

CAPACIDADE PREDITIVA DA RELAÇÃO NEUTRÓFILO
LINFÓCITO COMO MARCADOR DE RISCO CARDIOVASCULAR
EM PACIENTES ASSINTOMÁTICOS

Dissertação

Angélica Oliveira de Almeida

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**CAPACIDADE PREDITIVA DA RELAÇÃO NEUTRÓFILO
LINFÓCITO COMO MARCADOR DE RISCO CARDIOVASCULAR
EM PACIENTES ASSINTOMÁTICOS**

Autor: Angélica Oliveira de Almeida, MD

Orientador: Emilio Hideyuki Moriguchi, MD, PhD

Coorientador: Anderson Donelli da Silveira, MD, PhD

*Dissertação submetida como requisito
para obtenção do grau de Mestre ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, Área de Concentração:
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares,
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul.*

Veranópolis, 2020.

Agradecimentos

À nutricionista doutora Neide Maria Bruscatto, por ter sido uma grande incentivadora e apoiadora, tendo desempenhado papel central na realização de cada etapa desta pesquisa, sempre presente e disponível, sem a qual esta dissertação não se tornaria realidade.

Ao meu orientador professor doutor Emílio Moriguchi, minha gratidão por ser um exemplo de profissionalismo, de excelência e simplicidade. Por nos mostrar que é possível fazer pesquisa e ciência numa cidade de pequeno porte com qualidade e de relevância clínica, bem como por todo carinho que nutre pela nossa cidade.

Ao amigo e coorientador Doutor Anderson Donelli, que desempenhou este papel de orientação desde meus primeiros passos na cardiologia, sendo um exemplo muito além da esfera profissional, um exemplo de ser humano. Obrigada.

Ao meu noivo, Douglas Dal Más Freitas, por ter sido meu grande apoiador, completando comigo mais esta jornada. Obrigada por me amparar nos momentos em que acreditei não ser possível. Obrigada pelo incentivo.

Aos meu pais, Eliane e Wineton Almeida, por terem me ensinado desde cedo a importância do conhecimento, por terem me proporcionado chegar onde cheguei.

À Associação Veranense de Assistência Em Saúde (AVAES) e a Prefeitura Municipal de Veranópolis, obrigada pelo incentivo financeiro e logístico.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

SUMÁRIO:

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS-----	6
RESUMO-----	7
INTRODUÇÃO -----	9
REVISÃO DA LITERATURA-----	12
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS-----	22
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA-----	23
ARTIGO-----	30
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS-----	57

LISTA DE ABREVIATURAS

DAC – Doença arterial coronariana

DCV - Doenças cardiovasculares

AVE - Acidente vascular encefálico

ERF - Escore de Risco de Framingham

RNL - relação neutrófilo/linfócito

PCR-US – proteína C reativa ultrasensível

ECAC – Escore de cálcio arterial coronariano

FR – Fatores de risco

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

HDL-C – Colesterol da Lipoproteína de alta densidade

LDL-C – Colesterol da Lipoproteína de baixa densidade

RESUMO

A aterosclerose não é apenas uma lesão passiva causada pela deposição de lipídeos e outras substâncias nas paredes vasculares, mas sim um processo inflamatório ativo, no qual os neutrófilos exercem função primordial. A relação neutrófilo-linfócito (RNL) é um biomarcador inflamatório que está emergindo como um bom preditor de morte cardiovascular, infarto e doença arterial coronariana. Porém, no contexto de utilização como ferramenta de estratificação de risco na prevenção primária, os dados na literatura são ainda escassos. O objetivo deste estudo é avaliar se existe associação da RNL com escore de cálcio coronariano (ECAC) e com proteína C reativa ultrasensível (PCR-US), dois marcadores robustos e já consolidados em estimar risco cardiovascular em sujeitos assintomáticos. Realizamos um estudo de coorte contemporâneo unicêntrico com 125 homens, livres de doença cardiovascular, que foram estudados em dois momentos, basal e após seguimento médio de 7 anos. Realizamos avaliação clínica e laboratorial (incluindo PCR-US), bem como mensuração do ECAC através de tomografia computadorizada. A regressão logística multivariada revelou que existe associação significativa da RNL com a PCR-US ($p = 0,01$ basal e $p = 0,02$ seguimento), mas não com o ECAC. Portanto, a RNL, um simples marcador inflamatório, amplamente disponível, rotineiramente executado e de baixo custo, tem associação independente com PCR-US, tendo potencial de ser utilizado como marcador de risco cardiovascular em homens assintomáticos.

Palavras-chave: marcador de risco cardiovascular, relação neutrófilo linfócito, proteína C reativa ultrasensível, marcador de risco cardiovascular, relação neutrófilo linfócito, proteína C reativa ultrasensível, prevenção cardiovascular, avaliação de risco cardiovascular, prevenção primária.

ABSTRACT

Atherosclerosis is not just a passive lesion caused by deposition of lipids and other substances on the vascular walls, but an active inflammatory process, in which neutrophils play a key role. The neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) is an inflammatory biomarker that is emerging as a good predictor of cardiovascular disease. The purpose of this study was to determine whether there is an association between NLR and coronary calcium score (CCS) and between NLR and ultrasensitive C-reactive protein (usCRP), two robust markers that have already been consolidated in cardiovascular risk estimation. In a contemporary single-center cohort study, we studied 125 men free from cardiovascular disease at baseline and at 7 years of follow-up. We performed a medical evaluation, including measurement of glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, triglycerides, creatinine, blood count and usCRP, as well as CCS through computed tomography. Multivariate logistic regression revealed a significant association between NLR and usCRP ($P = 0.01$ baseline and $P = 0.02$ follow-up), but not between NLR and CCS. Therefore, NLR, a simple inflammatory marker whose testing is widely available, routine and low cost, has an independent association with usCRP, and can be used as a marker of cardiovascular risk in asymptomatic men.

Palavras-chave: cardiovascular biomarker, neutrophil-lymphocyte ratio, ultrasensitive C-reactive protein, cardiovascular prevention, cardiovascular risk assessment, primary prevention.

INTRODUÇÃO:

As doenças cardiovasculares (DCV) são a maior causa de morte no mundo, sendo responsáveis por cerca de 30% da mortalidade total. Estima-se que cerca de 200 milhões de pessoas apresentem anualmente manifestação clínica de doença arterial coronariana (DAC), doença cerebrovascular (AVE) ou outra doença vascular oclusiva. No Brasil, a prevalência atual de DAC é de cerca de 12% e os gastos com essa doença são elevados, sendo o custo anual estimado nos Estados Unidos da América em 190 bilhões de dólares (1). A incidência de morte por DCV persiste em franca ascensão em populações de nações em desenvolvimento. Entre esses países, até o ano 2040, o Brasil terá chegado ao maior índice de óbitos por DCV do mundo, superando países com maiores índices demográficos como a China e a Índia (2).

A principal causa da DAC é a aterosclerose. A aterosclerose é uma doença inflamatória em que mecanismos imunes interagem com fatores de risco metabólicos e genéticos para iniciar, propagar e ativar as lesões na árvore arterial de médio e grande calibre (3,4). Este é o resultado de uma interação complexa entre fatores de risco, exposições ambientais e suscetibilidade genética (5). A aterosclerose coronária inicia em uma fase subclínica e avança lentamente ao longo de anos antes do desenvolvimento de eventos clínicos cardiovasculares (6).

Para reduzir o ônus e a morbimortalidade da doença cardiovascular, um passo importante é definir medidas de prevenção primária na população aparentemente saudável, assintomática, mas em risco (7). Porém a diferenciação desses pacientes em maior risco é complexa e uma das maiores dificuldades na prática clínica. Estimar esse risco depende de uma somatória de fatores de risco adicionada ao sinergismo entre eles, de tal forma que estimando de maneira subjetiva temos uma baixa capacidade preditiva. Nesse

contexto, surgiram diversos algoritmos. Alguns dos mais utilizados são o ERF, o ASCVD plus do American College of Cardiology e o Escore de Risco Global da Sociedade Brasileira de Cardiologia (42).

Contudo, esses modelos tradicionais ainda tem suas limitações, sendo que quase metade dos indivíduos que desenvolvem doença cardiovascular tem apenas 1 ou nenhum desses fatores e são, portanto, classificados como baixo risco (7). Portanto, pesquisas têm explorado outros métodos discriminatórios que conferem capacidade preditiva adicional quando associados aos escores clínicos vigentes (8), como dosagem de peptídeo natriurético cerebral, troponina ultrasensível, calcificação da aorta torácica, avaliação de onda de pulso, relação neutrófilo-linfócito (RNL), dentre outros (9-13).

Entre esses, a proteína-C-reativa ultra-sensível (PCR-US) e o escore de calcificação das artérias coronárias (ECAC) são os mais estudados e consolidados, demonstrando associação com desfecho cardiovascular (14). A PCR-US pode ainda ser considerado como um biomarcador integrativo e indicador da carga inflamatória total do corpo, pois está correlacionado com muitos outros fatores de risco (FR) cardiovasculares que não estão contidos nos escores tradicionais. Assim, uma medida simples de PCR-US na definição de avaliação de risco cardiovascular pode fornecer uma visão mais abrangente do perfil de risco geral do paciente (15).

Já o ECAC, obtido através da tomografia computadorizada, é um marcador de aterosclerose subclínica que tem se mostrado efetivo em prever eventos cardiovasculares de forma independente com a capacidade de melhorar significativamente a acurácia preditora em relação a outros biomarcadores isolados ou combinados (16).

Ainda não tão bem estudado neste contexto de prevenção e estratificação, emerge o que pode ser um novo marcador de risco cardiovascular: a RNL. Consiste em uma razão simples do número absoluto de neutrófilos pelo número absoluto de linfócitos, obtidos através do diferencial de leucócitos do hemograma, sendo um marcador de inflamação, tal qual a PCR US, acredita-se. Sabemos que a aterosclerose não é uma lesão passiva, mas sim um processo inflamatório ativo no qual os neutrófilos exercem função

primordial (17). A RNL tem demonstrado ser preditora de mortalidade por todas as causas e também mortalidade cardiovascular em pacientes com síndrome coronariana aguda (18), DAC crônica (19), diabetes mellitus (20) e naqueles submetidos à cateterismo cardíaco (21). Porém, a maioria destes estudos se concentrou em mortalidade hospitalar ou a curto prazo e, todos, nesses contextos agudos e de DCV estabelecida.

Portanto, a despeito dos biomarcadores inflamatórios estarem sendo descritos já há muitas décadas, a RNL parece estar emergindo como um biomarcador com boa predição clínica imediata e prognóstica em casos de DAC aguda e crônica. Já seu papel em indivíduos assintomáticos, livres de DCV, ainda não foi explorado ao seu máximo valor preditivo (22,23).

Com base no exposto, a estratificação de risco mais acurada do paciente fornece uma visão prognóstica mais fidedigna, sendo capaz de mudar conduta clínica com início e/ou intensificação de tratamentos, prevenindo assim eventos futuros naqueles pacientes que estão realmente sob maior risco. Para este fim, dispomos de uma grande variedade de biomarcadores na cardiologia moderna e muitos ainda sendo estudados, sem papel consagrado. Como a inflamação está associada com o desenvolvimento e progressão de aterosclerose, hipotetiza-se que a RNL, um marcador inflamatório amplamente disponível, rotineiramente executado e de baixo custo pode ser utilizada como marcador de risco cardiovascular. Para isto, este estudo pretende avaliar a associação independente entre a RNL e o ECAC e entre a RNL e a PCR US, dois marcadores de risco cardiovascular já bem estabelecidos pelas diretrizes de estratificação de risco cardiovascular.

