

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

Roberta Vanalli Baroni

Aspectos funcionais da lipoproteína de alta densidade (HDL) em indivíduos com nível baixo de HDL-colesterol com ou sem doença arterial coronária

São Paulo

2024

Roberta Vanalli Baroni

Aspectos funcionais da lipoproteína de alta densidade (HDL) em indivíduos com nível baixo de HDL-colesterol com ou sem doença arterial coronária

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Programa: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Baroni, Roberta Vanalli

Aspectos funcionais da lipoproteína de alta densidade (HDL) em indivíduos com nível baixo de HDL-colesterol com ou sem doença arterial coronária / Roberta Vanalli Baroni; Raul Cavalcante Maranhão, orientador. -- São Paulo, 2024.

Tese (Doutorado) - Programa de Cardiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2024.

1. Metabolismo de lipídeos 2. HDL 3. HDL-colesterol 4. Colesterol 5. Doença da artéria coronariana 6. Lipoproteínas HDL 7. Saúde do homem I. Maranhão, Raul Cavalcante, orient. II. Título

USP/FM/DBD-128/24

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB/8 7533

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Wilson Roberto Baroni** e **Eliza Benedita Vanalli Baroni**, por todo apoio e incentivo que nunca me faltaram em todas as minhas escolhas, sem medirem esforços para que eu tivesse a melhor formação possível. O apoio, dedicação e amor que me deram durante toda a vida foram essenciais para eu chegar até aqui. Vocês são incríveis, meu amor por vocês é imensurável. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, por ter me aceito em seu laboratório inicialmente como estagiária e posteriormente como meu orientador do doutorado. Sua orientação e ensinamentos foram essenciais para a realização deste trabalho e para o meu desenvolvimento científico.

À Dra. Thauany Martins Tavoni pela dedicação e participação no trabalho, me incentivando e sempre disponível para tirar minhas dúvidas e aflições no decorrer do trabalho.

À Dra. Fatima Rodrigues Freitas por toda ajuda no planejamento, organização e realização de experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Metabolismo e Lípidos do InCor pela contribuição com este trabalho e por todas as conversas e trocas que tivemos ao longo desses anos.

Ao querido Wanderley Gomes, meu muito obrigado pela ajuda com as coletas de sangue dos participantes, mas principalmente pelas palavras de carinho e incentivo que foram sempre tão importantes para mim.

Aos meus queridos doutores Camila, Dalila, Natália e Pedro, que começaram como amigos de laboratório e se tornaram meus amigos de vida. Vocês foram essenciais para tornar essa jornada mais leve, seja ajudando no desenvolvimento do trabalho, dando apoio emocional, mas também por toda troca e aprendizado que me proporcionaram também fora do laboratório. Vocês são incríveis, obrigada por tudo!

Aos meus parceiros de laboratório Aline e Maurício, por toda ajuda, conversas e trocas que tivemos nas diversas horas que passamos no biotério e na bancada do laboratório.

Aos amigos que fiz ao longo dessa jornada Gustavo, Karen e Nathalia, obrigada por todas as conversas dentro e fora dos corredores do hospital e por todo apoio.

Ao Dr. Whady Armindo Hueb por me receber em sua unidade e por permitir uma parceria que foi fundamental para a realização e enriquecimento deste trabalho.

À toda a equipe da Unidade de Pesquisa MASS do InCor, em especial as queridas Eliana e Marcela, por toda paciência e ajuda que me proporcionaram, e

também pelas conversas gostosas e incentivo que nunca me faltaram. Vocês são demais! Além disso, não posso deixar de mencionar o Dr. Paulo Cury Rezende, pelas palavras amigas e por toda assistência, principalmente participando da minha banca de qualificação.

Ao Dr. Luiz Antônio Machado César e a Dra. Adriana Bertolami também pela participação na minha banca de qualificação, trazendo contribuições importantes para o trabalho.

À Profa. Dra. Nágila Damasceno e a Dra. Rosana Freitas que me abriram as portas do departamento de nutrição e me permitiram aprender um novo método, que ajudou a enriquecer este trabalho.

Aos funcionários queridos do serviço de Pós Graduação de Cardiologia do InCor, Valdecira, Luana, Mônica e Sidnei por toda ajuda e paciência, sempre dispostos a esclarecer as mais diferentes dúvidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Um agradecimento especial a todos os pacientes que aceitaram participar voluntariamente deste trabalho e, além disso, por me proporcionarem conhecer um pouquinho da história de vida de cada um. Sem eles, a realização deste trabalho não teria sido possível.

À minha querida família, pais, tios, primos e meu namorado, por todo amor que nunca me faltou e por todo apoio e carinho que me foi necessário para a finalização deste trabalho.

“Se quiser ir rápido, vá sozinho. Se quiser ir longe, vá em grupo.”

Provérbio Africano

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da USP. Parte I (ABNT)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Ana Paula Calabrez, Giselle Adornato de Aguiar, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Maria Aparecida Laet, Maria Marta Nascimento. 4ª ed. São Paulo: Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica. 2020.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1
APO	Apolipoproteína
BRA	Bloqueador de receptor de angiotensina
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CF	Classe funcional
CL	Colesterol livre
CTL	Controle
DAC	Doença arterial coronária
DCV	Doença cardiovascular
ECA	Enzima conversora de angiotensina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IMC	Índice de massa corpórea
LCAT	Lecitina colesterol acil transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
PON1	Paraoxonase 1
SR-B1	Scavenger receptor classe B tipo 1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem obtida durante a análise das subfrações da HDL	28
Figura 2- Gráfico obtido durante a análise da capacidade antioxidante da HDL	31
Figura 3- Fluxograma de pacientes	33
Figura 4- Subfrações de HDL de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Idade, dados antropométricos, características clínicas e medicamentos de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).....	34
Tabela 2- Concentração plasmática de lípides e apolipoproteínas de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).....	35
Tabela 3- Diâmetro da HDL, concentração de CETP e LCAT e transferência de colesterol para HDL de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).....	36
Tabela 4- Atividade da paraoxonase 1 e atividade antioxidante da HDL de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).....	36
Tabela 5- Dados de correlação de ambos os grupos estudados.....	38
Tabela 6- Dados de correlação de ambos os grupos estudados.....	38

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	24
3. MÉTODOS	25
3.1. Casuística e delineamento do estudo	25
3.2. Cálculo do tamanho da amostra.....	25
3.3. Critérios de inclusão	26
3.4. Critérios de exclusão	26
3.5 Determinações bioquímicas.....	27
3.6 Determinação do diâmetro da partícula de HDL.....	27
3.7 Subfrações de HDL	28
3.8 Ensaio de transferência de colesterol de uma nanopartícula lipídica artificial para a HDL	29
3.9 Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON1).....	30
3.10 Determinação da atividade antioxidante da HDL.....	30
3.11 Determinação da concentração de CETP e de LCAT	31
3.12 Análise estatística	32
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS	46

RESUMO

Baroni RV. Aspectos funcionais da lipoproteína de alta densidade (HDL) em indivíduos com nível baixo de HDL-colesterol com ou sem doença arterial coronária [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Introdução: Diversos estudos epidemiológicos demonstraram a associação inversa entre o colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-C) e a incidência de doença arterial coronária (DAC) em diversas populações. Entretanto, além da determinação do HDL-C, a exploração dos aspectos funcionais da HDL, como a capacidade de receber colesterol, tem-se mostrado de grande importância na avaliação da capacidade protetora desta lipoproteína contra o desenvolvimento da DAC. Nosso laboratório desenvolveu um ensaio *in vitro* prático para avaliar a transferência de colesterol para a HDL, um processo fundamental na formação e maturação da lipoproteína, e que também está envolvido no transporte reverso de colesterol. Com o emprego do ensaio foi mostrado que em indivíduos com DAC a transferência de colesterol para HDL está diminuída. Nesse contexto, é interessante verificar se a presença de DAC em homens com HDL-C baixo tem diferenças nos aspectos funcionais da HDL, como transferência de colesterol e atividade da PON1, enzima antioxidante da fração HDL e aspectos físicos, como tamanho das partículas e perfil das subfrações da HDL. **Objetivo:** Investigar se a presença ou a ausência de DAC estão associadas a diferenças nas taxas de transferência de colesterol para a HDL, na função antioxidante da HDL, atividade da paraoxonase 1 (PON1) e em aspectos físicos da HDL em homens com HDL-C baixo. **Métodos:** Foram selecionados 46 homens, entre 50 e 76 anos, que apresentam HDL-C baixo (20-40 mg/dL). Os participantes foram divididos em dois grupos: com (n=25, grupo DAC) ou sem (n=21, grupo CTL) presença de DAC. Após 12 horas de jejum, foram coletadas amostras de sangue para determinação dos lípides e apolipoproteínas plasmáticas, diâmetro e subfrações de HDL, atividade da PON1, função antioxidante da HDL, bem como as concentrações da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) e da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT). O ensaio de transferência das formas livre (CL) e esterificada (CE) do colesterol de uma emulsão lipídica artificial para a HDL foi realizado através da incubação do plasma com uma nanopartícula artificial doadora de colesterol radioativo. Após a precipitação química, foi feita a contagem da radioatividade. **Resultados:** LDL-C, não-HDL-C e triglicérides foram semelhantes entre DAC e CTL. HDL-C foi menor em DAC (p=0,0156). Apo A-I foi semelhante,

mas apo B foi maior em DAC do que em CTL ($p=0,0464$). Em relação às funções da HDL, a transferências de colesterol livre e esterificado para HDL não foram diferentes entre os dois grupos. Ao corrigir o valor das transferências pelo HDL-C, as taxas de transferência tanto de CE ($p=0,0034$), quanto de CL ($p=0,0021$), foram maiores no grupo DAC em comparação ao grupo CTL. A capacidade antioxidante da HDL também foi semelhante, assim como a atividade da enzima antioxidante PON1. A concentração de CETP tendeu não significativamente a ser maior em DAC ($p=0,062$) enquanto a concentração de LCAT não foi diferente. O tamanho das partículas de HDL e as subfrações pequenas e grandes foram semelhantes, embora as subfrações intermediárias foram menores em DAC ($p=0,0091$). **Conclusão:** Em indivíduos com HDL-C baixo, as transferências de colesterol para HDL e a função antioxidante não foram preditores de DAC, mas os clássicos HDL-C e apo B foram marcadores e podem ter desempenhado um papel no desenvolvimento de DAC.

