by simvastatin. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009;23(3):215-20.

67. Hjelstuen A, Anderssen SA, Holme I, Seljeflot I, Klemsdal TO. Effect of lifestyle and/or statin treatment on soluble markers of atherosclerosis in hypertensives. *Scand Cardiovasc J.* 2007;41(5):313-20.

68. Rosenson RS, Wolff D, Tangney CC. Statins reduce oxidized low-density lipoprotein levels, but do not alter soluble intercellular cell-adhesion molecule-1 and vascular cell-adhesion molecule-1 levels in subjects with hypercholesterolaemia. *Clin Sci.* 2004;106(2):215-7.

69. Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schernthaner GH, Maca T, Kress HG, et al. Simvastatin reduces the expression of adhesion molecules in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(3):397-403.

70. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, de Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, et al. ACTFAST investigators. Elevated ICAM-1 and MCP-1 plasma levels in subjects at high cardiovascular risk are diminished by atorvastatin treatment. *Atorvastatin on Inflammatory Markers study: a*

substudy of Achieve Cholesterol Targets Fast with Atorvastatin Stratified Titration. *Am Heart J.* 2007;153(5):881-8.

71. de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;107(5):690-5.

72. Deo R, Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Neto MJP, Morrow DA, et al. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(9):1812-8.

73. de Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, Jarolim P, Wiviott SD, Sabatine MS, et al. Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(22):2117-24.

74. Berliner JA, Watson AD. A Role for Oxidized Phospholipids in Atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2005;353(1):9-11

75. Nishi K, Itabe H, Uno M, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(10):1649-54.
76. Tsimikas S, Witztum JL. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation.* 2001;103(15):1930-2.
77. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001;103(15):1955-60.
78. 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;41(3):360-70.
79. Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, McConnell JP, Lennon RJ, Kornman KS, et al. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;353(1):46-57.
80. Divchev D, Grothusen C, Luchtefeld M, Thoenes M, Onono F, Koch R, et al. Impact of a combined treatment of angiotensin II type 1 receptor blockade and 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-reductase inhibition on secretory

phospholipase A2-type IIA and low density lipoprotein oxidation in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2008;29(16):1956-65.

81. Paniagua JA, López-Miranda J, Pérez-Martínez P, Marín C, Vida JM, Fuentes F, et al. Oxidized-LDL levels are changed during short-term serum glucose variations and lowered with statin treatment in early Type 2 diabetes: a study of endothelial function and microalbuminuria. *Diabet Med.* 2005;22(12):1647-56.

82. Ky B, Burke A, Tsimikas S, Wolfe ML, Tadesse MG, Szapary PO, et al. The influence of pravastatin and atorvastatin on markers of oxidative stress in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(17):1653-62.

83. Mulder DJ, van Haelst PL, Wobbes MH, Gans RO, Zijlstra F, May JF, et al. The effect of aggressive versus conventional lipid-lowering therapy on markers of inflammatory and oxidative stress. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2007;21(2):91-7.

84. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103(9):1231-6.

85. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6(4):389-395.

86. Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, et al. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30(8):967-72.
87. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, AdLer K, Urbich C, Martin H, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89(1):E1-E7.
88. Hill JM, Zalos G, Halcox J, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348(7):593-600.
89. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*. 2005;353(10):999-1007.
90. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005;111(22):2981-7.

91. Dirk W, Dimmeler S, Zeiher A. Effects of statins on endothelium and endothelial progenitor cell recruitment. *Semin Vasc Med.* 2004;4(4):385-93.
92. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest.* 2001;108(3):391-7.
93. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow—derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest.* 2001;108(3):399-405.
94. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103(24):2885-90.
95. Hristov M, Fach C, Becker C, Heussen N, Liehn EA, Blindt R, et al. Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment. *Atherosclerosis.* 2007;192(2):413-20.
96. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(7):407-13.

97. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(9):665-70.
98. Dangas G, Smith DA, Unger AH, Shao JH, Meraj P, Fier C, et al. Pravastatin: an antithrombotic effect independent of the cholesterol-lowering effect. *Thromb Haemost*. 2000;83(5): 688-92.
99. Szczeklik A, Musial J, Undas A, Gajewski P, Góra P, Swadźba J, et al. Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33(5):1286-93.
100. Ma LP, Nie DN, Hsu SX, Yin SM, Xu LZ, Nunes JV, et al. Inhibition of platelet aggregation and expression of α granule membrane protein 140 and thromboxane B2 with pravastatin therapy for hypercholesterolemia. *J Assoc Acad Minor Phys*. 2002;13(1) 23-6.
101. Koller E. Lipoprotein-binding proteins in the human platelet plasma membrane. *FEBS Lett*. 1986;200(1):97-102.
102. Vlasova II. The effect of oxidatively modified low-density lipoproteins on platelet aggregability and membrane fluidity. *Platelets*. 2000;11(7):406-14.

103. Hochgraf E, Levy Y, Aviram M, Brook JG, Cogan U. Lovastatin decreases plasma and platelet cholesterol level and normalizes elevated platelet fluidity and aggregation in hypercholesterolemic patients. *Metabolism*. 1994;43(1):11-7.

104. Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2007;28(14):1702-8.