REVISÃO DA LITERATURA

A associação entre a RNL e a DCV não é totalmente definida e muitos processos têm sido postulados. Estudos recentes mostraram que a aterosclerose não é uma lesão passiva causada pela deposição de lipídeos e outras substâncias nas paredes vasculares, mas sim um processo inflamatório ativo, no qual os neutrófilos exercem função primordial. M. Drechsler *et al* demonstraram que estágios iniciais de aterosclerose estão vinculados a neutrofilia. Ocorre uma infiltração de neutrófilos na placa aterosclerótica que liberam substâncias pró-oxidantes e pró-trombóticas, levando ao dano endotelial e à agregação plaquetária, ativando uma cascata inflamatória que desempenha papel central no início e progressão de placas ateroscleróticas. (24). Então, acredita-se que os neutrófilos possam exercer efeitos pró-aterogênicos por meio de vários mecanismos diretos e parácrinos: produzem grandes quantidades de radicais livres de oxigênio que são secretados extracelularmente, sendo mediadores envolvidos na oxidação de partículas de lipoproteínas de baixa densidade. Essa infiltração de neutrófilos inclusive já foi demonstrada em estudos com modelos animais, sob visualização direta da placa. Além disso, os neutrófilos também desempenham papel importante na desestabilização de placas, o que pode gerar quadros de descompensação aguda da coronariopatia. A propensão à desestabilização da placa, por ruptura ou erosão, é indiretamente proporcional a sua capa fibrosa de colágeno, sendo maior a chance de ruptura quanto mais fina é esta capa. Os neutrófilos contêm grande quantidade de proteases degradantes dessa matriz, então através da liberação dessas enzimas proteolíticas e radicais superóxido, tornam a placa mais vulnerável, suscetível à ruptura levando a síndromes coronarianas agudas (25). Outras células também são implicadas nesse complexo processo da aterosclerose, mas acredita-se que o neutrófilo seja um dos principais mediadores. Acredita-se que após a migração para dentro da parede do vaso, os neutrófilos também exerçam seu efeito proinflamatório e aterogênico pela

interação com outros tipos celulares, como plaquetas, monócitos e macrófagos (26).

De fato, a inflamação desempenha um papel central na patogênese da aterosclerose e uma elevação dos marcadores inflamatórios indica a ativação de dano vascular. Wildman RP et al estudaram a presença dos marcadores inflamatórios em pacientes com doença arterial periférica, e observaram que os pacientes no quartil mais alto de PCR, de fibrinogênio e de contagem de leucócitos tiveram chances aproximadamente duas vezes maiores de ter doença arterial periférica do que aqueles no quartil mais baixo (17).

Neste mesmo sentido, existem muitos estudos que demonstram esse status inflamatório, pela alta RNL, em pacientes com os tradicionais fatores de risco para DAC como idade avançada, hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia (27), mesmo sem apresentarem DAC.

A idade foi um dos primeiros fatores de risco associados a risco cardiovascular, e Jian Li *et al* demonstraram que a RNL foi positivamente associada com a idade mais avançada, sendo quanto maior a idade maior a RNL ($r = 0,161$, $P < 0.001$, Pearson), e o grupo de pessoas acima dos 70 anos tinham a maior RNL e o grupo de pessoas abaixo de 20 anos a menor RNL ($p < 0,05$) (28).

Na hipertensão, o processo inflamatório vascular está no cerne da fisiopatologia da doença, embora os mecanismos ainda não sejam completamente elucidados. Acredita-se que a injúria, a ativação e disfunção endotelial sejam causadas pelo estresse oxidativo, levando a essa inflamação vascular e então se refletindo em uma alta RNL. Da mesma forma, com o tratamento anti-hipertensivo adequado, atingindo níveis desejáveis de pressão arterial temos melhora os desfechos cardiovasculares e paralelamente uma redução na RNL (29, 30, 31). Karaman M *et al* demonstraram que, em pacientes hipertensos, o controle da pressão arterial com valsartana ou anlodipina em 12 semanas reduziu significativamente a RNL ($p < 0,001$).

Nos diabéticos, acredita-se que uma RNL elevada tenha valor prognóstico. Lee G-K *et al* avaliaram a RNL em pacientes diabéticos pós infarto, e concluíram que os diabéticos possuem uma RNL significativamente

maior do que não diabéticos (5.2 ± 5.8 vs. 4.6 ± 5.4 , $p=0,007$), bem como que os diabéticos tiveram maior taxa de reinfarto e mortalidade em 1 ano (desfecho composto 28% vs. 16.6%, $p < 0.001$), mostrando que uma RNL aumentada no pós-infarto agudo do miocárdio (IAM) foi preditora independente de eventos cardiovasculares maiores em pacientes diabéticos. O diabetes representa um estado de função metabólica e imunológica alterada e nesse estudo os piores resultados em pacientes diabéticos pós-IAM podem estar relacionados às contribuições dos diferenciais de neutrófilos e linfócitos. Mecanismos que contribuem para a neutrofilia em indivíduos diabéticos incluem aumento do cortisol plasmático, leptina e insulina. Produtos finais de glicação avançada, radicais livres de oxigênio e outras citocinas podem desempenhar um papel na preparação dos neutrófilos. Esses neutrófilos ativados secretam muitos mediadores inflamatórios, contribuindo para o aumento dos níveis de estresse oxidativo, inflamação, necrose com conseqüente piora dos estados protrombóticos, disfunção endotelial, ruptura da placa e tamanho do infarto (32). Do mesmo modo, a RNL de pacientes diabéticos com complicações microvasculares é maior do que em pacientes diabéticos sem complicações. Ulu SM *et al* notaram que níveis de RNL dos diabéticos com retinopatia diabética foram maiores que os dos pacientes diabéticos sem retinopatia ($p < 0,001$). Além disso, os valores de RNL foram correlacionados com a presença ($r = 0,466$, $p < 0,001$) e também com os graus da retinopatia ($r = 0,630$, $p < 0,001$), mostrando que a RNL é um marcador confiável da presença e da gravidade da retinopatia nos pacientes diabéticos (33, 34).

Ainda neste contexto de fatores de risco, a HDL, que sabidamente tem uma ação anti-inflamatória e protetora cardiovascular, guarda uma correlação inversa com a RNL. A RNL é significativamente elevada em pacientes com baixo nível de colesterol HDL quando comparados com sujeitos com níveis normais ou altos (35). Ercan Varol *et al* avaliaram em um estudo de caso controle essa correlação, e demonstraram que a RNL foi significativamente maior entre os pacientes com baixo HDL quando comparados ao grupo controle (2.6 ± 0.8 vs 1.6 ± 0.4 , $p < 0,001$).

Além da RLN estar associada a todos esses fatores de risco que têm associação já bem estabelecida com DAC, ela também mostrou ser fortemente

relacionada a DAC propriamente dita, tendo valor preditivo e prognóstico, estando associada com a extensão e severidade da DAC (36). *Verdoia M et al* avaliaram 3738 pacientes submetidos a angiografia coronariana e demonstraram que a RNL estava diretamente relacionada tanto à prevalência de DAC ($p = 0,001$) quanto a gravidade da DAC ($p < 0,001$), já que uma alta RNL foi associada a doença multiarterial, ao grau de estenose coronariana, a calcificações cororárias e trombo intracoronariano ($p < 0,001$).

Já é bem documentado que a aterosclerose é a causa primária de DAC, e que o tipo da placa aterosclerótica impacta diretamente nos desfechos. De acordo com estudos pós morte, a ruptura de placas é responsável por 75% das síndromes coronarianas agudas (37), e sabe-se que as placas mais propensas a ruptura são as mistas e as não calcificadas. Um estudo realizado em Pequim, na China, observou 598 adultos com dor torácica que foram submetidos a angiotomografia de coronárias, e revelou que pacientes com placas mistas ou com placas não calcificadas tinham uma maior RNL quando comparados a pacientes com placas calcificadas ou sem placas ($p < 0,05$). Demonstraram também que pacientes com estenose coronariana maior que 50% tinham uma RNL mais elevada quando comparados com pacientes com estenoses não significativas ($p < 0,001$) (27). Neste mesmo sentido, *Yilmaz et al* avaliou o papel da RNL em pacientes com SCA e constatou um aumento da NLR em pacientes com trombo coronariano em comparação com pacientes sem trombo ($4,12 \pm 1,89$ vs $3,17 \pm 1,52$ $p < 0,001$) (38). *Ergelen et al* estudou uma coorte de 2410 pacientes com SCA com supradesnível de ST e evidenciou que uma RNL maior que 6,97 foi associada a uma maior mortalidade cardiovascular hospitalar (5% vs 1,4%, $p < 0,001$) e também a longo prazo (7% vs 4,8%, $p = 0,02$) (39). Portanto, todos esses estudos corroboram que a RNL pode ser um marcador tanto da presença quanto da gravidade da DAC, estando diretamente associada ao prognóstico e a piores desfechos.

Assim sendo, diante da complexidade dessa doença chamada aterosclerose, que impacta fortemente e diretamente a qualidade e quantidade de vida das pessoas do Brasil e do mundo, já que é a principal causa de morte, identificar os pacientes que irão desenvolver a doença e estarão em risco de desfechos desfavoráveis é crucial, já que permite instituir medidas preventivas

e, naqueles com a doença estabelecida, permite subestratificar os de maior risco para que os tratamentos sejam intensificados. Porém, na prática clínica, identificar corretamente esses sujeitos ainda hoje é um desafio.

A estimativa do risco de doença aterosclerótica resulta da somatória do risco associado a cada um dos fatores de risco que o paciente apresenta mais a potenciação causada pelo sinergismo entre esses fatores. Diante da complexidade destas interações, a atribuição intuitiva do risco frequentemente resulta em sub ou superestimação dos casos de maior ou menor risco, respectivamente. Para contornar esta dificuldade, diversos algoritmos têm sido propostos, baseados em análises de regressão de estudos populacionais, por meio dos quais a identificação do risco é substancialmente aprimorada. É nesse contexto que os escores de risco são utilizados, na tentativa de classificar corretamente os indivíduos assintomáticos em baixo, moderado e alto risco de eventos cardiovasculares. Um dos modelos mais utilizados é o Escore de Risco de Framingham (ERF), descrito por Wilson e cols. (40) e que leva em consideração variáveis clínicas e laboratoriais de fácil acesso, como idade, sexo, hipertensão, diabetes, hiperlipidemia e tabagismo (2). Contudo, esses modelos tradicionais ainda possuem limitações importantes em prever eventos, haja visto que quase metade dos indivíduos que desenvolvem doença cardiovascular tem apenas 1 ou nenhum desses fatores (7). Portanto, pesquisas têm explorado outros métodos para discriminar com maior precisão esses pacientes em risco, que se beneficiariam de medidas preventivas e/ou tratamentos mais intensivos (9).

A V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (41) recomenda a utilização de fatores agravantes do risco cardiovascular nos indivíduos de risco intermediário, onde a presença de pelo menos um dos seguintes fatores agravantes reclassifica o indivíduo para alto risco: História familiar de DAC prematura (parente de primeiro grau masculino < 55 anos ou feminino < 65 anos), critérios de síndrome metabólica de acordo com a International Diabetes Federation, microalbuminúria (30-300 µg/min) ou macroalbuminúria (> 300 µg/min), hipertrofia ventricular esquerda, PCR-US > 2 mg, espessura médio-intimal das carótidas > 1,0, ECAC > 100 ou > percentil 75 para idade e índice tornozelo-braquial < 0,9 . Recentemente uma atualização

da diretriz brasileira recomenda o uso de uma calculadora on line, chamada de Escore de Risco Global, que leva em conta diversos fatores clínicos, laboratoriais e de imagem para estimar o risco.