Palavras-chave: Metabolismo de lipídeos. HDL. HDL-colesterol. Colesterol. Doença da artéria coronariana. Lipoproteínas HDL. Saúde do homem.

ABSTRACT

Baroni RV. Functional aspects of the high-density lipoprotein (HDL) in individuals with low levels of HDL-cholesterol with and without coronary artery disease [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Background: Several epidemiological studies have demonstrated the inverse association between the high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and the incidence of coronary artery disease (CAD), in different populations. However, in addition to HDL-C determination, exploration of functional aspects of HDL, such as the ability to receive cholesterol, have been shown to be of great importance in the evaluation of protective capacity of this lipoprotein against the development of CAD. Our laboratory developed a practical *in vitro* assay to evaluate the transfer of cholesterol to HDL, a fundamental process in the formation and maturation of the lipoprotein, and which is also involved in reverse cholesterol transport. With the use of the assay, it was shown that in individuals with CAD, the transfer of cholesterol to HDL is reduced. In this context, it is interesting to verify whether the presence of CAD in individuals with low HDL-C has differences in the functional aspects of HDL, such as cholesterol transfer and paraoxonase 1 (PON1) activity, antioxidant enzyme of HDL fraction and physical aspects, such as particle size and subfraction profile of the HDL. **Aim:** Investigate whether the presence or absence of CAD is associated with differences in cholesterol transfer rates to HDL, in HDL antioxidant activity, PON1 activity and on physical aspects of HDL in men with low HDL-C. **Methods:** 46 men were selected, between 50 to 76 years old, who had low HDL-C (20-40 mg/dL). Participants were divided into two groups: with (n=25, CAD group) or without (n=21, CTL group) presence of CAD. After 12 hours of fasting, blood samples were collected for determination of plasma lipids and apolipoproteins, HDL diameter and subfractions, PON1 activity, antioxidant function of HDL, as well as cholesteryl ester transfer protein (CETP) and lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) concentrations. The transfer assay of unesterified (UC) and esterified (EC) forms of cholesterol from an artificial lipid emulsion to HDL was carried out by incubating plasma with an artificial radioactive cholesterol donor nanoparticle. After chemical precipitation, radioactivity was counted. **Results:** LDL-C, non-HDL-cholesterol and triglycerides were equal in CAD and non-CAD. HDL-C was lower in CAD (p=0,0156). Apo A-I was equal but apoB was higher in CAD than in non-CAD (p=0,0464). Regarding HDL functions, the transfer of both unesterified and esterified

cholesterol to HDL were not different between the two groups. When correcting for HDL-C levels, the transfer rates of both EC ($p=0.0034$) and UC ($p=0.0021$) were higher in the CAD group compared to the CTL group. HDL anti-oxidant capacity was also equal, as well as activity of anti-oxidant enzyme paraoxonase-1. CETP concentration was non-significantly higher in CAD ($p=0,062$) while LCAT concentration was not different. HDL particle size and the small and the large HDL subfractions were equal, although the intermediate subfraction was lower in CAD ($p=0,0091$). **Conclusion:** In those individuals with low HDL-C, cholesterol transfer to HDL and antioxidant function were not CAD predictors, but classical HDL-C and apoB were markers and could have had role in CAD development.

Keywords: Lipid metabolism. HDL. HDL-cholesterol. Cholesterol. Coronary artery disease. Lipoprotein HDL. Men's health.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas as principais causas de mortalidade e morbidade, tendo a prevalência da doença quase dobrado entre 1990 e 2019. Dentre as DCV, a doença arterial coronária (DAC) é reconhecida como a principal causa de mortalidade (ROTH et al., 2020).

A DAC tem caráter inflamatório, crônico e progressivo (ROSS, 1999). Suas manifestações clínicas são representadas por angina estável, angina instável, infarto do miocárdio e até mesmo morte súbita (MALAKAR et al., 2019). Os principais fatores de risco de DAC são o tabagismo (OCKENE; MILLER, 1997), diabetes (HAFFNER et al., 1998), hipertensão (MACMAHON, 1990) e a dislipidemia (VERSCHUREN et al., 1995), sendo essa última caracterizada principalmente por elevada concentração de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e baixa concentração de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-C). Outras condições médicas e estilo de vida, como inatividade física (BERLIN; COLDITZ, 1990), obesidade (PROSPECTIVE STUDIES COLLABORATION, 2009) e consumo excessivo de álcool (REHM; GREENFIELD; ROGERS, 2001), podem levar ao maior risco de desenvolvimento de DAC.

A prevalência da DAC aumenta com a idade, tendo maior morbidade e mortalidade no sexo masculino do que no feminino (NOWBAR et al., 2019), pelo menos até alguns anos após a menopausa, quando o risco de DAC se assemelha em ambos os sexos (LERNER; KANNEL, 1986; YAHAGI et al., 2015). A incidência da doença, geralmente, tem como idade inicial acima de 45 anos para homens e acima de 55 anos para mulheres (LERNER; KANNEL, 1986). Além dos homens terem maiores chances de desenvolvimento de DAC, estes também apresentam menores concentrações de HDL-C e maiores concentrações de triglicérides e de LDL-C (JOUSILAHTI et al., 1999; WILLIAMS, 2004; MADSSSEN et al., 2013;).

A aterosclerose caracteriza-se pela alteração no metabolismo dos lípidos plasmáticos, sendo o LDL-C elevado um dos principais fatores de risco (FERENCE et al., 2017). A exposição constante da artéria ao excesso de LDL-C é um dos determinantes do início e progressão das placas ateroscleróticas. Nas fases iniciais da lesão, grande quantidade de LDL-C se acumula na camada íntima da artéria, devido ao comprometimento do endotélio. As partículas de LDL que ficam acumuladas podem

sofrer o processo de oxidação no espaço subendotelial. Citocinas liberadas no processo promovem a migração de monócitos circulantes para a camada íntima (LIBBY et al., 2019). Quando na íntima, monócitos diferenciam-se em macrófagos e fazem a captação da LDL oxidada, resultando na formação de células espumosas (HANSSON; ROBERTSON; SÖDERBERG-NAUCLÉR, 2006). Linfócitos também entram na camada íntima e regulam funções do sistema imune que permitem a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima da artéria. Como resultado tem-se a formação de placas fibrosas com núcleo necrótico, que posteriormente podem ser calcificadas. Com a progressão da placa, ocorre a obstrução da artéria e o fluxo sanguíneo do local é reduzido, resultando em necrose tecidual (BENTZON et al., 2014). A formação das placas ateroscleróticas na artéria coronária pode ocorrer ainda na juventude, porém, sua ocorrência e manifestações clínicas são maiores em indivíduos mais velhos (STRONG, 1999).

Visando reduzir o risco de desenvolvimento de DAC, terapias com uso de agentes redutores de lípidos, como as estatinas, são utilizadas na prevenção primária e secundária de pacientes. Essa classe de medicamento atua diminuindo as concentrações de LDL-C, através da inibição da HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase), atuando e diminuindo diretamente a produção de colesterol e aumentando a expressão de receptores de LDL no fígado. As estatinas ainda atuam no HDL-C, podendo elevar suas taxas, mas com pequeno aumento percentual geral (FALUDI et al., 2017; MARON et al., 2000). Apesar da redução do LDL-C ser o principal alvo no tratamento da dislipidemia, elevadas concentrações de triglicérides e baixas concentrações de HDL-C também são importantes fatores de risco cardiovascular (GAW, 2003).

A concentração de HDL-C é um fator de risco independente para DAC (GORDON et al., 1989; BARTER et al., 2003; DUFFY; RADER, 2009) e o aumento em 1 mg/dL de HDL-C está associado com redução de risco para DAC em até 3% (GORDON et al., 1989). Na década de 90, descobriu-se que mutações na proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), proteína que transfere colesterol e triglicérides entre as classes de lipoproteínas, resultam em hiperalfalipoproteinemia. (INAZU et al., 1990, 1994). Em outras palavras, resultam em aumentada concentração de HDL-C circulante. Devido a essas associações, foram realizados estudos de intervenção randomizados utilizando-se drogas como niacina e inibidores da CETP para

aumentar as concentrações de HDL-C. Com essa estratégia, pretendia-se diminuir o risco de desfechos cardiovasculares, mas esses estudos tiveram resultados pouco convincentes.

O “Coronary Drug Project” foi o primeiro estudo randomizado a mostrar que a niacina é capaz de diminuir eventos cardiovasculares, incluindo mortalidade (“Clofibrate and niacin in coronary heart disease.”, 1975). Vale ressaltar, que o estudo foi realizado antes da introdução das estatinas e de outros tratamentos. Já em estudos mais recentes, pacientes tratados com niacina apresentaram aumento de HDL-C e diminuição de LDL-C, mas não apresentaram redução de eventos, mesmo com a terapia combinada com estatinas (AIM-HIGH INVESTIGATORS; et al., 2011; HAYNES et al., 2013).

No caso dos inibidores de CETP, no estudo ILLUMINATE, o uso do torcetrapib elevou o HDL-C em 72% e reduziu o LDL-C em até 25%. Porém, o estudo teve de ser interrompido devido ao aumento de mortalidade (BARTER et al., 2007). Já no estudo Dal-OUTCOMES, o uso do dalcetrapib obteve resultado neutro, não resultando em diferença quanto a reincidência de eventos cardiovasculares, apesar do aumento de 40% no HDL-C (SCHWARTZ et al., 2012).