105. Malmström RE, Settergren M, Böhm F, Pernow J, Hjemdahl P. No effect of lipid lowering on platelet activity in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Thromb Haemost*. 2009;101(1):157-64.

106. Fleg JL, Mete M, Howard BV, Umans JG, Roman MJ, Ratner RE, et al. Effect of statins alone versus statins plus ezetimibe on carotid atherosclerosis in type 2 diabetes: the SANDS (Stop Atherosclerosis in Native Diabetics Study) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(25):2198-205.

107. Alvarez-Sala LA, Cachafeiro V, Masana L, Suarez C, Pinilla B, Plana N, et al. Effects of fluvastatin extended-release (80 mg) alone and in combination with ezetimibe (10 mg) on low-density lipoprotein cholesterol

and inflammatory parameters in patients with primary hypercholesterolemia: A 12-week, multicenter, randomized, open-label, parallel-group study. *Clin Ther.* 2008;30(1):84-97.

108. Landmesser U, Bahlmann F, Mueller M, Spiekermann S, Kirchhoff N, Schulz S, et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. *Circulation.* 2005;111(18):2356-63.

109. Westerweel PE, Visseren FL, Hajer GR, Olijhoek JK, Hoefer IE, de Bree P, et al. Endothelial progenitor cell levels in obese men with the metabolic syndrome and the effect of simvastatin monotherapy vs. simvastatin/ezetimibe combination therapy. *Eur Heart J.* 2008;29(22):2808-17.

110. Hussein O, Minasian L, Itzkovich Y, Shestatski K, Solomon L, Zidan J. Ezetimibe's effect on platelet aggregation and LDL tendency to peroxidation in hypercholesterolaemia as monotherapy or in addition to simvastatin. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65(5):637-45.

111. Piorkowski M, Fischer S, Stellbaum C, Jaster M, Martus P, Morguet AJ, et al. Treatment with ezetimibe plus low-dose atorvastatin compared with higher-dose atorvastatin alone: is sufficient cholesterol-lowering enough to inhibit platelets? *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(10):1035-42.

112. Harrison P, Frelinger AL 3rd, Furman MI, Michelson AD. Michelson, Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thrombos Res.* 2007;120(3):323-36.
113. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, Vermeylen J, Cerletti C, de Gaetano G. Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100: a systematic review. *Thromb Haemost.* 2008;99(1):14-26.
114. Sestito A, Sciahbasi R, Landolfi A, Maseri A, Lanza GA, Andreotti F. A simple assay for platelet-mediated hemostasis in flowing whole blood (PFA-100): reproducibility and effects of sex and age. *Cardiologia.* 1999;44(7):661-6.
115. Rosner B. *Fundamentals of Biostatistics.* Second ed. Boston: PWS Publishers;1986.
116. Timm NH. *Multivariate Analysis with Applications in Educations and Psychology.* Monterrey: CA Brooks/Cole; 1975.
117. Ceriello A, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Piconi L, Quagliaro L, et al. Effect of atorvastatin and irbesartan, alone and in combination, on

postprandial endothelial dysfunction, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic patients. *Circulation*. 2005;111(19):2518-24.

118. Araújo DB, Bertolami MC, Ferreira WP, Abdalla DS, Faludi AA, Nakamura Y, et al. Pleiotropic effects with equivalent LDL-cholesterol reduction: comparative study between simvastatin and simvastatin/ezetimibe co-administration. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009. [Epub ahead of print]

119. Liu PY, Liu YW, Lin LJ, Chen JH, Liao JK. Evidence for statin pleiotropy in humans: differential effects of statins and ezetimibe on rho-associated coiled-coil containing protein kinase activity, endothelial function, and inflammation. *Circulation*. 2009;119(1):131-8.

120. Relou IA, Hackeng CM, Akkerman JW, Malle E. Low-density lipoprotein and its effect on human blood platelets. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(5):961-71.

121. Puccetti L, Pasqui AL, Auteri A, Bruni F. Mechanisms for antiplatelet action of statins. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2005;5(2):121-6.

122. Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, et al. Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(4):901-8.

123. Puccetti L, Sawamura T, Pasqui AL, Pastorelli M, Auteri A, Bruni F. Atorvastatin reduces platelet-oxidized-LDL receptor expression in hypercholesterolaemic patients. *Eur J Clin Invest.* 2005;35(1):47-51.
124. Lordkipanidzé M, Pharand C, Nguyen TA, Schampaert E, Palisaitis DA, Diodati JG. Comparison of four tests to assess inhibition of platelet function by clopidogrel in stable coronary artery disease patients. *Eur Heart J.* 2008;29(23):2877-85.
125. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol.* 2009;103(3 Suppl):20A-26A.
126. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, et al. PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost.* 1998;24(2):195-202.
127. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, et al. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation.* 2007;115(25):3156-64.
128. Kunes J, Devynck MA, Zicha J. Chronic changes in plasma triglyceride levels do modify platelet membrane microviscosity in rats. *Life Sci.* 2000;67(8):959-67.

129 Karepov VG. Aspirin resistance, hyperlipidemia and secondary stroke prevention. *Int J Stroke*. 2006;1(suppl 1):72-3.