O American College of Cardiology/American Health Association lançou, em 2013, a Pooled Cohort Equation (PCE) para determinar o risco em 10 anos de desenvolver IAM não fatal, morte por doença coronariana e AVC fatal e não fatal. Este algoritmo foi atualizado em 2017 chegando na sua versão final, disponível on line e em aplicativos, com nome de ASCVD Plus (AtheroSclerotic CardioVascular Disease), sendo uma das ferramentas mais utilizadas atualmente para guiar as terapias e estimar o risco mais acuradamente (42).

Outros parâmetros, além dos citados acima, têm sido utilizados na predição de eventos cardiovasculares a curto e longo prazo, a saber: dosagem de peptídeo natriurético cerebral, troponina ultrasensível, dispersão do intervalo QT, calcificação da aorta torácica, avaliação de onda de pulso, dentre outros (9-13).

Entre todos os biomarcadores sanguíneos emergentes, o maior banco de dados existe para a PCR-US. Já em 1997, Ridker *et al.* demonstraram uma forte associação entre níveis elevados de PCR-US e desfecho cardiovascular, sendo o risco relativo de IAM futuro em sujeitos saudáveis aumentava 38% a cada aumento de quartil da PCR (95% CI, 19% to 61%; $p= 0,001$) (14). No entanto, alguns outros estudos, como Melander *et al.* sugeriram muito pouco valor incremental de qualquer biomarcador mais recente investigado, incluindo PCR-US (43). Seguiram-se inúmeros estudos epidemiológicos prospectivos bem controlados e a maioria reproduziu o achado inicial. No grande estudo ULSAM, os autores demonstraram que, mesmo na presença de outros biomarcadores robustos como troponina I, NT-pro-BNP e cistatina C, a PCR-US foi o melhor preditor independente de evento cardiovascular fatal e mortalidade total. Neste estudo, a PCR-US mostrou claramente um valor incremental sobre os escores baseados em fatores de risco tradicionais (44).

Outro estudo, de caso-controle, avaliou 2459 pacientes com história de IAM ou morte por doença coronariana e 3969 controles sem história de DAC, no seguimento médio de 18 anos demonstraram que pacientes com PCR no

terço superior ($> 2,0$ mg / L), quando comparados com os pacientes com PCR no terço inferior ($<0,78$ mg / L), apresentaram um risco significativamente maior de desenvolvendo DCV (OR 1,92) (45).

Assim, a PCR-US como preditora de eventos cardiovasculares possui um desempenho igual ou até melhor que os FR tradicionais. Com base nessa evidência, as diretrizes ACC/AHA de 2013 deram à PCR-US uma indicação classe IIb, nível de evidência B, como um marcador de risco adicional naqueles com risco intermediário com base no ERF (42).

Já no contexto de prevenção primária, a PCR-US também tem demonstrado seu papel. Em um estudo de caso controle com homens saudáveis, Sakkinen P *et al* observaram que a PCR-US foi um forte preditor de risco de IAM em 20 anos (46). Muitos estudos epidemiológicos prospectivos realizados entre indivíduos sem histórico prévio de doença cardiovascular demonstram que uma única medida de PCR-US é um preditor de eventos cardiovasculares futuros. Mendall MA *et al* estudaram 1395 homens e, no seguimento médio de 13 anos, observaram uma associação significativa entre a PCR e DAC ($p < 0,005$), bem como de PCR com IAM fatal ($P = 0,0019$) (47).

A PCR-US é o único biomarcador de sangue que sofreu pesquisas tão profundas nos últimos anos e mostrou resultados bastante consistentes em meta-análises. Além da questão de uma contribuição incremental para melhorar a estratificação de risco em pacientes com risco intermediário, um segundo papel tem ganhado notoriedade. A PCR-US pode ser considerado como um biomarcador integrativo e indicador da carga inflamatória total do corpo, pois está correlacionado com muitos outros FR cardiovasculares que não estão contidos nos escores tradicionais. Assim, uma medida simples de PCR-US na definição de avaliação de risco cardiovascular pode fornecer uma visão mais abrangente do perfil de risco geral do paciente (15).

Um dos métodos que mais tem ganhado destaque na estratificação de risco cardiovascular nos últimos anos é o ECAC, tido hoje como padrão ouro para este fim. É um método não invasivo, realizado através de uma tomografia computadorizada torácica. É seguro, já que não utiliza contraste e a exposição à radiação é muito baixa, semelhante à de uma mamografia (16). O ECAC

proporciona a quantificação da calcificação arterial coronariana, um marcador de aterosclerose, que foi originalmente desenvolvido por Agatston et al (48). O score é determinado pelo produto da área da placa calcificada pela densidade máxima da lesão de cálcio (de 1 a 4 com base nas unidades de Hounsfield). Existem outros métodos de quantificação descritos, mas este é o mais referenciado na literatura. Ele categoriza em escores de 0 indicando ausência de placa calcificada, 1 a 10 placa mínima, 11 a 100 placa leve, 101 a 400 placa moderada e > 400 placa grave. (49). O potencial do ECAC em desempenhar relevante papel na estratificação do risco cardiovascular é o de que a calcificação ocorre quase que exclusivamente no contexto da doença aterosclerótica. Em um dado indivíduo, a quantidade de calcificação presente nas artérias coronárias apresenta boa correlação com a carga aterosclerótica coronariana total. Entretanto, nem toda placa aterosclerótica é calcificada. De fato, relatos prévios demonstraram que a porção calcificada corresponde apenas a cerca de 10 a 20% do volume total da placa; ou seja, a calcificação coronariana representaria apenas a “ponta do iceberg” da DAC, com a porção não calcificada respondendo por cerca de 80 a 90% da carga aterosclerótica total. Então, a presença e a extensão da calcificação arterial coronariana correlacionam-se com a magnitude da placa aterosclerótica e com o desenvolvimento subsequente de eventos cardiovasculares.

Diversos estudos populacionais longitudinais que incluíram grande número de pacientes demonstraram que o ECAC apresenta associação significativa com a ocorrência de eventos cardiovasculares maiores, como morte por todas as causas, morte cardiovascular e IAM não fatal, no acompanhamento de médio e longo prazo. Quanto maior a quantidade de cálcio nas coronárias, maior a chance de o paciente apresentar um evento cardiovascular no futuro. (50-53). Além de ser efetivo em prever eventos cardiovasculares de forma independente, o ECA tem se mostrado capaz de refinar os modelos de predição tradicionais. Estudos observacionais demonstraram que, quando adicionado aos modelos padrão, o ECAC tem a capacidade de melhorar significativamente a acurácia preditora em relação a outros biomarcadores isolados ou combinados. Em particular, os indivíduos que não possuem calcificação arterial coronariana (ECAC = 0) apresentam um

risco extremamente baixo de DCV. Foi demonstrado que entre indivíduos tradicionalmente classificados como de baixo risco pelo ERF, um alto ECAC (≥ 100) está associado a uma taxa estimada de eventos em 10 anos de quase 10%. Em contraste, entre indivíduos tradicionalmente identificados como de alto risco, um ECAC de zero está associado a uma taxa de eventos em 10 anos de apenas 3%.

De fato, indivíduos sem fatores de risco e um ECAC elevado têm chance de eventos aproximadamente três vezes maior que indivíduos com múltiplos FR e um ECAC de zero. Com base em dados de várias coortes observacionais, o ECAC oferece o potencial de uma estimativa de risco refinada e personalizada para ajudar a orientar as decisões de tratamento para a prevenção primária das DCV. Greenland P et al. demonstrou que os pacientes com risco intermediário pelo score de Framingham e com ECAC > 300 apresentaram uma taxa de eventos cardiovasculares de 2,8%/ano (aproximadamente equivalente a uma taxa de 28% em 10 anos), o que os colocaria no grupo de alto risco ($> 20\%$ em 10 anos) (54). Um consenso publicado em 2007 pelo ACCF/AHA sobre o uso do ECAC na avaliação do risco cardiovascular global (55) examinou os dados combinados de seis grandes estudos que incluíram 27.622 pacientes assintomáticos e avaliou os principais preditores de um total de 395 eventos cardiovasculares. Dentre os 11.815 pacientes com ECAC = 0, a taxa de eventos foi muito baixa, apenas 0,4% nos 3 a 5 anos subsequentes. Comparados com os pacientes com ECAC = 0, aqueles com ECAC entre 100 e 400 apresentaram um risco relativo de 4,3 (IC 95% de 3,5 a 5,2; $p < 0,0001$), aqueles com ECAC entre 400 e 1000 apresentaram um RR de 7,2 (IC 95% de 5,2 a 9,9; $p < 0,0001$), e aqueles com ECAC > 1000 apresentaram um RR de 10,8 (IC 95% de 4,2 a 27,7; $p < 0,0001$).

Desde a publicação desse consenso, outros estudos prospectivos confirmaram tais achados e demonstraram que a associação entre ECAC e prognóstico é semelhante, independentemente do sexo ou da etnia do paciente (56,57). Na análise ROC, a área sob a curva para prever a ocorrência de eventos cardiovasculares foi significativamente maior com o ECAC coronariano

do que com os escores de Framingham ou PROCAM. No estudo MESA, a estatística “C”, considerando-se apenas os fatores de risco tradicionais, foi de 0,79 para prever eventos cardiovasculares maiores, e de 0,83 quando a informação do ECAC foi associada aos fatores de risco ($p = 0,006$).

Estudos também mostraram que os pacientes com ECAC elevados eram mais propensos a terem seu tratamento intensificado, com maior prescrição de anti-hipertensivos, hipolipemiantes e antiagregantes plaquetários, bem como melhorarem sua aderência ao tratamento farmacológico e não farmacológico

Porém, o ECAC possui um custo elevado e não está amplamente disponível, o que torna seu uso bastante utópico na maioria dos cenários brasileiros.

Neste sentido, sabendo que a PCR US e o ECAC são marcadores robustos na estratificação de risco cardiovascular, surge o RNL, que parece ser um marcador da carga inflamatória e que poderia, hipoteticamente, também inferir risco cardiovascular. E de fato, já foi demonstrado que a RNL possui alguma correlação com o ECAC e proteína C reativa. Aygun e Efe relataram que pacientes com $RNL > 2,05$ tiveram maiores escores de cálcio coronariano do que pacientes com RNL menor (58). Outro estudo mostrou que uma alta RNL foi associada independentemente com ECAC (59). Em uma grande coorte de pacientes, Shah N. et al. chegaram a um coeficiente de correlação de Spearman entre RNL e PCR de 0,11, significando assim algum grau de associação, mesmo que pobre (60). Su-Hyun Nam et al demonstraram que existe uma associação independente entre RNL e ECAC entre homens adultos saudáveis ($OR:7,464$, $p<0,045$), revelando que a RNL é um preditor significativo de doença cardiovascular em homens com aterosclerose subclínica (61).

Portanto, sabendo que a inflamação desempenha protagonismo na patogênese da aterosclerose, esse simples exame, facilmente executado, amplamente disponível, que nos infere uma avaliação do status inflamatório do paciente pode ter algum papel na estratificação de risco dos pacientes, uma vez que se correlaciona com os demais biomarcadores já vastamente estudados bem como se correlacionada diretamente com a DAC propriamente dita.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

As DCV são a principal causa de morte no Brasil e no mundo, bem como geradoras de grande morbidade e com consequentes custos para o sistema de saúde. Identificar pacientes assintomáticos, mas que estão sob algum risco e necessitariam de estratégias preventivas ou até mesmo intensificação de tratamento para assim evitar desfechos desfavoráveis torna-se um desafio na prática médica. Os inúmeros métodos para predição de risco disponíveis na atualidade ainda apresentam importantes limitações e falham em discriminar com maior precisão esses pacientes. Neste contexto, surgem os FR adicionais, para refinar o risco dos pacientes, como a PCR US, ECAC e RNL.