Apesar dos resultados negativos obtidos com o uso do torcetrapib e do dalcetrapib, um estudo mais recente mostra os resultados obtidos com o uso de um novo inibidor de CETP, o obicetrapib, originalmente conhecido pela sigla TA-8995. Visando reduzir significativamente as concentrações de LDL-C e apolipoproteína (apo) B, o obicetrapib também foi capaz de aumentar as concentrações de HDL-C e apo A-I. Porém, esses resultados são preliminares, uma vez que os estudos se encontram em fase II, sendo ainda necessário melhor avaliação da segurança de seu uso e benefícios clínicos associados (HOVINGH et al., 2015; NICHOLLS et al., 2022).

Em estudos mais recentes observa-se, ainda, uma relação não linear, em “forma de U” (“U-shaped”), entre os valores de HDL-C e o risco de mortalidade cardiovascular. O HDL-C acima de 90 mg/dL está relacionado com maior risco de mortalidade cardiovascular. O HDL-C muito alto pode estar associado a defeitos no metabolismo da lipoproteína, não propiciando proteção cardiovascular; às vezes, constitui-se até em fator de risco (MADSEN; VARBO; NORDESTGAARD, 2017).

Indivíduos que carregam uma mutação (Arg173Cysteine) na apo A-I, chamada de apo A-I Milano, apresentam baixa prevalência de DCV, mesmo apresentando baixas concentrações de HDL-C e apo A-I (SIRTORI et al., 2001). Esse fenômeno trouxe uma nova possibilidade de tratamento. Em modelos experimentais, a terapia endovenosa com apo A-I Milano recombinante apresentou efeitos anti-inflamatórios e ateroscleróticos, diminuindo a progressão da placa aterosclerótica e o conteúdo de macrófagos nas lesões (AMELI et al., 1994; SHAH et al., 1998, 2001). Indivíduos que receberam esta terapia apresentaram regressão de placa coronariana (NISSEN et al., 2003). No entanto, outra terapia utilizando-se apo A-I humana recombinante (CER-001), falhou em demonstrar qualquer redução em conteúdo de placa de aterosclerose coronária (TARDIF et al., 2014).

Esses resultados contrastantes geram debates sobre o real benefício de se avaliar HDL-C plasmático como fator protetor contra DAC, visto que indivíduos que desenvolvem a doença podem ter concentrações de HDL-C normais ou até mesmo elevadas. Portanto, a avaliação das funções da HDL, bem como sua formação e metabolismo podem melhor descrever a relação desta partícula com a DAC.

A HDL é a menor e mais densa das lipoproteínas, tendo um metabolismo complexo. Apresenta tamanho médio de 5 a 17 nm e densidade de 1.063-1.21 g/ml (MÄRZ et al., 2017). Constituída de um núcleo hidrofóbico que contém colesterol esterificado (CE) e triglicérides e rodeado por uma monocamada hidrofílica de colesterol livre (CL) e proteínas, as quais conferem solubilidade a este macrocomplexo (BARTER et al., 2003).

A formação da HDL ocorre no compartimento intravascular pela lipidação da apo A-I, sua principal proteína. A apo A-I é formada no fígado e intestino e secretada na circulação como uma partícula livre de lípidos (SEGREST; HARVEY; ZANNIS, 2000). O transportador ATP-binding cassette transporter A 1 (ABCA1) promove o transporte de fosfolípidos e colesterol em sua forma livre para a apo A-I, formando uma partícula discóide, a pré- β -HDL, a forma nascente da HDL. A captação de colesterol livre e de fosfolípidos pela apo A-I, também pode ocorrer durante o processo de lipólise das lipoproteínas ricas em triglicérides (CASTRO; FIELDING, 1988). Essa HDL discóide é convertida em uma partícula maior e esférica, pela ação da enzima lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT), da qual a apo A-I é co-fator, responsável por esterificar o colesterol de sua forma livre. O processo de esterificação ocorre com a transferência de

um ácido graxo da posição -2 da lecitina para o grupo hidroxila da molécula de colesterol (GLOMSET, 1962). Nesse processo o CE que é mais hidrofóbico que o CL se orienta para o núcleo da lipoproteína, ação que permitirá a formação de uma HDL madura (CUCHEL; RADER, 2006). A HDL madura continua a receber colesterol e fosfolípides de membranas celulares via receptor scavenger classe B tipo 1 (SR-B1) ou por transportadores ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1). O conteúdo de CE da HDL é diretamente transportado para o fígado, em um processo dependente dos receptores SR-B1, que capturam a lipoproteína para que seja possível a excreção do seu conteúdo de colesterol na bile. Alternativamente, a interação da HDL com a CETP promove a transferência de CE para lipoproteínas que contêm apo B, onde essas lipoproteínas serão captadas pelo fígado em um processo dependente principalmente dos receptores SR-B1 (CHAPMAN et al., 2010). Os triglicérides e fosfolípides são removidos por hidrólises catalisadas pela lipase hepática, lipase endotelial e fosfolipase A2 (RYE; BARTER, 2014). Portanto, a HDL é a grande máquina de esterificação do colesterol no compartimento plasmático, e a esterificação propicia a estabilização desse colesterol (MANTHEI et al., 2018).

Uma das principais funções da HDL é o transporte reverso de colesterol. Nesse processo a HDL atua como um acceptor específico de colesterol, promovendo a remoção de colesterol de tecidos periféricos pela lipoproteína, para que o colesterol entre na circulação e seja disponibilizado para o fígado e eliminado na bile. O transporte reverso de colesterol é responsável pela formação, transformação e degradação das partículas de HDL (OUIMET; BARRETT; FISHER, 2019; KONTUSH, 2020).

A HDL desempenha, ainda, outras funções antiateroscleróticas, como anti-inflamatória, antitrombótica (BERROUGUI; MOMO; KHALIL, 2012; RADER, 2002), vasodilatadora (NOFER et al., 2004) e antioxidante (KONTUSH; CHAPMAN, 2010). Essas funções não são refletidas diretamente pelos níveis de HDL-C. Suas funções biológicas são dependentes de sua composição lipídica e proteica. Na função antioxidante, a paraoxonase 1 (PON1) tem grande protagonismo. A PON1 é uma esterase localizada no soro e é quase exclusivamente associada à partícula de HDL de maneira cálcio-dependente (SUN et al., 2017). A PON1 é responsável por inibir a formação de peróxidos lipídicos na LDL, sendo um fator importante na atividade antioxidante da HDL (REGIELI et al., 2009). A atividade da PON1 pode ser

influenciada pela concentração de HDL-C, presença de diabetes mellitus e pelo gênero. Homens podem apresentar menor atividade de PON1 quando comparados com mulheres, bem como indivíduos com diabetes apresentaram menor atividade de PON1 quando comparados a indivíduos sem diabetes (SUN et al., 2017). Ainda, pacientes com DAC apresentaram menores concentrações e atividade reduzida de PON1 do que indivíduos sem a doença (MACKNESS; TURKIE; MACKNESS, 2013).

Como descrito, a HDL é uma fração bastante heterogênea, apresentando diferentes subfrações que refletem diretamente em sua funcionalidade. Baseada em suas características físico-químicas, a HDL pode ser dividida em duas principais subfrações, através de ultracentrifugação: pequenas (HDL₃) e grandes (HDL₂) (DE LALLA; GOFMAN, 1954). Porém, dependendo do método de separação utilizado, como o sistema *Lipoprint* para separação de HDL em gel poliacrilamida, a HDL pode ser dividida em 10 diferentes subespécies. As subespécies são agrupadas em 3 categorias relativas ao tamanho da partícula: grandes (subfrações 1-3), intermediárias (subfrações 4-7) e pequenas (subfrações 8-10) (ORAVEC et al., 2011). As diferentes subfrações de HDL associam-se de forma contrastante quanto à presença de DAC. Partículas grandes de HDL em geral são mais eficientes no transporte reverso de colesterol (CAMONT; CHAPMAN; KONTUSH, 2011). Já partículas pequenas podem apresentar maior facilidade para migrar para o espaço subendotelial e promover a diminuição da oxidação das LDL (KONTUSH; CHANTEPIE; CHAPMAN, 2003). No entanto, indivíduos com DAC apresentam maiores concentrações de partículas pequenas de HDL e menores concentrações de partículas grandes (GAO et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Já o perfil de subfrações de HDL em indivíduos que apresentam baixas concentrações de HDL-C, ainda não foi bem explorado.

Visto que a composição da HDL afeta seu metabolismo e suas funções anti-aterogênicas, um método *in vitro* capaz de estimar a transferência de lípidos para HDL foi desenvolvido em nosso laboratório. O ensaio baseia-se na utilização de uma nanopartícula lipídica, marcada com colesterol radioativo na sua forma livre (CL) e esterificada (CE). Essa nanopartícula é então incubada com plasma total do paciente. Após a precipitação química das outras frações de lipoproteínas e da nanopartícula, a transferência de colesterol para a HDL é quantificada (LO PRETE et al., 2009).

O ensaio é preciso, reprodutível e prático. Vale salientar, que em pacientes com DAC precoce (<50 anos), a transferência do colesterol livre para a HDL estava diminuída quando comparados com indivíduos sem DAC (MARANHÃO et al., 2012). Esse resultado pode sugerir um estado pró-aterogênico nesses indivíduos, sendo o ensaio de transferência de colesterol um importante marcador de DAC precoce. As transferências de colesterol estão alteradas também em diferentes situações clínicas, como no diabetes mellitus (OLIVEIRA et al., 2012), no hipotireoidismo subclínico (SIGAL et al., 2011), hipercolesterolemia familiar (MARTINEZ et al., 2013), e após infarto do miocárdio (SOARES et al., 2018).

Fatores conhecidos por seus papéis protetores contra a aterosclerose e DAC, como a prática de atividade física (VAISBERG et al., 2012; BRAGA et al., 2023) e a adoção de dietas vegetarianas (VINAGRE et al., 2014), mostraram-se capazes de modificar positivamente os parâmetros da transferência de colesterol para a HDL.

Dada a variedade de funções protetoras da HDL, em parte mediadas pelas proteínas associadas à HDL, é de se supor que a simples determinação do HDL-C seja insuficiente para avaliar a proteção ao organismo proporcionada por essa lipoproteína. É de se esperar que a quantidade de HDL na circulação seja importante para que a lipoproteína execute sua função, mas aspectos qualitativos, como a composição da lipoproteína e as proteínas associadas sejam de fundamental importância.

2. OBJETIVOS

Explorar a questão de se dois grupos de indivíduos do sexo masculino com baixos níveis de HDL-C (20-40 mg/dL), um com DAC documentada e outro sem DAC, poderiam apresentar aspectos funcionais da HDL diferentes, que eventualmente poderiam contribuir para o desenvolvimento da doença. Consequentemente, foi medida a transferência de ambas as formas de colesterol para a HDL, juntamente com a função antioxidante da lipoproteína. Outros fatores relacionados com o metabolismo da HDL, como a concentração no plasma da CETP e da LCAT, bem como aspectos físicos da HDL também foram avaliados.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística e delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal, no qual foram avaliados indivíduos do sexo masculino, com idade entre 50 e 76 anos, que apresentaram HDL-C entre 20 e 40 mg/dL em pelo menos 2 exames de sangue avaliados em prontuário médico, antes do início do estudo. Os participantes estão divididos nos grupos: com presença de DAC (grupo DAC) e ausência de DAC (grupo CTL). Indivíduos com DAC tiveram a presença da doença confirmada por cineangiocoronariografia. Foram selecionados aqueles com lesões únicas ou múltiplas e apresentando obstrução luminal > 50%. Os indivíduos sem DAC tiveram a ausência da doença confirmada através de teste ergométrico de rotina.

Para os pacientes que faziam uso de estatinas, foi feita a suspensão da medicação por 30 dias antes da realização da coleta de sangue, acompanhada por um médico e sem riscos à saúde do paciente (MCGOWAN, 2004).

Os indivíduos com DAC foram selecionados na Unidade de pesquisa MASS do Instituto do Coração de São Paulo (InCor) – HCFMUSP e os indivíduos sem DAC foram selecionados através de exames de rotina realizados no InCor - HCFMUSP.

Após todos os esclarecimentos, os participantes assinaram um termo de consentimento. Em seguida, foram orientados a comparecer no Laboratório de Metabolismo e Lípidos no InCor para uma única coleta de sangue no período da manhã, entre 7:00 – 10:00, após um período de jejum de 12 horas, por punção à vácuo de veia periférica. Foi coletado um volume total de 23 mL de sangue.

3.2. Cálculo do tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho amostral, usou-se como referência o percentual de variação de transferência do colesterol livre para a HDL em pacientes com DAC precoce em comparação com indivíduos saudáveis, observado no estudo de Maranhão *et al.*, 2012.

Número de grupos: 2 grupos

Parâmetros utilizados:

$\alpha = 0,05$

$1-\beta = 0,80$

Médias: 7,0 e 3,5

Desvio Padrão: 3

Portanto, fez-se necessário a inclusão de pelo menos 12 participantes em cada grupo.

3.3. Critérios de inclusão

- Sexo masculino;
- Idade acima de 50 anos;
- Apresentar dosagem de HDL-C entre 20 e 40 mg/dL
- Indivíduos com DAC diagnosticada por cineangiocoronariografia;
- Indivíduos sem DAC confirmado por estudo angiográfico ou teste ergométrico;
- Assinar termo de consentimento informado.

3.4. Critérios de exclusão

- Doença renal crônica (creatinina > 1,5 mg/dL);
- Doença tireoidiana descontrolada (TSH > 0,4 um/L, T4 total > 12,6 mg/dL, T3 total > 180 ng/dL, T4 livre > 1,8 ng/dL, T3 livre > 50 pg/mL);
- Esteatose hepática
- Pacientes em fase aguda de infarto do miocárdio;
- Pacientes com insuficiência cardíaca classe funcional (CF) III e IV;
- Pacientes com angina CF IV;
- Pacientes com fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor que 0,4;

- Triglicérides ≥ 400 mg/dL;
- Doenças que interferem com taxa de morte, como câncer e outras;
- Participação em outro estudo.

3.5 Determinações bioquímicas

As determinações séricas de triglicérides e colesterol total foram determinadas por método enzimático colorimétrico, utilizando-se kits comerciais específicos para o equipamento automatizado Dimension RXL, Siemens Healthcare (Newark,USA). O HDL-C foi determinado pelo mesmo método após a precipitação química das lipoproteínas que contém apo B, utilizando-se reagente precipitante constituído por $MgCl_2$ e ácido fosfotúngstico. O valor de LDL-C foi estimado pela equação de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972), obtido pela diferença entre o colesterol total e a somatória do HDL-C e colesterol de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL-C). O colesterol de VLDL foi calculado através da divisão dos níveis plasmáticos de triglicérides por 5.

$$\text{Colesterol de LDL} = [\text{colesterol total} - (\text{HDL-C} + \text{VLDL-C})]$$

As concentrações plasmáticas de apo A-I e B foram determinadas por imunonefelometria nos Sistemas ProSpec® (Siemens Healthcare).

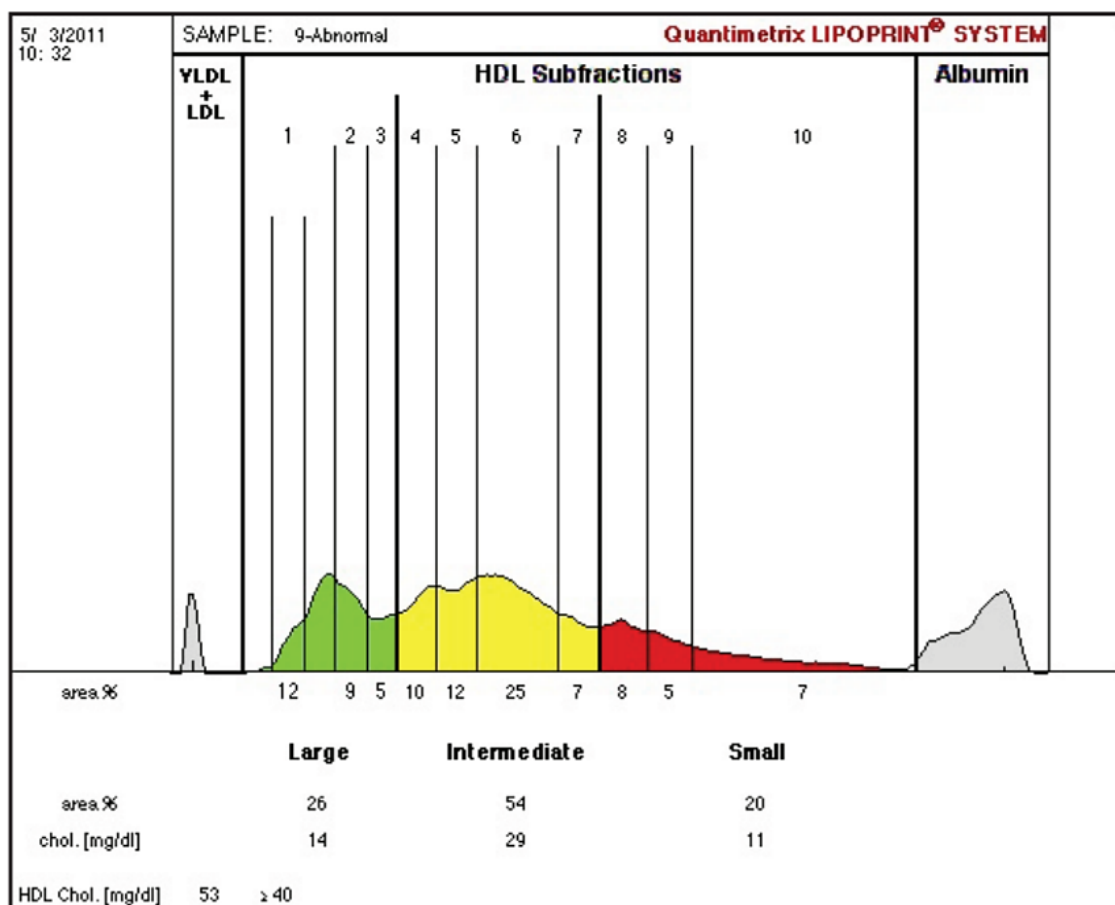
3.6 Determinação do diâmetro da partícula de HDL

A HDL foi separada por precipitação química das partículas lipoprotéicas que contém apo B, através da adição de 500 μL de polietilenoglicol 8000 (200 g/L). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em solução de NaCl (0,15M) e, em seguida, filtrado em filtro Millipore 0,22 μm de diâmetro. O diâmetro da HDL foi então medido por espelhamento de luz (Zetasizer-nano series – Nano-ZS90, Malvern Instr., Worcestershire, Reino Unido) que é capaz de medir o movimento browniano das partículas e em seguida, através da relação Stokes-Einstein, essa medida foi convertida em medida de tamanho (LIMA; MARANHÃO, 2004).

3.7 Subfrações de HDL

As subfrações de HDL foram determinadas pelo método Lipoprint® (Quantimetrix Corp, Redondo Beach, CA, EUA). Nos tubos contendo gel de poliacrilamida, foram pipetados 25µL de plasma e 300µL de gel contendo corante lipofílico. Após homogeneização, os tubos foram colocados contra a luz para fotopolimerização, durante 30 minutos. Em seguida, foi feita a corrida em tampão de eletroforese para separar e quantificar as subfrações. Ao final do procedimento as subfrações de HDL são apresentadas em grandes (subfrações 1 a 3), intermediárias (subfrações 4 a 7) e pequenas (subfrações 8 a 10).