A RNL parece estar emergindo como um biomarcador custo-efetivo na predição de eventos cardiovasculares, porém ainda com resultados conflitantes. Portanto, como a inflamação está associada com o desenvolvimento e progressão de aterosclerose, compreender se a RNL tem algum papel na estratificação de risco cardiovascular em pacientes assintomáticos é vital importância, já que se trata de um marcador baixo custo, amplamente acessível e independente de novas tecnologias, já que em muitos cenários não se dispõe de ECAC ou PCR US. Para isto, este estudo pretende avaliar se existe associação independente entre a RNL e o ECAC e entre a RNL e a PCR US, dois marcadores de risco cardiovascular tradicionais robustos e já bem estabelecidos pelas diretrizes.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB et al., Heart Disease and Stroke Statistics—2013 Update A Report From the American Heart Association, *Circulation*, 2013; 127:e6-e245
2. Freire CMV, Alcantara ML, Santos SN, Amaral SI, Veloso O, Porto CLS et al., Recomendação para a Quantificação pelo Ultrassom da Doença Aterosclerótica das Artérias Carótidas e Vertebrais: Grupo de Trabalho do Departamento de Imagem Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – DIC – SBC, *Arq Bras Cardiol: Imagem cardiovasc.* 2015 Abril; 28:e1- e64
3. Ross R. Atherosclerosis - An Inflammatory disease. *N Engl J Med*; 1999; 340(2):115-26.
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105(9):1135-43.
5. Joshi PA, Nasir K. Discordance between Risk Factors and Coronary Artery Calcium: Implications for Guiding Treatment Strategies in Primary Prevention Settings. *Prog Cardiovasc Dis* 2015;58(1):10-18.
6. Mamudu HM, Paul TK, Veeranki SP, Budoff M. The effects of coronary artery calcium screening on behavioral modification, risk perception, and medication adherence among asymptomatic adults: A systematic review. *Atherosclerosis* 2014;236(2):338-50.
7. Shah N, Parikh V, Patel N, Patel N, Badheka A, Deshmukh A et al., Neutrophil lymphocyte ratio significantly improves the Framingham risk score in prediction of coronary heart disease mortality: insights from the National Health and Nutrition Examination Survey-III, *Int J Cardiol.* 2014 Feb 15;171(3):390-7.

8. Greenland P, Smith SC Jr, Grundy SM. Improving coronary heart disease risk assessment in asymptomatic people: role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests. *Circulation* 2001; 104:1863-7
9. de Lemos JA, Ayers CR, Levine B, de Filippi CR, Wang TJ, Hundley WG et al., Multimodality Strategy for Cardiovascular Risk Assessment: Performance in 2 Population-Based Cohorts. *Circulation*. 2017 May 30;135(22):2119-2132.
10. Tong W, Lima JA, Lai H, Celentano DD, Dai S, Lai S, Relation of coronary artery calcium to left ventricular mass in African-Americans. *Am J Cardiol*. 2004 Feb 15;93(4):490-2.
11. Pan NH, Yang HY, Hsieh MH, Chen YJ. Coronary calcium score from multislice computed tomography correlates with QT dispersion and left ventricular wall thickness. *Heart Vessels*. 2008 May;23(3):155-60.
12. Wang NC, Matthews KA, Barinas-Mitchell EJ, Chang CC, El Khoudary SRA, Inflammatory/Hemostatic Biomarkers and Coronary Artery Calcium Progression in Women at Midlife (from the Study of Women's Health Across the Nation, Heart Study), *Am J Cardiol*. 2016 Aug 1;118(3):311-8.
13. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2129–2138.
14. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation*. 1998 May 26;97(20):2007-11.
15. Koenig WI , High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 15;168(6):5126-34.
16. Divakaran S, Cheezum MK, Hulten EA, Bittencourt MS, Silverman MG, Nasir K et al., Use of cardiac CT and calcium scoring for detecting coronary plaque: implications on prognosis and patient management, *Br J Radiol*. 2015 Feb;88(1046):20140594.
- 17 Wildman RP, Muntner P, Chen J, Sutton-Tyrrell K, He J, Relation of inflammation to peripheral arterial disease in the national health and nutrition examination survey, *Am J Cardiol*, 2005;96(11):1579-1583.

18. Azab B, Zaher M, Weiserbs KF et al., Usefulness of neutrophil to lymphocyte ratio in predicting short- and long-term mortality after non-ST-elevation myocardial infarction, *Am J Cardiol* 2010;106(4):470–6.
19. Papa A, Emdin M, Passino C, Michelassi C, Battaglia D, Cocci F, Predictive value of elevated neutrophil–lymphocyte ratio on cardiac mortality in patients with stable coronary artery disease, *Clin Chim Acta* 2008;395(1–2):27–31.
20. Azab B, Chainani V, Shah N, McGinn JT. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of major adverse cardiac events among diabetic population: a 4-year follow-up study, *Angiology* 2013;64(6):456–65.
21. Horne BD, Anderson JL, John JM, et al. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol*, 2005;45(10):1638–43
22. Bhat T, Teli S, Rijal J, Bhat H, Raza M, Khoueiry G, Neutrophil to lymphocyte ratio and cardiovascular diseases: a review. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2013 Jan;11(1):55-9.
23. Nilsson L, Wieringa WG, Pundziute G, Gjerde M, Engvall J, Swahn E et al., Neutrophil/Lymphocyte ratio is associated with non-calcified plaque burden in patients with coronary artery disease. , *PLoS One*, 2014 Sep 30;9(9):e108183.
24. M. Drechsler, R. T. A. Megens, M. Van Zandvoort, C. Weber, and O. Soehnlein, Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis, *Circulation*, 2010 Oct 18, vol. 122, no. 18, pp. 1837–1845.
25. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. *FASEB J.* 2001;15(7):1149-1157.
26. Alexander H. Sprague and Raouf A. Khalil, Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease, *Biochem Pharmacol.*, 2009 Sep 15; 78(6): 539–552.
27. Tiewei Li, Chun Gu, Fang Wang, Bin Lv, Changlin Zhang, Rui Peng et al., Association of Neutrophil–Lymphocyte Ratio and the Presence of Noncalcified or Mixed Coronary Atherosclerotic Plaques, *Angiology*, July 6, 2017, 69: 256-263

28. Li J, Chen Q, Luo X, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio positively correlates to age in healthy population. *J Clin Lab Analysis*. 2015;29(6):437-443
29. Karaman M, Balta S, Ay SA, et al. The comparative effects of valsartan and amlodipine on vWf Levels and N/L ratio in patients with newly diagnosed, *Clin Exp Hypertens*, 2013, 35(7):516-522.
30. Unlu M, Karaman M, Ay SA, et al. The comparative effects of valsartan and amlodipine on vascular microinflammation in newly diagnosed hypertensive patients. *Clin Exp Hypertens*. 2013;35(6):418-423.
31. Fici F, Celik T, Balta S, et al. Comparative effects of nebivolol and metoprolol on red cell distribution width and neutrophil/lymphocyte ratio in patients with newly diagnosed essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;62(4):388-393.
32. Lee G-K, Lee L-C, Chong E, et al. The long-term predictive value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in type 2 diabetic patients presenting with acute myocardial infarction. *QJM*. 2012; 105(11):1075-1082.
33. Ulu SM, Dogan M, Ahsen A, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a quick and reliable predictive marker in the diagnose and the severity of diabetic retinopathy. *Diabetes, Technol Ther*. 2013; 15(11):942-947.
34. Oztu"rk ZA, Kuyumcu ME, Yesil Y, et al. Is there a link between neutrophil-lymphocyte ratio and microvascular complications in geriatric diabetic patients? *J Endocrinol Invest*. 2013;36(8): 593-599.
35. Varol E, Bas HA, Aksoy F, Ari H, Ozaydin M. Relationship between neutrophil-lymphocyte ratio and isolated low highdensity lipoprotein cholesterol. *Angiology*. 2013;65(7):630-633.
36. Verdoia M, Barbieri L, Di Giovine G, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and the extent of coronary artery disease: results from a large cohort study. *Angiology*. 2016;67(1):75-82.
37. Zordoky BN, Robertson IM, Dyck JR. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1852(6):1155-1177

38. Yilmaz M, Tenekecioglu E, Arslan B, et al. White blood cell subtypes and neutrophil-lymphocyte ratio in prediction of coronary thrombus formation in non-ST-segment elevated acute coronary syndrome. *Clin Appl Thromb Hemostas*. 2015;21(5): 446-452.
39. Ergelen M, Uyarel H, Altay S, et al. Predictive value of elevated neutrophil to lymphocyte ratio in patients undergoing primary angioplasty for ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2013;20(4):427-432.
40. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.
41. Xavier HT, Izar MC, Faria Neto JR, Assad MH, Rocha VZ, Sposito AC, et al. V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis, *Arq Bras Cardiol*. 2013;101(4 Suppl 1):1-20
42. Goff DC Jr, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB Sr, Gibbons R, et al., 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk. A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines
43. Melander O, Newton-Cheh C, Almgren P, Hedblad B, Berglund G, Engström G, et al. Novel and conventional biomarkers for prediction of incident cardiovascular events in the community. *JAMA*. 2009;302:49-57.
44. Zethelius B, Berglund L, Sundström J, et al. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2008;358:2107–16
45. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al. Proteína C reativa e outros marcadores circulantes de inflamação na predição de doença cardíaca coronária. *N Engl J Med* 2004; 350: 1387.
46. Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, et al. C-reactive protein and myocardial infarction. *J Clin Epidemiol*. 2002;55:445–451.
47. Mendall MA, Strachan DP, Butland BK, et al. C-reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular risk factors in men. *Eur Heart J*. 2000;21:1584–1590

48. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, et al. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:827.
49. Hecht HS1. Coronary artery calcium scanning: past, present, and future. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2015 May;8(5):579-596.
50. Arad Y, Roth M, Newstein D, et al. Coronary calcification, coronary risk factors, and atherosclerotic cardiovascular disease events. The St. Francis Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:158–165.
51. Taylor AJ, Bindeman J, Feuerstein I, Cao F, Brazaitis M, O'Malley PG. Coronary Calcium Independently Predicts Incident Premature Coronary Heart Disease Over Measured Cardiovascular Risk Factors. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:807–14.
52. Vliedenthart R, Oudkerk M, Hofman A, Oei HH, van Dijck W, van Rooij FJ, Witteman JC. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation* 2005 Jul 26;112(4).
53. Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, Weinstein SR, Mosler TP, Tseng PH, Flores FR, et al., Long-Term Prognosis Associated With Coronary Calcification: Observations From a Registry of 25,253 Patients. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1860–1870.
54. Greenland P, LaBree L, Azen SP, Doherty TM, Detrano RC. Coronary artery calcium score combined with Framingham score for risk prediction in asymptomatic individuals. *JAMA*. 2004;291(2):210-5.
55. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, Budoff MJ, Eisenberg MJ, Grundy SM, et al. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography). *Circulation*. 2007;115(3):402-26

56. Budoff MJ, Achenbach S, Blumenthal RS, Carr JJ, Goldin JG, Greenland P, et al. Assessment of coronary artery disease by cardiac computed tomography: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Cardiovascular Imaging and Intervention, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Committee on Cardiac Imaging, Council on Clinical Cardiology. *Circulation*. 2006;114(16):1761-91.
57. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, et al. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med*. 2008;358(13):1336-45.
58. Aygun F, Efe D. Association of neutrophil/lymphocyte ratio with obstructive coronary artery disease and coronary artery calcium score detected by multislice computed tomography in type 2 diabetes mellitus patients. *Patient Prefer Adherence*, 2015;9: 1023-1031.
59. Park B-J, Shim J-Y, Lee H-R, et al. Relationship of neutrophil–lymphocyte ratio with arterial stiffness and coronary calcium score. *Clin Chim Acta*. 2011;412(11-12):925-929.
60. Shah N, Parikh V, Patel N, Nilay Patel N, Badheka A, Deshmukh A, et al., Neutrophil lymphocyte ratio significantly improves the Framingham risk score in prediction of coronary heart disease mortality: Insights from the National Health and Nutrition Examination Survey-III. *International Journal of Cardiology* 171 (2014) 390–397
61. Nam SH, Kang SG, Song SW. The Neutrophil-Lymphocyte Ratio Is Associated with Coronary Artery Calcification in Asymptomatic Korean Males:A Cross-Sectional Study. *BioMed Research International*, Volume 2017, 1989417.