Figura 1- Imagem obtida durante a análise das subfrações da HDL.



Abreviaturas: VLDL: lipoproteína de muita baixa densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade.

3.8 Ensaio de transferência de colesterol de uma nanopartícula lipídica artificial para a HDL

O ensaio de transferência de colesterol foi realizado utilizando uma nanopartícula lipídica artificial preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg *et al.*, (1982), modificada por Maranhão *et al.*, (1993). Em um frasco foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol. Posteriormente, foram adicionados à mistura de lípidos os isótopos ^3H -éster de colesterol e ^{14}C -colesterol livre (Arc Drive, St Louis, MO, EUA). Após a adição de 10 mL de tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8, a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultra-sônica (Sonics VibraCell® Sonics & Materials, INC, Newtown, CT, EUA), durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55°C.

A solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (Optima™ XL-100K Ultracentrifuge, rotor SW-41, Beckman, EUA). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo (1 mL), resultante da centrifugação a 35.000 rpm por 30 minutos, a 4°C, foi removido por aspiração e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para 1,21 g/mL. Após a segunda centrifugação (35.000 rpm por 2 horas a 4°C), a nanopartícula lipídica artificial foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra tampão Tris HCl 10 M, pH 8. Finalmente, a nanopartícula foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µL de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até 15 dias.

O ensaio de transferência de lípidos foi realizado segundo descrito por Lo Prete *et al.*, (2009). Uma alíquota de 200 µL de plasma dos participantes foi incubada com 50 µL da nanopartícula, a 37°C, sob agitação, durante 1 hora. Após esse procedimento, foram adicionados 250 µL de reagente precipitante (0,2% dextran/0,3 mol/L MgCl_2) seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos, a 3000 rpm. O infranadante, contendo a nanopartícula e as lipoproteínas plasmáticas que contém apo B, foi desprezado. O sobrenadante, contendo HDL, foi submetido à contagem da radioatividade em analisador de cintilação líquida (Hidex, Turku, Finlândia), que corresponde à transferência dos lípidos radioativos da nanoemulsão lipídica para a HDL do indivíduo.

Foi calculada a porcentagem de transferência de cada um dos lípidos radioativos, considerando como 100%, a radioatividade total utilizada na incubação.

3.9 Determinação da atividade da paraoxonase 1 (PON1)

A atividade da PON1 foi medida em soro pela adição de 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M e pH 8.05, contendo 2 mmol/L de CaCl₂ e 1,1 mmol/L de paraoxon a 25 µL de soro. As amostras (200 µL) foram aplicadas em placa de 96 poços em duplicata. A leitura foi feita em leitor de microplacas (Multilabel, Reader Victor TMX3, PerkinElmer, Massachusetts, EUA), no comprimento de onda de 405 nm e temperatura de 37°C. Para o cálculo da atividade da PON1, foram feitas 6 leituras em intervalos de um minuto cada. O resultado foi obtido multiplicando-se a média da variação das absorbâncias pelo fator descrito por Sentí *et al.*, (2003) e Agachan *et al.*, (2004).

3.10 Determinação da atividade antioxidante da HDL

Para avaliar o efeito protetor da HDL e suas subfrações contra a peroxidação lipídica da LDL, foi realizado *in vitro* a oxidação da LDL induzida por sulfato de cobre na presença da HDL.

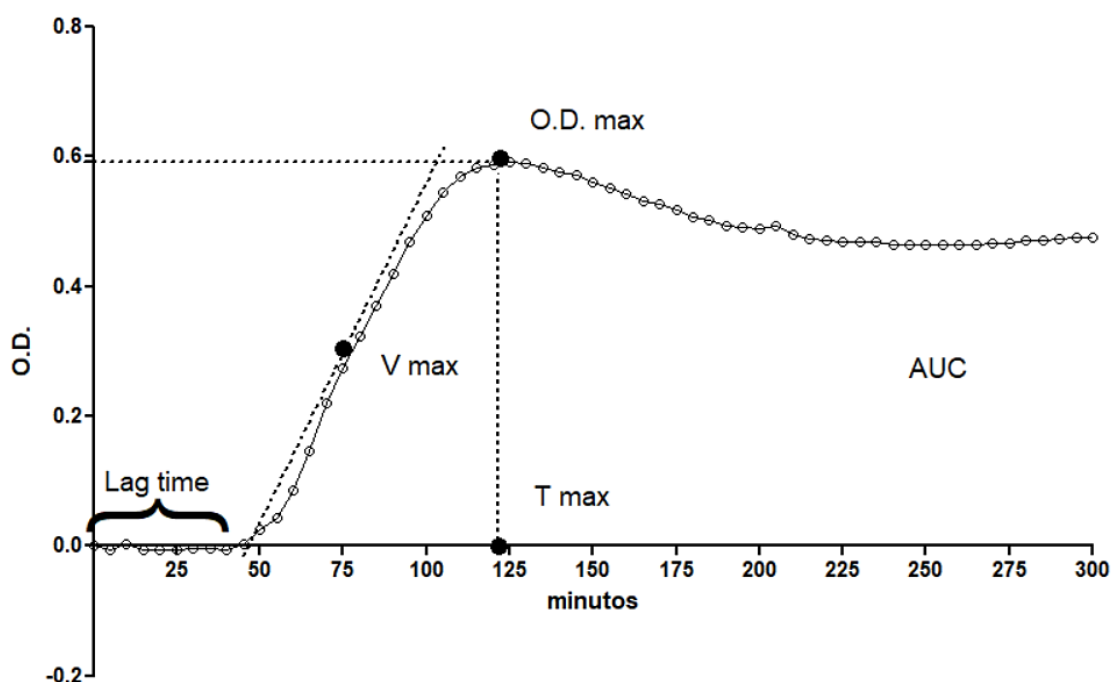
A LDL foi obtida a partir do soro de indivíduos normolipidêmicos como controle de referência e isolada por ultracentrifugação de gradiente de densidade (duas vezes de 56.000 rpm 6h a 4°C). Após a ultracentrifugação, a fração que corresponde à LDL foi removida e dialisada contra solução Tris-HCl 20mM pH 7,4, durante 4 horas na ausência de luminosidade. Após a diálise, as amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas. A HDL foi separada por precipitação química das lipoproteínas ricas em apo B, com ácido fosfotungstico e cloreto de magnésio, conforme as instruções do kit comercial de Colesterol HDL® (Labtest, Minas Gerais, Brasil). A HDL presente no sobrenadante foi separada e mantida na geladeira para uso em até 24h.

A concentração de proteínas das amostras de LDL e de HDL foi determinada pelo método de Bradford® (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, California, EUA). A LDL na concentração de 50 µg/mL foi incubada com 200 µg/mL de HDL na presença de 30 µM de sulfato de cobre. A formação de dienos conjugados em consequência da

peroxidação lipídica foi monitorada por meio de leitura da absorbância a 234 nm em espectrofotômetro durante 5 horas a 37°C, sendo realizada uma leitura a cada 5 minutos.

A partir do gráfico formado por essas medidas, foram obtidos os seguintes parâmetros: taxa máxima de peroxidação lipídica (Vmax), produção máxima de dienos conjugados (ODmax), tempo para produção máxima de dienos conjugados (Tmax) e área sobre a curva gerada (AUC).

Figura 2- Gráfico obtido durante a análise da capacidade antioxidante da HDL.



Abreviaturas: ODmax: densidade ótica; Vmax: taxa máxima de peroxidação lipídica; Tmax: tempo para a produção máxima de dienos conjugados; AUC: área sobre a curva.

3.11 Determinação da concentração de CETP e de LCAT

A massa de CETP e de LCAT foi determinada pelo método de ELISA através de kits comerciais (Cloud-Clone Corp, Wuhan, China).

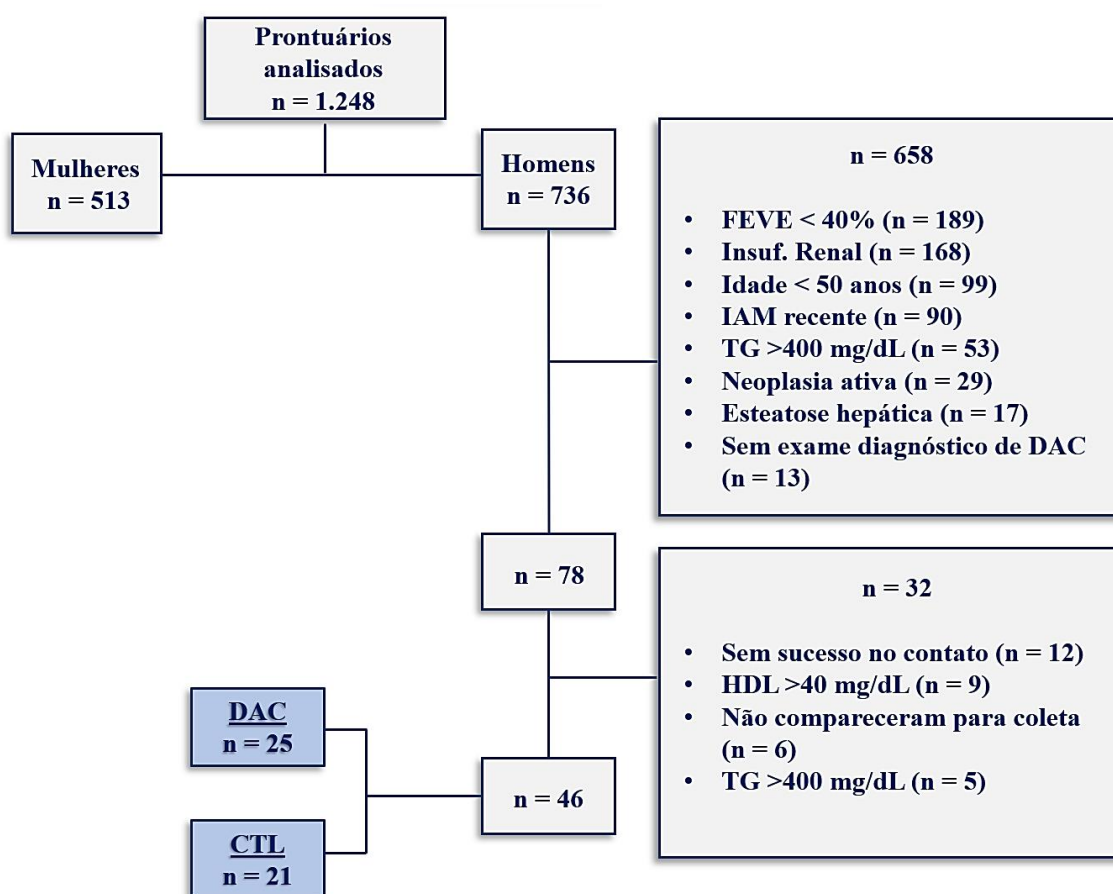
3.12 Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0. Para a avaliação da distribuição dos dados obtidos, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação dos parâmetros estudados entre os grupos, foram utilizados os testes test-t Student, para a distribuição gaussiana, ou Mann-Whitney, para a distribuição não-gaussiana. As análises de correlação foram determinadas pelos testes de Pearson ou Spearman. Os testes foram realizados com nível de significância de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão para dados normais ou como mediana (mínima : máxima) para distribuição não normal.