ARTIGO

Original Research to be submitted to *Brazilian Journal of medical and biological research*

Predictive capacity of the neutrophil–lymphocyte ratio as a marker of cardiovascular risk in asymptomatic patients

A.O. de Almeida¹, D.D.M. Freitas¹, A.D. da Silveira², P.L. da Luz³, N. Bruscato¹, P. Schwartzman⁴, and E.H. Moriguchi²

¹ Associação Veranense de Assistência em Saúde, Veranópolis, RS, Brasil

² Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

³ Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo (USP), SP, Brasil

⁴ Hospital Moinhos de Vento (HMV), Porto Alegre, RS, Brasil

Corresponding author

Angélica Oliveira de Almeida
Rua Ernesto Alves, 297, 702
95330-000 – Veranópolis, RS
Brazil
angelicaalm@gmail.com
Tel +55-54-98121820

Financial disclosure: The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to disclose.

ABSTRACT

Atherosclerosis is not just a passive lesion caused by deposition of lipids and other substances on the vascular walls, but an active inflammatory process, in which neutrophils play a key role. The neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) is an inflammatory biomarker that is emerging as a good predictor of cardiovascular disease. The purpose of this study was to determine whether there is an association between NLR and coronary calcium score (CCS) and between NLR and ultrasensitive C-reactive protein (usCRP), two robust markers that have already been consolidated in cardiovascular risk estimation. In a contemporary single-center cohort study, we studied 125 men free from cardiovascular disease at baseline and at 7 years of follow-up. We performed a clinical evaluation, including measurement of glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, triglycerides, creatinine, blood count and usCRP, as well as CCS through computed tomography. Multivariate logistic regression revealed a significant association between NLR and usCRP ($P = 0.01$ baseline and $P = 0.02$ follow-up), but not between NLR and CCS. Therefore, NLR, a simple inflammatory marker whose testing is widely available, routine and low cost, has an independent association with usCRP, and has the potential to be used as a marker of cardiovascular risk in asymptomatic men.

Key words: cardiovascular biomarker, neutrophil-lymphocyte ratio, ultrasensitive C-reactive protein, cardiovascular prevention, cardiovascular risk assessment, primary prevention.

Running title: Neutrophil-lymphocyte ratio and cardiovascular risk

Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide, responsible for 31% of total mortality (1). The incidence of CVD-related deaths continues to rise rapidly in developing countries (2). The main cause of coronary artery disease (CAD) is atherosclerosis, an inflammatory disease in which immune mechanisms interact with metabolic and genetic risk factors to initiate, propagate and activate arterial lesions (3). CAD begins in a subclinical phase and progresses slowly for years before clinical cardiovascular events occur (4). These events are the result of a complex interaction between risk factors, environmental exposure and genetic susceptibility (5). One important step to reducing CVD morbidity and mortality is to develop primary prevention measures in asymptomatic individuals who are at a higher risk of the disease (6). However, given the complexity of these interactions, intuitive risk attribution often fails. To overcome this difficulty, researchers have explored other discriminatory methods with substantially improved risk identification (7).

Ultrasensitive C-reactive protein (usCRP), which is obtained through a blood test, and the coronary artery calcium score (CCS), which is obtained through computed tomography, have been the most studied and consolidated markers in recent years, showing a strong association with cardiovascular outcome (8). UsCRP, an independent predictor of fatal cardiovascular events and overall mortality (9), is associated with CAD (10) and the risk of acute myocardial infarction (AMI) (11) and has an incremental value in scores based on traditional risk factors (9). CCS, on the other hand, correlates with the magnitude of atherosclerotic plaque (identifying calcified atherosclerotic lesions, even if asymptomatic) and subsequent development of cardiovascular events. CCS is significantly associated with major cardiovascular events, such as all-cause mortality, cardiovascular death and non-fatal AMI (12), and can also improve predictive accuracy in relation to other biomarkers (13).

Another emerging biomarker with good ability to predict cardiovascular risk is the neutrophil-lymphocyte relationship (NLR). Obtained through the simple ratio of the number of neutrophils to the number of lymphocytes, NLR seems to be a predictor of all-cause and cardiovascular mortality in patients with acute coronary syndrome (14), chronic CAD (15) and diabetes mellitus (16), as well as in individuals who have undergone cardiac catheterization (17). However, most studies have focused on in-hospital and short-term mortality in acute and established CVD contexts. However the maximum predictive value of NLR in CVD-free individuals has not yet been determined (18,19).

More accurate risk stratification would provide a more reliable prognostic view for each patient and can change clinical conduct through treatment initiation or intensification in an attempt to prevent future events in patients who are at greatest risk. To this end, a wide variety of biomarkers have been identified, and many more are still being studied but do not yet have a clearly defined role. Since inflammation is associated with the development and progression of atherosclerosis, our hypothesis was that NLR, whose testing is widely available, routine and low cost, can be used as a marker of cardiovascular risk. Thus, this study's objective was to assess whether NLR is associated with cardiovascular risk as estimated by CCS and usCRP, two robust and traditional cardiovascular risk markers.

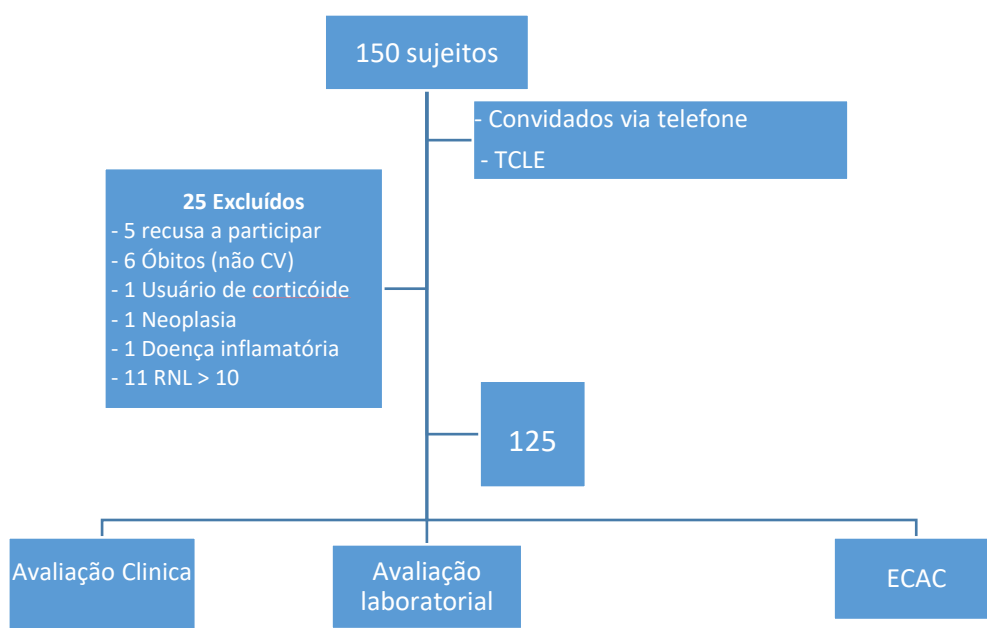
Materials and Methods

Population

Volunteers were recruited from *Projeto Confrarias*, a series of studies on aging rates and the prevalence of atherosclerosis in habitual wine drinkers and abstainers. This project included a multicenter observational study (with 200 participants from São Paulo, SP, Brazil and 150 participants from Veranópolis, RS, Brazil), which in 2011 and 2012 evaluated men aged between 50 and 70 years with no history of previous

cardiovascular disease. At that point, the participants underwent clinical, laboratory and chest computed tomography to determine their CCS.

The present study reassessed the Veranópolis sample, except for those who died from causes unrelated to the study's outcomes (6 people) and those who refused to participate (5 people). The study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). After providing written informed consent, the participants underwent new medical, laboratory testing and a tomography assessment to determine their CCS. Those whose conditions could possibly alter the white blood count (and thus the NLR) were excluded: one was using corticosteroids, one had a neoplasia, and one had an inflammatory disease. In addition, 11 subjects with an NLR ≥ 10 , a value suggestive of acute infection, were also excluded. Thus, the final sample included 125 participants.



Methods

All participants were admitted to the clinical research sector of the Hospital Comunitário São Peregrino Laziossi in Veranópolis and underwent laboratory tests and clinical evaluation by a cardiologist. They also underwent computed tomography to

obtain their CCS at the Hospital Moinhos de Vento in Porto Alegre, RS. These assessments, initially carried out in 2011/2012, were followed up in 2019 by the same operator, who was blinded to the identity of the participants.

Medical history and basic physical examination

History of hypertension, diabetes, smoking, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, family history of CAD, physical inactivity, obesity, and cardiovascular diseases, such as AMI, angina, stroke, and carotid and peripheral artery disease, were evaluated. Body mass index (BMI) was determined through weight and height measurements, blood pressure and heart rate were measured, and a complete cardiovascular examination was performed. The 10-year predicted cardiovascular disease risk was estimated using the American College of Cardiology/American Heart Association ASCVD Risk Estimator Plus tool (20). The composite outcome consisted of the following conditions: non-fatal myocardial infarction, non-fatal stroke, myocardial revascularization and carotid atherosclerotic disease. The medical history of participants who experienced any of these conditions was collected from the patient and/or family and was reviewed along with hospital documents and/or the death certificate.

All measurements were taken with previously calibrated equipment according to validated protocols.

Biochemical tests

Blood withdrawal was performed after a 12-hour fast at the Veranense laboratory of the Hospital Comunitário São Peregrino Lazziozi to determine glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein, triglycerides, usCRP, creatinine, and blood count. Low-density lipoprotein cholesterol was calculated using the Friedewald formula, and the NLR was calculated by dividing the absolute number of neutrophils by the absolute number of lymphocytes in the blood count.

Coronary Calcium Score

The CCS was determined through chest computed tomography in a Siemens Sensation 64-slice scanner in 2011/2012 and a Siemens 256-slice scanner in 2019. Coronary artery calcification was evaluated with the Agatston method, acquiring prospective images at thicknesses of 3 mm. Both studies were carried out at the same facilities (Hospital Moinhos de Vento of Porto Alegre, RS, Brazil) by the same evaluator, who was blinded to the identity of the individual in the report.

Statistical analysis

Qualitative variables were described as absolute and relative frequencies [n (%)], while quantitative variables were described as mean \pm standard deviation. The distribution of quantitative variables was examined by way of histogram and QQplot for each time point and group.

A univariate logistic regression model was performed to analyze the association between NLR and CCS with the following predictors: age, SAH, diabetes, smoking, sedentary lifestyle, statin use, family history of CAD, cardiovascular risk classification, systolic and diastolic blood pressure, BMI, glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, triglycerides, creatinine and composite outcome. Variables presenting $P < 0,1$ were included in the multivariate model.