4. RESULTADOS

A **Figura 3** representa o fluxograma da seleção e recrutamento dos voluntários do presente estudo. Foram analisados 1.248 prontuários, dos quais 513 foram imediatamente excluídos por se tratarem de mulheres. Dos 736 prontuários analisados, 658 foram excluídos, levando em consideração os critérios de inclusão e exclusão, conforme descrito na figura, restando 78 pacientes. Destes, 32 indivíduos não compareceram para a coleta ou apresentavam níveis de HDL ou triglicérides fora do estipulado. Assim, foram avaliados 46 homens, divididos nos grupos DAC e CTL.

Figura 3- Fluxograma de pacientes.



Abreviaturas: FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; IAM: infarto agudo do miocárdio; TG: triglicérides; DAC: doença arterial coronária; HDL: lipoproteína de alta densidade

Na **Tabela 1** estão apresentadas as distribuições de idade, dados antropométricos, características clínicas e os medicamentos de uso de ambos os grupos estudados. Os grupos apresentam-se pareados, uma vez que não houve diferenças na

idade, índice de massa corpórea (IMC) e circunferência abdominal entre os grupos. O grupo DAC apresentou maior porcentagem de diabéticos ($p=0,0001$) e hipertensos ($p<0,0001$) em comparação ao grupo CTL. No grupo DAC os participantes apresentaram maior uso de estatinas ($p<0,0001$) do que o grupo CTL.

Tabela 1- Idade, dados antropométricos, características clínicas e medicamentos de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).

Parâmetros	CTL (n=21)	DAC (n=25)	P
Idade (anos)	62 ± 2	66 ± 1	0,1432
IMC (kg/m ²)	28 ± 0,7	29 ± 0,6	0,1516
Circunferência abdominal (cm)	96 ± 2	100 ± 2	0,1438
Diabetes (%)	14	72	0,0001
Hipertensão (%)	52	100	< 0,0001
Fumantes (%)	10	8	1,0000
Infarto (%)	0	44	0,0004
Medicamentos			
Estatina (%)	14	100	< 0,0001
Hipoglicemiantes (%)	10	76	< 0,0001
Insulina (%)	0	20	0,0536
Inibidor ECA (%)	14	48	0,0260
Bloqueador canal de cálcio (%)	10	48	0,0088
Beta bloqueador (%)	24	92	< 0,0001
Diurético (%)	14	44	0,0521
BRA (%)	14	48	0,0260
Anticoagulante (%)	0	8	0,4928
Antiplaquetário (%)	10	100	< 0,0001

Dados expressos em média ± desvio padrão. As distribuições de frequências são expressas em porcentagem (%). Abreviaturas: CTL: controle; IMC: índice de massa corporal; ECA: enzima conversora de angiotensina; BRA: bloqueador do receptor de angiotensina.

Na **Tabela 2**, são mostrados os valores plasmáticos de lípides e apolipoproteínas. Não houve diferença entre DAC e CTL nos valores de colesterol total, LDL-C e não-HDL-C e triglicérides. A HDL-C foi menor no grupo DAC do que no grupo CTL ($p=0,0156$). Apo A-I foi semelhante, mas apo B foi maior em DAC do que em CTL ($p=0,0464$).

Tabela 2- Concentração plasmática de lípidos e apolipoproteínas de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).

Parâmetros	CTL (n=21)	DAC (n=25)	p
Colesterol (mg/dL)			
Total	192 ± 6	209 ± 9	0,1327
HDL	36 (28:40)	33 (24:39)	0,0156
LDL	135 (70:161)	128 (74:208)	0,1003
não-HDL	156 ± 6	177 ± 9	0,0761
Triglicérides (mg/dL)	142 (66:351)	170 (64:373)	0,1281
Apolipoproteínas (g/L)			
A-I	1,21 ± 0,03	1,16 ± 0,03	0,1969
B	1,06 ± 0,05	1,24 ± 0,06	0,0464

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana (mínima:máxima). Abreviaturas: CTL: controle; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

Na **Tabela 3** encontram-se os dados de diâmetro de HDL, das concentrações de CETP e LCAT e as taxas de transferência de colesterol para a HDL, bem como o valor de transferência corrigido pelo valor de HDL-C dos grupos estudados. Quanto ao diâmetro de HDL, não houve diferença entre os grupos. Apesar da concentração de CETP apresentar uma tendência de ser menor no grupo CTL, não houve diferença significativa deste parâmetro, assim como nas concentrações de LCAT entre grupo DAC e CTL.

Quanto às transferências de CE e CL para a HDL, não houve diferença entre os grupos. Porém, ao corrigir o valor das transferências pelo HDL-C, temos um resultado significativo, sendo as taxas de transferência tanto de CE ($p=0,0034$), quanto de CL ($p=0,0021$), maiores no grupo DAC em comparação ao grupo CTL.

Tabela 3- Diâmetro da HDL, concentração de CETP e LCAT e transferência de colesterol para HDL de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).

Parâmetros	CTL (n=21)	DAC (n=25)	P
Diâmetro da HDL (nm)	8,9 ± 0,1	9,0 ± 0,1	0,3900
CETP (µg/mL)	0,1 (0,004:0,7)	0,2 (0,05:0,6)	0,0624
LCAT (µg/mL)	3,8 ± 0,1	3,9 ± 0,1	0,4386
Transferência de colesterol para HDL (%)			
CE	1,8 (1,4:2,7)	2,1 (1,6:3,2)	0,1026
CL	4,6 ± 0,1	4,7 ± 0,1	0,2455
Transferência corrigida pelo HDL			
CE/HDL	0,05 (0,03:0,08)	0,06 (0,05:0,09)	0,0034
CL/HDL	0,13 (0,09:0,16)	0,15 (0,11:0,21)	0,0021

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana (mínima:máxima). Abreviaturas: CTL: controle; HDL: lipoproteína de alta densidade; CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado; LCAT: lecitina-colesterol aciltransferase; CE: colesterol esterificado; CL: colesterol livre.

Na **Tabela 4** estão expostos os dados da atividade da PON1 e parâmetros relacionados à atividade antioxidante da HDL. Não houve diferença entre os grupos quanto a atividade da PON1. Os parâmetros de atividade antioxidante da HDL, nomeadamente taxa máxima de peroxidação lipídica, tempo para a produção máxima de dienos conjugados, produção máxima de dienos conjugados e área sobre a curva, também não foram diferentes entre DAC e CTL.

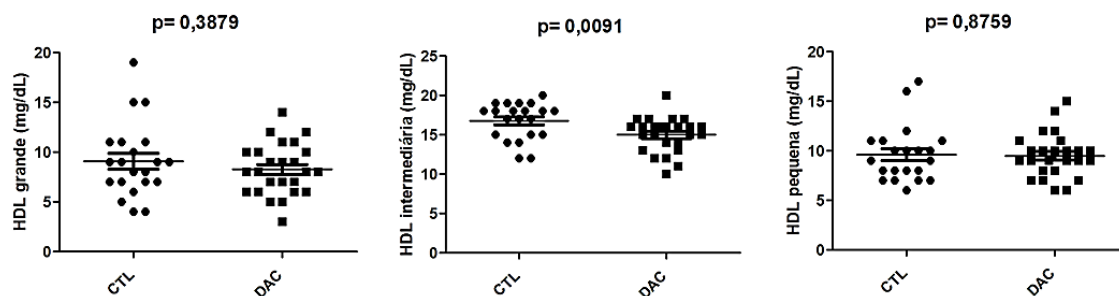
Tabela 4- Atividade da paraoxonase 1 e atividade antioxidante da HDL de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).

Parâmetros	CTL (n=21)	DAC (n=25)	P
Atividade da PON1 (U/L)	65 (14:157)	54 (10:186)	0,8947
Atividade antioxidante			
Vmax (milli units/min)	1,85 ± 0,03	1,83 ± 0,03	0,7596
Tmax (min)	170 (169:173)	170 (168:173)	0,7374
DOMax	0,850 (0,780:0,870)	0,840 (0,790:0,860)	0,1081
AUC	161 (148:167)	161 (154:168)	0,7408

Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana (mínima:máxima). Abreviaturas: CTL: controle; PON1: paraoxonase 1; Vmax: taxa máxima de peroxidação lipídica; Tmax: tempo para a produção máxima de dienos conjugados; DOMax: produção máxima de dienos conjugados; AUC: área sobre a curva gerada.