The sample was divided according to usCRP, using a cut-off point of < 1 , indicating low cardiovascular risk, and ≥ 1 , indicating moderate or high cardiovascular risk (21). With respect to CCS, we divided the sample into $CCS = 0$, indicating the absence of calcified atherosclerotic lesions, and $CCS > 0$, indicating the presence of calcified atherosclerotic lesions (22). Generalized equation estimates were used to compare these groups at baseline and follow-up. Poisson distribution with robust variance was used to estimate the prevalence of binary outcomes, while normal and

gamma distributions were used for quantitative variables, as appropriate, to estimate means. All analyses were performed in SPSS 18.

Results

Of the 125 subjects who entered this study, 76 had CCS > 0 and 49 had CCS = 0; regarding usCRP, 48 had usCRP \geq 1 and 77 had usCRP <1. The prevalence of obesity, diabetes, hypertension and smoking were low and similar in all groups. The majority (> 60%) of the participants had intermediate cardiovascular risk according to the ASCVD. In the follow-up evaluation (approximately 7 years later), we observed a considerable increase in the prevalence of obesity and hypertension in the entire sample, as well as an increased use of statins.

Coronary calcium score = 0 group vs. coronary calcium score > 0 group

The CCS > 0 group included 60.8% of the sample and had a mean CCS of 167.8 ± 280 . Their mean age (59 ± 5 years) was significantly higher than the CCS = 0 group (56 ± 5 years, $P = 0.006$). The prevalence of physical inactivity was higher in the CCS > 0 group (25% vs. 4.1%, $P = 0.03$). Participants in this group also had higher levels of systolic blood pressure (141.62 ± 10.92 vs. 135.9 ± 13.23 , $P = 0.01$) and glucose (108.26 ± 17.75 vs. 100.35 ± 40.46 , $P = 0.001$). The NLR of the CCS > 0 group tended to be higher than that of the CCS = 0 group, although not significantly so (1.93 ± 0.82 vs. 1.69 ± 0.69 , $p = 0.08$). The same was found for usCRP, which tended to be greater in the CCS > 0 group, but not significantly so. The other variables did not differ between the groups (Table 1).

In the follow-up evaluation, the CCS > 0 group now accounted for 75.2% of the sample, with a mean CCS of 321.5 ± 536.1 . They continued to have higher glucose levels, but the prevalence of physical inactivity did not differ between the groups and systolic blood pressure levels were similar. There was a considerable increase in statin use in both groups, although it was significantly higher in the CCS > 0 group (40.42%

vs. 16.13%, $P = 0.016$), which could have contributed to the difference in low-density lipoprotein levels, which were significantly lower in this group (117.1 ± 38.3 vs. 134.8 ± 31.3 , $p = 0.021$). NLR was similar in both groups, as were the other variables (Table 2).

We used multivariate logistic regression to assess the relationship between CCS and risk factors that might affect this variable. In the initial assessment, age was an independent risk factor for high CCS; since CCS significantly increased with patient age ($p = 0.015$). Physical inactivity also significantly influenced CCS, increasing the chance of high CCS by 6.5 times ($p = 0.021$). In the follow-up, intermediate cardiovascular risk was associated with higher CCS ($p = 0.018$); and higher serum glucose levels were associated with $CCS > 0$ ($p = 0.023$) (Table 3).

Table 1. Baseline characteristics of the population - coronary calcium score

Variables	CCS = 0 (n = 49)	CCS > 0 (n = 76)	P-value
CCS	0	167.8 ± 280.3	
Age (years)	56 ± 5	59 ± 5	0.006
Hypertension	9 (18.4 %)	23 (30.3%)	0.149
Diabetes mellitus	0	3 (3.9%)	0.279
Smoker	3 (6.1%)	4 (5.3%)	1.0
Sedentary	2 (4.1%)	19 (25%)	0.03
Obese	0	0	-
Statin use	1 (2%)	4 (5.3%)	0.647
Family history of CAD	5 (10.2%)	15 (19.7%)	0.213
ASCVD risk classification			0.017

Variables	CCS = 0 (n = 49)	CCS > 0 (n = 76)	P-value
Low risk	3 (30%)	7 (70%)	
Borderline risk	15 (62,5%)	9 (37,5%)	
Intermediate risk	30 (37,5%)	50 (62,5%)	
High risk	1 (9%)	10 (91%)	
Systolic BP (mmHg)	135.9 ± 13.2	141.6 ± 10.9	0.01
Diastolic BP (mmHg)	82.9 ± 9.1)	84.1 ± 6.8	0.422
BMI (Kg/m²)	26.4 ± 2.7	26.9 ± 2.5	0.259
Glucose (mg/dL)	100.3 ± 10.5	108.3 ± 17.7	0.001
Total cholesterol (mg/dL)	234.8 ± 34.3	223.0 ± 38.7	0.087
HDL-c (mg/dL)	50.6 ± 14.3	49.1 ± 13.5	0.559
LDL-c (mg/dL)	151.6 ± 30.3)	141.5 ± 34	0.09
Triglycerides (mg/dL)	169.3 ± 170.1	163.5 ± 121.5	0.833
usCRP (mg/L)	0.97 ± 1	1.38 ± 1.5	0.057
Creatinine (mg/dL)	0.96 ± 0.1	1.01 ± 0.15	0.055
Neutrophils (/μL)	3288 ± 1.062	3697 ± 1.393	0.082
Lymphocytes (/μL)	2052 ± 517	2049 ± 627	0.973
NLR	1.69 ± 0.69	1.93 ± 0.82	0.08

CCS: coronary calcium score; CAD: coronary artery disease; BP: blood pressure; BMI: body mass index; HDL-c: cholesterol high-density lipoprotein; LDL-c: cholesterol low-density lipoprotein; usCRP: ultrasensitive C-reactive protein; NLR: neutrophil-lymphocyte ratio.

Table 2. Follow-up characteristics of the population - coronary calcium score

Variables	CCS = 0 (n = 31)	CCS > 0 (n = 94)	p-value
CCS	0	321.6 ± 536.1	
Age (years)	64 ± 5	66 ± 5	0.063
Hypertension	18 (58.1%)	69 (73.4%)	0.120
Diabetes mellitus	2 (6.4%)	19 (20.2%)	0.098
Smoker	0	5 (5.3%)	0.331
Sedentary	9 (29%)	26 (27.7%)	1.0
Obese	5 (16.1%)	21 (22.3%)	0.612
Statin use	5 (16.1%)	38 (40.4%)	0.016
Family history of CAD	9 (29%)	28 (29.8%)	1.0
ASCVD risk classification			0.017
Low risk	4 (80%)	1 (20%)	
Borderline risk	3 (43%)	4 (57%)	
Intermediate risk	14 (20%)	58 (80%)	
High risk	10 (25%)	31 (75%)	
Systolic BP (mmHg)	135.64 ± 17	137.46 ± 16.8	0.604
Diastolic BP (mmHg)	78.3 ± 10.8	77.9 ± 9.4	0.837
BMI (Kg/m²)	26.7 ± 3.7	27.6 ± 3.4	0.212
Glucose (mg/dL)	92 ± 10.3	103.2 ± 20.9	0.004

Variables	CCS = 0 (n = 31)	CCS > 0 (n = 94)	p-value
Total cholesterol (mg/dL)	208 ± 43	194.1 ± 39.9	0.102
HDL-c (mg/dL)	49.6 ± 13.9	51.5 ± 11.4	0.461
LDL-c (mg/dL)	134.8 ± 31.4	117.1 ± 38.3	0.021
Triglycerides (mg/dL)	117.6 ± 73.2	127.6 ± 73.1	0.470
usCRP (mg/L)	1.6 ± 1.7	1.8 ± 2.1	0.588
Creatinine (mg/dL)	1 ± 0.1	1.2 ± 1.7	0.529
Neutrophils (/μL)	3032 ± 884	3301 ± 1.058	0.205
Lymphocytes (/μL)	2503 ± 702	2470 ± 761	0.833
NLR	1.29 ± 0.51	1.42 ± 0.46	0.236
Composite outcome (%)	2 (6.45%)	14 (14.9%)	0.353

CCS: coronary calcium score; CAD: coronary artery disease; BP: blood pressure; BMI: body mass index; HDL-c: cholesterol high-density lipoprotein; LDL-c: cholesterol low-density lipoprotein; usCRP: ultrasensitive C-reactive protein; NLR: neutrophil–lymphocyte ratio.

Table 3. Odds ratio and 95% confidence interval for coronary calcium score > 0*

Time	Variable	OR	Lower	Upper	P
Baseline	Age	1.11	1.02	1.20	0.015
	Sedentary	6.20	1.32	31.9	0.021
Follow-up	Intermediate risk	23.24	1.69	318.54	0.018
	Glucose	1.05	1.01	1.11	0.023

* Only significant results are presented - the other variables were not statistically significant.

UsPCR < 1 group vs. usPCR ≥ 1 group

At the initial evaluation, 61.6% of the participants had usCRP < 1 (mean 0.5 ± 0.23), while 38.4% had usCRP ≥ 1 (mean 2.38 ± 1.53). There was a trend towards higher NLR in the usCRP ≥ 1 group but it was not significant (1.98 ± 0.84 vs. 1.74 ± 0.72 , $p = 0.087$). Individuals in the usCRP ≥ 1 group had higher BMI ($P < 0.001$) and lower high-density lipoprotein cholesterol levels ($p = 0.04$) than the usCRP < 1 group. The other variables did not differ between groups (Table 4).

In the follow-up, the prevalence of diabetes increased considerably in both groups. The prevalence of hypertension also increased in both groups, although it was significantly higher in the usCRP ≥ 1 group (80% vs. 60%, $p = 0.019$). This group also had higher BMI than the usCRP < 1 group (26.4 ± 3.2 vs. 28.4 ± 3.6 , $p = 0.001$), as well as a higher level of diastolic blood pressure (79.8 ± 11 vs. 76.3 ± 8 , $P = 0.044$). Of the hematological parameters, the NLR of the usCRP ≥ 1 group was significantly higher than that of the usCRP < 1 group (1.49 ± 0.52 vs. 1.29 ± 0.42 , $P = 0.019$), as was the absolute number of neutrophils ($P = 0.017$) (Table 5).

In the multivariate logistic regression, BMI was independently associated with usCRP ≥ 1 for the baseline and follow-up assessment (initial OR 1.39, follow-up OR = 1.17). NLR was an associated risk factor for high usCRP. Thus, usCRP was significantly higher with increased NLR (initial OR 2.05 [$P = 0.01$], follow-up OR 2.81 [$P = 0.02$]) (Table 6). As a predictor of usCRP, the area under the ROC curve for NLR was 0.57 (95% CI = 0.46 - 0.67) at baseline (Figure 1) and 0.602 (95% CI = 0.04 - 0.50) at follow-up (Figure 2).

Table 4. Baseline characteristics of the population - usCRP

Variables	usCRP < 1 (n = 77)	usCRP ≥ 1 (n = 48)	p-value
usCRP	0.50 ± 0.2	2.38 ± 1.5	
Age (years)	58 ± 5	58 ± 5	0.910
Hypertension	18 (23.4%)	14 (29.2%)	0.530
Diabetes mellitus	2 (2.6%)	1 (2.1%)	1.0
Smoker	6 (7.8%)	1 (2.1%)	0.248
Sedentary	12 (15.6%)	9 (18.7%)	0.633
Obese	0	0	-
Statin use	4 (5.2%)	1 (2.1%)	0.648
Family history of CAD	11 (14.3%)	9 (18.7%)	0.617
ASCVD risk classification			0.092
Low risk	7 (70%)	3 (30%)	
Borderline risk	17 (71%)	7 (29%)	
Intermediate risk	50 (62,5%)	30 (37,5%)	
High risk	3 (23%)	8 (72%)	
Systolic BP (mmHg)	138 ± 12.5	141.5 ± 11.5	0.124
Diastolic BP (mmHg)	82.7 ± 8.1	85.1 ± 7	0.096
BMI (Kg/m ²)	26.1 ± 2.5	27.8 ± 2.3	< 0.001

Variables	usCRP < 1 (n = 77)	usCRP ≥ 1 (n = 48)	p-value
Glucose (mg/dL)	103.6 ± 14.4	107.7 ± 17.5	0.170
Total cholesterol (mg/dL)	225.5 ± 37.6	231.1 ± 37.0	0.416
HDL-c (mg/dL)	51.6 ± 14.3	46.6 ± 12.5	0.049
LDL-c (mg/dL)	143.9 ± 32.8	147.9 ± 33.1	0.507
Triglycerides (mg/dL)	157.4 ± 151.2	179.2 ± 126.1	0.381
CCS (Agatston)	119.2 ± 278.7	74.5 ± 127.8	0.489
Creatinine (mg/dL)	0.97 ± 0.15	1.02 ± 0.13	0.047
Neutrophils (/μL)	3366 ± 1.137	3809 ± 1,464	0.061
Lymphocytes (/μL)	2079 ± 627	2005 ± 511	0.491
NLR	1.74 ± 0.72	1.98 ± 0.84	0.087

CCS: coronary calcium score; CAD: coronary artery disease; BP: blood pressure; BMI: body mass index; HDL-c: cholesterol high-density lipoprotein; LDL-c: cholesterol low-density lipoprotein; usCRP: ultrasensitive C-reactive protein; NLR: neutrophil-lymphocyte ratio.

Table 5. Follow-up characteristics of the population - usCRP

Variables	usCRP < 1 (n=65)	usCRP ≥ 1 (n=60)	p-value
usCRP	0.40 ± 0.24	3.23 ± 2.09	
Age (years)	65 ± 5	66 ± 6	0.682
Hypertension	39 (60%)	48 (80%)	0.019
Diabetes mellitus	11 (16.9%)	10 (16.7%)	1.0
Smoker	4 (6.1%)	1 (1.7%)	0.367
Sedentary	20 (30.7%)	15 (25%)	0.552
Obese	9 (13.8%)	17 (28.3%)	0.051
Statin use	23 (35.3%)	20 (33.3%)	0.852
Family history of CAD	20 (30.7%)	17 (28.3%)	0.845
ASCVD risk classification			0.636
Low risk	2 (40%)	3 (60%)	
Borderline risk	3 (43%)	4 (57%)	
Intermediate risk	41 (57%)	31 (43%)	
High risk	19 (46%)	22 (54%)	
Systolic BP (mmHg)	134.4 ± 13.6	139.9 ± 19.4	0.071
Diastolic BP (mmHg)	76.3 ± 8.1	79.9 ± 11.0	0.044
BMI (Kg/m ²)	26.5 ± 3.2	28.4 ± 3.6	0.001
Glucose (mg/dL)	98.9 ± 20.4	102.1 ± 18.3	0.340
Total cholesterol (mg/dL)	197.9 ± 44.8	197.2 ± 36.7	0.918
HDL-c (mg/dL)	51.2 ± 12.2	50.7 ± 11.9	0.813
LDL-c (mg/dL)	122.7 ± 39	120.2 ± 35.9	0.714

Variables	usCRP < 1 (n=65)	usCRP ≥ 1 (n=60)	p-value
Triglycerides (mg/dL)	119.7 ± 76.1	130.9 ± 69.5	0.386
CCS (Agatston)	257.9 ± 499.6	224.4 ± 471.7	0.944
Creatinine (mg/dL)	1.3 ± 2.1	1.0 ± 0.1	0.304
Neutrophils (/μL)	3023 ± 830	3464 ± 1158	0.017
Lymphocytes (/μL)	2512 ± 785	2442 ± 701	0.601
NLR	1.29 ± 0.42	1.49 ± 0.52	0.019
Composite outcome (%)	7 (10.7%)	9 (15%)	0.595

CCS: coronary calcium score; CAD: coronary artery disease; BP: blood pressure; BMI: body mass index; HDL-c: cholesterol high-density lipoprotein; LDL-c: cholesterol low-density lipoprotein; usCRP: ultrasensitive C-reactive protein; NLR: neutrophil-lymphocyte ratio.

Table 6. Odds ratio and 95% confidence interval for usCRP ≥ 1*

Time	Variável	OR	Inferior	Superior	P
Baseline	BMI	1.39	1.14	1.71	0.001
	NLR	2.05	1.18	3.57	0.011
Follow-up	BMI	1.17	1.03	1.32	0.014
	NLR	2.81	1.18	6.72	0.02

*Only significant results are presented - the other variables were not statistically significant.

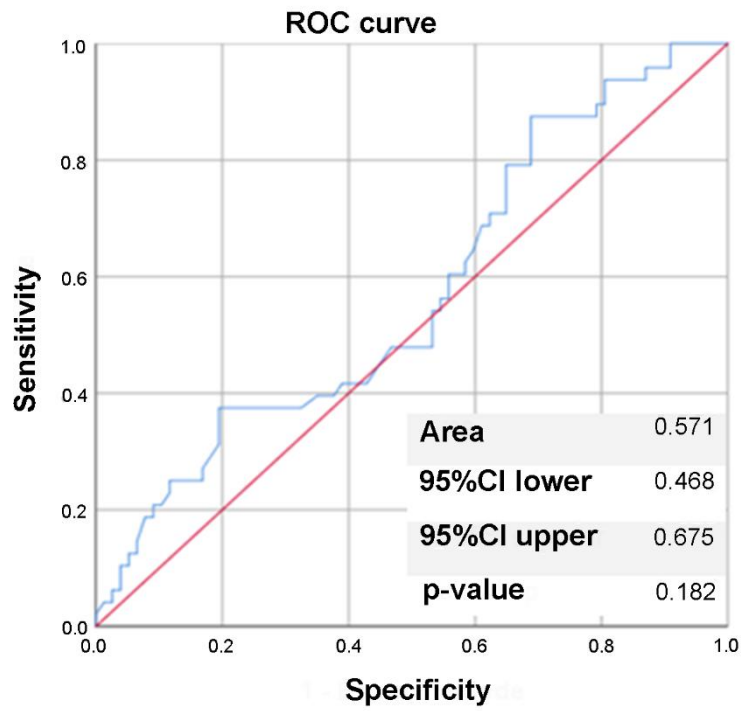


Figure 1. NLR area under the ROC curve for predicting usCRP at baseline

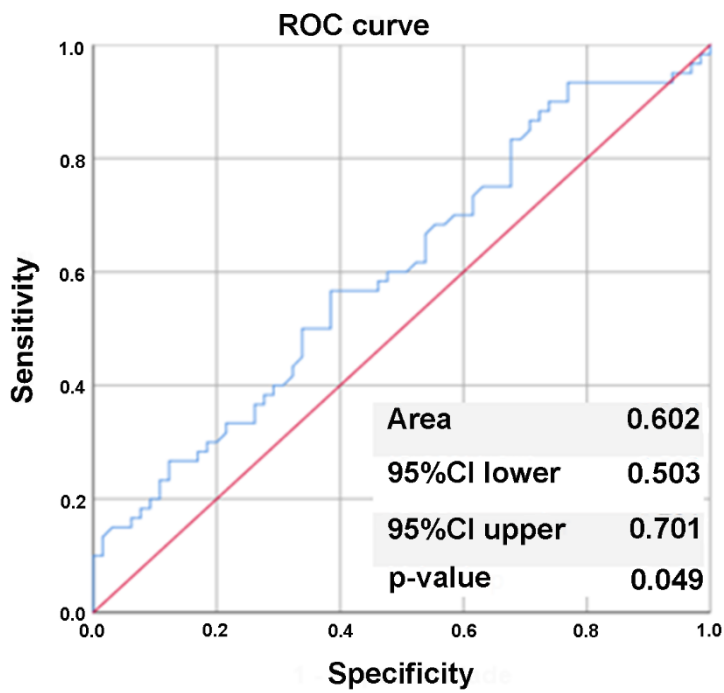


Figure 2. NLR area under the ROC curve for predicting usCRP in follow-up

Discussion

We assessed the relationship between NLR and CCS and between NLR and usCRP to determine whether this simple ratio of the number of neutrophils to the number of lymphocytes could predict cardiovascular risk as well as these two established risk markers. Our study revealed that, in men free of coronary artery disease, an increase in NLR was independently associated with an increase in usCRP but not CCS.

Atherosclerosis, the main cause of CAD, is not just a passive lesion caused by the deposition of lipids and other substances in vascular walls, but an active inflammatory process in which neutrophils play a fundamental role. Drechsler et al. demonstrated that early stages of atherosclerosis are linked to neutrophilia. Neutrophils infiltrate atherosclerotic plaque, releasing pro-oxidant and pro-thrombotic substances, which leads to endothelial damage and platelet aggregation, activating an inflammatory cascade that plays a central role in the onset and progression of atherosclerotic plaque (23). Neutrophils also play an important role in plaque destabilization and cardiac decompensation. The propensity to plaque destabilization due to rupture or erosion is indirectly proportional to the fibrous collagen layer, i.e. the thinner this layer is, the greater the chance of rupture. Neutrophils contain a large number of degrading proteases from this matrix, so by releasing these proteolytic enzymes and superoxide radicals, they make plaque more vulnerable and susceptible to acute coronary syndromes (24). It is believed that after migration into the vessel wall, neutrophils also cause proinflammatory and atherogenic effects by interacting with other cell types, such as platelets, monocytes and macrophages (25).

It is well established that coronary artery disease involves an inflammatory state. Thus, high levels of inflammatory markers have been associated with a higher incidence of cardiovascular disease (26).

NLR is an inflammatory biomarker that has emerged as a new predictor of cardiovascular risk in some settings. It has been shown to be elevated in patients with

traditional risk factors that have an established association with CAD, such as advanced age (27), hypertension (28), diabetes (29) and hypercholesterolemia (30).

A direct relationship between NLR and CAD itself has also been demonstrated, including predictive and prognostic value. Verdoia et al., in a study of 3,738 patients undergoing coronary angiography, concluded that NLR was associated with the extent and severity of CAD due to the direct relation between NLR and CAD prevalence ($P = 0.001$) and severity ($P < 0.001$), given that a high NLR was associated with multivessel disease, a higher degree of coronary stenosis, coronary calcifications and intracoronary thrombus ($P < 0.001$) (31). NLR also predicted of all-cause mortality and cardiovascular mortality in patients with acute coronary syndrome (14), chronic CAD (15), diabetes mellitus (16), and in those undergoing cardiac catheterization (17). A study conducted in Beijing with a sample of 598 adults with chest pain who underwent coronary angiography found that patients with mixed or non-calcified plaques, which are known to be more prone to rupture or instability, had a higher NLR than those with calcified or no plaques ($P < 0.05$). They also demonstrated that patients with coronary stenosis $> 50\%$ had a higher NLR than those with non-significant stenosis ($P < 0.001$) (30). Ergelen et al. studied a cohort of 2,410 patients with ST-elevation acute coronary syndromes and found that $NLR > 6.97$ was associated with higher in-hospital (5% vs. 1.4%, $P < 0.001$) and long-term (7% vs. 4.8%, $P = 0.02$) cardiovascular mortality (32). Thus, all these studies corroborate NLR as a marker of both the presence and severity of CAD, being directly associated with prognosis and outcomes.

Modern cardiology employs a wide variety of markers to stratify cardiovascular risk and some, such as CCS and usCRP, have been well studied and established, while others, such as NLR, are still being studied. NLR seems to be associated with the severity and prognosis of CAD, but its maximum predictive value in asymptomatic CVD free individuals has not yet been determined (18,19).