A **Figura 4** mostra os valores do perfil de subfrações da HDL de ambos os grupos estudados. As subfrações intermediárias apresentaram diferença significativa entre os grupos, sendo menores no grupo DAC do que no grupo CTL ($p=0,0091$). Não houve diferença entre os dois grupos quanto às subfrações grandes e pequenas de HDL.

Figura 4- Subfrações de HDL de homens com HDL-colesterol baixo, com ou sem doença arterial coronária (DAC).



Abreviaturas: HDL: lipoproteína de alta densidade; CTL: controle.

Na **Tabela 5** e na **Tabela 6** estão apresentados os dados de correlação de ambos os grupos estudados. Na **Tabela 5**, no grupo DAC, a concentração de HDL-C se associou positivamente com as partículas grandes ($r=0,5583$; $p=0,0037$) e intermediárias ($r=0,7995$; $p<0,0001$) de HDL. Ainda, a concentração de HDL-C associou-se positivamente com a transferência de colesterol livre ($r=0,4419$; $p=0,0270$) no grupo DAC. Na **Tabela 6**, o grupo DAC apresentou associação positiva quanto às taxas de transferência de colesterol livre e concentração de HDL-C ($r=0,4419$; $p=0,0270$) e a concentração de partículas intermediárias de HDL ($r=0,5459$; $p=0,0048$). Ainda, o grupo DAC apresentou tendência de uma correlação negativa quanto a transferência de colesterol livre e a área sob a curva ($r=-0,3840$; $p=0,0581$), um dos parâmetros de oxidação de HDL analisados. Já no grupo controle, a transferência de colesterol livre se associou positivamente com a concentração de partículas pequenas de HDL ($r=0,5501$; $p=0,0098$).

Tabela 5- Dados de correlação de ambos os grupos estudados.

Parâmetros		Diâmetro de HDL	HDL Grande	HDL Intermediária	HDL Pequena	PON1	Vmax	Tmax	Domax	AUC	Transferência de CL	Transferência de CE	LCAT	CETP
Grupo DAC														
HDL-C	r=	-0,3432	0,5583	0,7995	0,3447	-0,2438	-0,0330	0,05821	-0,0165	-0,1865	0,4419	0,3555	0,0108	0,0633
	p=	0,093	0,0037	<0,0001	0,0915	0,2402	0,8756	0,7823	0,9373	0,3721	0,0270	0,0811	0,9590	0,7636
Grupo CTL														
HDL-C	r=	0,1555	0,3944	0,3734	0,3546	0,0439	0,2930	-0,0122	0,0130	0,0820	0,1277	-0,0111	0,1024	0,0275
	p=	0,501	0,0768	0,0954	0,1041	0,85	0,1973	0,9580	0,9553	0,7238	0,5813	0,9617	0,6588	0,9084

Abreviações: HDL: lipoproteína de alta densidade; PON1: paraoxonase 1; Vmax: taxa máxima de peroxidação lipídica; Tmax: tempo para a produção máxima de dienos conjugados; Domax: produção máxima de dienos conjugados; AUC: área sobre a curva gerada; CL: colesterol livre; CE: colesterol esterificado; LCAT: lecitina-colesterol aciltransferase; CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado; HDL-C: colesterol de HDL; DAC: doença arterial coronária; CTL: controle.

Tabela 6- Dados de correlação de ambos os grupos estudados.

Parâmetros		HDL-C	Diâmetro de HDL	HDL Grande	HDL Intermediária	HDL Pequena	PON1	Vmax	Tmax	Domax	AUC	LCAT	CETP
Grupo DAC													
Transferência de CE	r=	0,3555	0,0650	0,2800	0,2854	-0,0227	0,1910	0,0019	-0,1580	-0,2792	-0,1436	0,0138	-0,0733
	p=	0,0811	0,7573	0,1751	0,1666	0,9143	0,3605	0,9927	0,4506	0,1764	0,4935	0,9476	0,7277
Transferência de CL	r=	0,4419	0,1430	0,2848	0,5459	0,0738	-0,0915	-0,1878	-0,0198	-0,3216	-0,3840	0,0769	-0,1019
	p=	0,0270	0,4952	0,1676	0,0048	0,7257	0,6635	0,3686	0,925	0,1169	0,0581	0,7147	0,6279
Grupo CTL													
Transferência de CE	r=	-0,0111	0,0949	0,0415	-0,3355	0,2806	0,308	-0,1577	0,1677	-0,1793	0,1417	-0,1685	0,3019
	p=	0,9617	0,6824	0,8582	0,1371	0,218	0,1744	0,4949	0,4675	0,4368	0,5402	0,4654	0,1958
Transferência de CL	r=	0,1277	0,2702	-0,1079	-0,2853	0,5501	0,2047	-0,1781	0,3413	-0,1433	-0,1996	-0,0713	0,0119
	p=	0,5813	0,2361	0,6417	0,2099	0,0098	0,3735	0,4399	0,13	0,5355	0,3858	0,7586	0,9602

Abreviações: HDL-C: colesterol de HDL; HDL: lipoproteína de alta densidade; PON1: paraoxonase 1; Vmax: taxa máxima de peroxidação lipídica; Tmax: tempo para a produção máxima de dienos conjugados; Domax: produção máxima de dienos conjugados; AUC: área sobre a curva gerada; CL: colesterol livre; CE: colesterol esterificado; LCAT: lecitina-colesterol aciltransferase; CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado; DAC: doença arterial coronária; CTL: controle.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, para o qual foram selecionados indivíduos do sexo masculino com HDL-C variando entre 20-40 mg/dL com ou sem DAC, fatores de risco tradicionais como o próprio HDL-C e a apo B, foram os únicos parâmetros que diferiram entre os dois grupos. Por outro lado, os parâmetros relativos ao metabolismo e função da HDL, como a transferência de colesterol esterificado e livre para a HDL e sua função antioxidante não foram diferentes. Em relação a outros fatores que podem intervir no metabolismo da HDL, houve uma tendência, mas não significativa, do grupo DAC apresentar concentração de CETP maior em DAC, enquanto a concentração de LCAT não foi diferente entre os grupos.

O diferencial deste estudo se dá ao fato de ambos os grupos estudados apresentarem apenas indivíduos do sexo masculino e serem compostos apenas por indivíduos com HDL-C baixa, na faixa de 20-40 mg/dL. A importância de estudar essa população se dá pelo fato de os homens apresentarem características e um perfil mais aterogênico do que as mulheres, principalmente pelas menores concentrações de HDL-C (MASCITELLI; PEZZETTA, 2006). O perfil metabólico da HDL-C baixa é heterogêneo, podendo ter diferentes causas. Geralmente, a causa é de caráter genético, devido a causas poligênicas, mas outra explicação é pela reduzida lipólise de partículas ricas em triglicérides, que irão fornecer menos conteúdo para a maturação das partículas de HDL (BRUNZELL et al., 1983; LAMARCHE et al., 1993). Neste estudo, indivíduos com triglicérides > 400 mg/dL foram excluídos, para evitar a influência da hipertrigliceridemia nas concentrações de HDL-C.

A escolha de participantes com hipoalfalipoproteinemia leve a moderada, geralmente devido a causas poligênicas, foi feita para evitar a inclusão de indivíduos com alterações genéticas que permitem um perfil de HDL-C com valores abaixo de 20 mg/dL e que constituem apenas 1% da população geral (MILLER; ZHAN, 2004). Nos homens, nessa faixa de 20-40 mg/dL, a correlação entre a incidência de HDL-C e DAC é muito mais forte do que a de valores mais elevados de HDL-C, devido à característica em “formato de U” entre os valores de HDL-C e o risco de mortalidade cardiovascular (MADSEN; VARBO; NORDESTGAARD, 2017). Assim, é bastante esperado que o

HDL-C se destaque entre os demais parâmetros medidos como preditor da presença de DAC nesses indivíduos.

Os grupos estudados apresentaram-se pareados por idade, IMC e circunferência abdominal, uma vez que não houve diferença entre os grupos nesses parâmetros. Apesar de ambos os grupos apresentarem baixas concentrações de HDL-C, menor do que os valores recomendados pela Diretriz Brasileira de Dislipidemia e Aterosclerose, houve uma diferença significativa entre os grupos quanto a esse parâmetro, tendo o grupo com DAC menor concentração de HDL-C do que o grupo CTL. Esse resultado pode estar relacionado com o maior número de participantes no grupo DAC ou, ainda, com maior porcentagem de diabéticos presentes nesse grupo. Indivíduos portadores de diabetes mellitus estão mais suscetíveis a apresentarem baixa concentração de HDL-C do que indivíduos sem diabetes, principalmente pela hipertrigliceridemia (LINTHOUT et al., 2010).

Com relação ao LDL-C, os grupos não apresentaram diferença significativa. Mas, ao avaliar a apo B, o grupo DAC apresentou maior concentração desta apo do que o grupo CTL. A medida da apo B é considerada um melhor marcador de partículas aterogênicas presentes no sangue em comparação ao LDL-C, visto que apenas uma molécula de apo B está presente em cada partícula de lipoproteína correspondente a fração não-HDL (GLAVINOVIC et al., 2022). Como esperado, esse resultado indica um perfil mais pró-aterogênico no grupo DAC.