One of these tools, CCS, is considered the gold standard for cardiovascular risk stratification and has been shown to be independent predictor of cardiovascular events (33). The score, originally developed by Agatston et al., quantifies coronary artery calcification, a marker of atherosclerosis (34). The potential of CCS for stratifying cardiovascular risk lies in the fact that calcification occurs almost exclusively in the context of atherosclerotic disease. In a given individual, the amount of calcification in the coronary arteries has a good correlation with the total coronary atherosclerotic load, as well as with the magnitude of atherosclerotic plaque and the subsequent development of cardiovascular events (35,36). Several longitudinal population studies with large samples have shown that CCS has a significant association with major cardiovascular events, such as all-cause mortality, cardiovascular mortality and non-fatal AMI, both in medium- and long-term follow-up (12). However, CCS is expensive and not widely available and, thus, it is unavailable for most Brazilian patients.

UsCRP, which is more accessible and available in Brazil, also seems to be the inflammatory biomarker most capable of predicting cardiovascular events. In 1997, Ridker et al. demonstrated a strong association between high usCRP levels and cardiovascular outcomes, with the relative risk of future AMI in healthy subjects increasing by 38% with each quartile increase in usCRP ($P = 0.001$) (8). In the large ULSAM study, the authors demonstrated that, even when compared with other robust biomarkers such as troponin I, NT-pro-BNP and cystatin C, usCRP was the best independent predictor of fatal cardiovascular events and all-cause mortality, with an incremental score based on traditional risk factors (9). A case-control study on 2459 patients with a history of AMI or death from coronary heart disease and 3969 controls with no history of CAD found that, in a mean follow-up period of 18 years, patients with CRP in the upper third (> 2.0 mg/L) had a significantly higher risk of developing CVD than patients in the lower third (<0.78 mg/L) (OR 1.92) (37). In another case-control study of healthy men, Sakkinen et al. observed that usCRP was a strong predictor of 20-year AMI risk (11). Many prospective epidemiological studies involving individuals

with no previous history of cardiovascular disease have shown that a single measure of usCRP is a strong predictor of future cardiovascular events. Mendall et al. followed up 1395 men for a mean of 13 years, observing a positive association between CRP and CAD ($P < 0.005$), as well as a strong positive association between CRP and fatal AMI ($P = 0.0019$) (10).

We found an association between usCRP and NLR, with an OR of 2.05 ($P = 0.01$) at baseline and 2.81 ($P = 0.02$) at follow-up. NLR had an area under the ROC curve of 0.602 for predicting usCRP. Our findings are in agreement with Shah et al., who found a Spearman correlation coefficient of 0.11 between NLR and usCRP, thus indicating some degree of association, even if weak (6).

Other findings in our study were the significant association between CCS and advanced age ($P = 0.015$), physical inactivity ($P = 0.021$) and higher blood glucose levels ($P = 0.023$), conditions known to be associated with increased cardiovascular risk. In addition to being associated with NLR, we found that usCRP was also associated with higher BMI ($P = 0.001$), a finding that has already been demonstrated in the literature by other large studies (38,39).

Our study has many limitations. The fact that the sample was not random but consisted of volunteers already indicates a possible selection bias. Our sample did not have sufficient power to show an association with CCS or clinical outcomes.

Therefore, the hypothesis that NLR, a simple inflammatory marker whose testing is widely available, routine and low cost, could be used as a marker of cardiovascular risk is indeed plausible, since it is associated with usCRP, a robust marker with an established role in estimating cardiovascular risk.

References

1. Brasil. Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. Doenças cardiovasculares. https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096. Accessed January 06, 2020.
2. Freire CMV, Alcantara ML, Santos SN, Amaral SI, Veloso O, Porto CLL, et al. Recomendação para a quantificação pelo ultrassom da doença aterosclerótica das artérias carótidas e vertebrais: grupo de trabalho do Departamento de Imagem Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – DIC – SBC. *Arq Bras Cardiol: Imagem Cardiovasc* 2015; 28: e1- e64.
3. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
4. Mamudu HM, Paul TK, Veeranki SP, Budoff M. The effects of coronary artery calcium screening on behavioral modification, risk perception, and medication adherence among asymptomatic adults: A systematic review. *Atherosclerosis* 2014; 236: 338-350.
5. Joshi PA, Nasir K. Discordance between risk factors and coronary artery calcium: Implications for guiding treatment strategies in primary prevention settings. *Prog Cardiovasc Dis* 2015; 58: 10-18.
6. Shah N, Parikh V, Patel N, Patel N, Badheka A, Deshmukh A, et al. Neutrophil lymphocyte ratio significantly improves the Framingham risk score in prediction of coronary heart disease mortality: insights from the National Health and Nutrition Examination Survey-III. *Int J Cardiol* 2014; 171: 390-397.
7. Greenland P, Smith Jr SC, Grundy SM. Improving coronary heart disease risk assessment in asymptomatic people: role of traditional risk factors and noninvasive cardiovascular tests. *Circulation* 2001; 104: 1863-1867.

8. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 1998; 97: 2007-2011.
9. Zethelius B, Berglund L, Sundström J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A, et al. Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2008; 358: 2107-2116.
10. Mendall MA, Strachan DP, Butland BK, Ballam L, Morris J, Sweetnam PM, et al. C-reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular risk factors in men. *Eur Heart J* 2000; 21: 1584-1590.
11. Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, Rodriguez BL, Yano K, Tracy RP. C-reactive protein and myocardial infarction. *J Clin Epidemiol* 2002; 55: 445-451.
12. Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, Weinstein SR, Mosler TP, Tseng PH, et al. Long-term prognosis associated with coronary calcification: Observations from a registry of 25,253 patients. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1860-1870.
13. Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, Budoff MJ, Eisenberg MJ, Grundy SM, et al. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the American College of Cardiology Foundation Clinical Expert Consensus Task Force (ACCF/AHA Writing Committee to Update the 2000 Expert Consensus Document on Electron Beam Computed Tomography). *Circulation* 2007; 115: 402-426.
14. Azab B, Zaher M, Weiserbs KF, Torbey E, Lacossiere K, Gaddam S, et al. Usefulness of neutrophil to lymphocyte ratio in predicting short- and long-term mortality after non-ST-elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2010; 106: 470-476.
15. Papa A, Emdin M, Passino C, Michelassi C, Battaglia D, Cocci F. Predictive value of elevated neutrophil-lymphocyte ratio on cardiac mortality in patients with stable coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2008; 395: 27-31.

16. Azab B, Chainani V, Shah N, McGinn JT. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of major adverse cardiac events among diabetic population: a 4-year follow-up study. *Angiology* 2013; 64: 456-465.
17. Horne BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, et al. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1638-1643.
18. Bhat T, Teli S, Rijal J, Bhat H, Raza M, Khoueiry G, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and cardiovascular diseases: a review. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2013; 11: 55-59.
19. Nilsson L, Wieringa WG, Pundziute G, Gjerde M, Engvall J, Swahn E, et al. Neutrophil/Lymphocyte ratio is associated with non-calcified plaque burden in patients with coronary artery disease. *PLoS One* 2014; 9: e108183.
20. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA Guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* 2019; 140: e596-e646.
21. Ridker PM. A test in context: High-sensitivity C-reactive protein. *J Am Coll Cardiol* 2016; 67: 712-723.
22. Hecht HS. Coronary artery calcium scanning: past, present, and future. *JACC Cardiovasc Imaging* 2015; 8: 579-596.
23. Drechsler M, Megens RTA, Van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* 2010; 122: 1837-1845.
24. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins. *FASEB J* 2001; 15: 1149-1157.
25. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 539-552.

26. Folsom AR, Aleksic N, Catellier D, Juneja HS, Wu KK. C-reactive protein and incident coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Am Heart J* 2002; 144: 233-238.
27. Li J, Chen Q, Luo X, Hong J, Pan K, Lin X, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio positively correlates to age in healthy population. *J Clin Lab Anal* 2015; 29: 437-443.
28. Karaman M, Balta S, Seyit Ahmet AY, Cakar M, Naharci I, Demirkol S, et al. The comparative effects of valsartan and amlodipine on vWf Levels and N/L ratio in patients with newly diagnosed. *Clin Exp Hypertens* 2013; 35: 516-522.
29. Lee G-K, Lee L-C, Chong E, Lee C-H, Teo S-G, Chia B-L, et al. The long-term predictive value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in type 2 diabetic patients presenting with acute myocardial infarction. *QJM* 2012; 105: 1075-1082.
30. Li T, Gu C, Wang F, Lv B, Zhang C, Peng R, et al. Association of neutrophil-lymphocyte ratio and the presence of noncalcified or mixed coronary atherosclerotic plaques. *Angiology* 2017; 69: 256-263.
31. Verdoia M, Barbieri L, Di Giovine G, Marino P, Suryapranata H, De Luca G, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and the extent of coronary artery disease: results from a large cohort study. *Angiology* 2016; 67: 75-82.
32. Ergelen M, Uyarel H, Altay S, Kul Ş, Ayhan E, Isik T, et al. Predictive value of elevated neutrophil to lymphocyte ratio in patients undergoing primary angioplasty for ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin Appl Thromb Hemost* 2013; 20: 427-432.
33. Divakaran S, Cheezum MK, Hulten EA, Bittencourt MS, Silverman MG, Nasir K, et al. Use of cardiac CT and calcium scoring for detecting coronary plaque: implications on prognosis and patient management. *Br J Radiol* 2015; 88: 20140594.
34. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte Jr M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15: 827-832.

35. Budoff MJ, Achenbach S, Blumenthal RS, Carr JJ, Goldin JG, Greenland P, et al. Assessment of coronary artery disease by cardiac computed tomography: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Cardiovascular Imaging and Intervention, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, and Committee on Cardiac Imaging, Council on Clinical Cardiology. *Circulation* 2006; 114: 1761-1791.
36. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, et al. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med* 2008; 358: 1336-1345.
37. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eirikdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 1387-1397.
38. Woodward M, Huxley R, Ueshima H, Fang X, Kim HC, Lam TH. The Asia pacific cohort studies collaboration: a decade of achievements. *Glob Heart* 2012; 7: 343-351.
39. Manson JE, Willet WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, et al. Body weight and mortality among women. *N Engl J Med* 1995; 333: 677-685.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aterosclerose, que é a principal causa de DAC, é uma doença inflamatória que resulta de uma interação complexa entre fatores de risco, exposições ambientais e suscetibilidade genética. A aterosclerose coronária inicia em uma fase subclínica e avança lentamente ao longo de anos antes do desenvolvimento de eventos clínicos cardiovasculares. Dispomos de uma grande variedade de marcadores para estratificar risco cardiovascular na cardiologia moderna, alguns já amplamente estudados e consagrados, como o ECAC e a PCR US, e outros ainda sendo estudados, como a RNL.

A RNL é um biomarcador inflamatório que vem emergindo como um novo preditor de risco cardiovascular em alguns cenários. Já foi demonstrado que ela se encontra elevada em pacientes portadores dos tradicionais fatores de risco que possuem associação estabelecida com DAC, como idade avançada, hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia. Nós avaliamos a relação entre RNL e ECAC e entre RNL e PCR US para determinar se esta simples relação entre o número de neutrófilos pelo número de linfócitos poderia prever risco cardiovascular tão bem quanto esses dois marcadores de risco já consagrados. Nosso estudo revelou que, em homens livres de doença arterial coronariana, um aumento na RNL foi associado independentemente com um aumento da PCR US, mas não com o ECAC

Portanto, a hipótese de que a RNL, um simples marcador inflamatório, amplamente disponível, rotineiramente executado e de baixo custo, pode vir a ser utilizado como marcador de risco cardiovascular é plausível, já que tem associação com PCR-US, um marcador robusto com seu papel já consagrado na estimação do risco cardiovascular.