Em relação ao diâmetro da HDL e o perfil de suas subfrações, observa-se na literatura que as partículas maiores seriam mais funcionais e protetoras contra a DAC do que as partículas pequenas, tendo importante papel no transporte reverso de colesterol (CAMONT; CHAPMAN; KONTUSH, 2011). Porém, as subfrações menores podem apresentar um papel importante na função antioxidante da HDL, diminuindo a oxidação da LDL, processo fundamental contra o desenvolvimento da aterosclerose (KONTUSH; CHANTEPIE; CHAPMAN, 2003). Em um estudo de uma população que apresentava fatores de risco para DAC e HDL-C baixa, observou-se maior porcentagem da subfração de partículas intermediárias e pequenas e menor porcentagem de partículas grandes nesse grupo, em comparação a indivíduos com concentrações normais de HDL-C e os mesmos fatores de risco, sugerindo um possível mecanismo que contribui para a aterosclerose (MASCARENHAS-MELO et al., 2013). Esses resultados podem estar

relacionados aos nossos achados, visto que o grupo CTL apresentou maior concentração da subfração intermediária do que o grupo DAC. O grupo CTL apresenta indivíduos que não possuem DAC documentada, mas podem apresentar fatores de risco para a doença, semelhante aos indivíduos do estudo citado acima. O achado de maior concentração de partículas intermediárias no grupo CTL dificilmente é significativo em termos de aterogênese.

Quanto à atividade da PON1, enzima associada à HDL e com função antioxidante, não foram observadas diferenças entre os dois grupos. Existem evidências sugerindo que indivíduos com HDL-C abaixo dos valores normais, possuem menor atividade dessa enzima (HOLVEN et al., 2013). O presente estudo avaliou atividade de PON1 em dois grupos de indivíduos com HDL-C baixa, podendo esta ser a razão da similaridade do resultado entre os grupos. Também não foram observadas diferenças entre os grupos quanto às quatro variáveis de função antioxidante da HDL. Esse resultado pode sugerir que a função antioxidante da HDL não impacta nesse perfil específico da população com HDL-C baixa.

As transferências de CL e CE foram semelhantes entre indivíduos com DAC e o grupo controle, porém, esses resultados não eram esperados. No entanto, ao corrigir as taxas de transferência de colesterol pelas concentrações de HDL-C, o grupo DAC apresentou maiores transferências de CL e CE quando comparado ao grupo controle. Maior transferência de CE e menor transferência de CL estão relacionados a um perfil mais pró-aterogênico, visto em diferentes estudos. Em estudos anteriores, as transferências de CL para a HDL estavam diminuídas no grupo DAC. Indivíduos com DAC precoce, abaixo dos 50 anos de idade, apresentaram maiores transferências de CE e menores transferências de CL do que o grupo controle (MARANHÃO et al., 2012). Em outro estudo, em indivíduos que apresentavam DAC e diabetes, as transferências de CL foram menores do que o grupo portador apenas de diabetes (SPRANDEL et al., 2015). Ainda, indivíduos com doença arterial periférica e diabetes apresentaram menor transferência de CL do que aqueles apenas com doença arterial periférica (de MACEDO RIBEIRO et al., 2021). Esses resultados demonstram que pacientes que possuem mais comorbidades estão mais suscetíveis a apresentarem algum desfecho cardiovascular desfavorável.

Em 1998, um dos estudos do Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT), avaliou a influência de fatores de risco sobre desfechos cardiovasculares, em

homens com HDL-C baixa. Os indivíduos avaliados muito se assemelham aos indivíduos do presente estudo, visto que todos são homens, com HDL-C média de 32 mg/dL e média de idade de 64 anos. Os resultados do estudo VA-HIT mostram que, nesse tipo de população, a presença de fatores de risco como diabetes e hipertensão aumentam as chances dos indivíduos apresentarem algum desfecho cardiovascular. Indivíduos que possuíam o hábito de fumar tiveram um aumento substancial nos desfechos (PAPADEMETRIOU et al., 1998). Diferente do presente estudo que não levou em consideração as concentrações de LDL-C, o estudo VA-HIT selecionou apenas indivíduos com LDL-C normal, média de 111 mg/dL. As concentrações mais elevadas de LDL-C e de triglicérides no presente estudo, podem ter influenciado alguns dos resultados obtidos.

Aqui, o resultado desse estudo apresentou uma particularidade, já que foi possível observarmos as maiores taxas de transferência de CE e de CL no grupo DAC do que no grupo controle. Talvez, esse resultado pode ter apresentado como interferência os níveis baixos de HDL-C de ambos os grupos, sendo o primeiro estudo a analisar as transferências de colesterol em indivíduos exclusivamente do sexo masculino e com HDL-C baixo.

A transferência de colesterol entre as diferentes classes de lipoproteínas é facilitada pela atuação de proteínas de transferência, como a CETP. A literatura apresenta resultados conflitantes quanto a presença da DAC e as concentrações de CETP. Maior concentração de CETP pode estar relacionado com maior risco de desenvolvimento de DAC em indivíduos saudáveis (BOEKHOLDT et al., 2004). Em contrapartida, em indivíduos com menores concentrações de triglicérides, a maior concentração de CETP pode estar relacionado a um menor risco de DAC (BORGREVE et al., 2007). Ainda, menor concentração de CETP pode estar relacionado com redução da transferência de colesterol de lipoproteínas doadoras para a HDL, dessa maneira, a HDL apresenta menor conteúdo de colesterol esterificado. Neste estudo, as concentrações de CETP não foram diferentes entre indivíduos com DAC e indivíduos controles, resultado que se assemelha a outro estudo publicado anteriormente (KAPPELLE et al., 2011).

A esterificação do colesterol, processo importante para a formação de HDL madura, ocorre através da ação da enzima LCAT, que usa a apoA-I como cofator. Aqui, a concentração de LCAT foi semelhante em ambos os grupos. Assim, como visto em

outros estudos, onde as concentrações de LCAT não diferem entre casos de DAC e os controles (HOLLEBOOM et al., 2010).

Assim como a CETP, a LCAT também divide opiniões sobre ser uma enzima pró ou anti-aterogênica. O processo de esterificação gera maior conteúdo de CE para a HDL, o que permite sua maturação e transformação em partícula madura, podendo também aumentar as concentrações de HDL-C. Em contrapartida, a maior quantidade de CE no núcleo da HDL, associado a presença de lipoproteínas ricas em triglicérides e a CETP, permitirá maior transferência de colesterol para as lipoproteínas que contêm apo B, sendo estas aterogênicas (JONAS A, 2000; ROUSSET et al., 2009).

Nas análises de correlação, o grupo DAC apresentou correlação positiva com partículas grandes e principalmente intermediárias de HDL, bem como uma correlação positiva com a transferência de CL. Esses resultados são marcantes deste trabalho, uma vez que fogem dos resultados encontrados na literatura. Indivíduos com DAC, em sua maioria, apresentam partículas menores de HDL (GAO et al., 2016) e menor transferência de CL, quando comparados a indivíduos sem DAC (MARANHÃO et al., 2012).

Outro achado incomum foi a correlação positiva observada entre as transferências de CL e partículas pequenas de HDL no grupo controle. Esse resultado sugere que indivíduos homens que apresentam maiores concentrações de partículas pequenas de HDL, tem maior transferência de CL. Esse resultado é diferente do que se encontra na literatura, onde partículas maiores de HDL estariam associadas a uma maior capacidade transferência de colesterol, do que as partículas pequenas (CAMONT; CHAPMAN; KONTUSH, 2011).

O presente estudo apresenta algumas limitações que são importantes salientar. Primeiramente, o estudo avaliou uma amostra pequena de homens que apresentam HDL-C baixa, com ou sem DAC. Além do pequeno número de participantes, estes apresentam valores de HDL-C considerados baixos para os padrões normais de referência em ambos os grupos, não tendo sido adicionado um grupo com concentrações consideradas normais de HDL-C a critério de comparação. A realização de teste genético para identificar polimorfismos relacionados a menores concentrações de HDL-C, teria sido um diferencial para este trabalho.

Apesar do grupo controle não apresentar DAC documentada, alguns indivíduos apresentavam fatores de risco para desenvolvimento de DAC, como diabetes, hipertensão e tabagismo, mesmo que em menor quantidade do que o grupo que possui DAC diagnosticada. Por ter escolhido grupos de homens dentro do perfil de HDL-C baixo, nós podemos ter selecionado participantes com um perfil metabólico específico, não saudável, não sendo possível generalizar esses resultados para outros grupos da população.

Por fim, outro diferencial deste estudo e possivelmente uma limitação, foi não ter diferenciado dentro do grupo DAC aqueles indivíduos que apresentavam apenas uma ou múltiplas lesões arteriais; é possível que a gravidade das lesões tenha influência sobre a qualidade das funções da HDL.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, em homens com HDL-C baixo, aqueles que desenvolveram DAC apresentaram HDL-C mais baixo e apo B mais alta do que aqueles sem DAC, sendo esses dois marcadores clássicos da DAC, mas não apresentaram diferença em relação às transferências de colesterol, que foi previamente associada a aterogênese em indivíduos com HDL-C dentro das concentrações normais. A função antioxidante da HDL e outros parâmetros metabólicos da lipoproteína medidos também foram semelhantes entre os grupos. Esses resultados apontam para a necessidade de considerar as concentrações de HDL-C no plasma ao testar os parâmetros funcionais da HDL.

6. REFERÊNCIAS

AGACHAN, B. et al. Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. **Cell Biochemistry and Function**, v. 22, n. 3, p. 163–168, maio 2004.

AIM-HIGH Investigators; BODEN, W. E. et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy [published correction appears in *N Engl J Med*. 2012 Jul 12;367(2):189]. **N Engl J Med**, v. 365, n. 24, p. 2255-2267, dec. 2011.

AMELI, S. et al. Recombinant apolipoprotein A-I Milano reduces intimal thickening after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. **Circulation**, v. 90, n. 4, p. 1935–1941, out. 1994.

FALUDI, A. A. et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. **Arquivos brasileiros de cardiologia** v. 109, (2 Supl), p. 1-76, jul. 2017

BARTER, P. et al. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. **Atherosclerosis**, v. 168, n. 2, p. 195–211, 2003.

BARTER, P. J. et al. Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 21, p. 2109–2122, 22 nov. 2007.

BENTZON, J. F. et al. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. **Circulation Research**, v. 114, n. 12, p. 1852–1866, 6 jun. 2014.

BERLIN, J. A.; COLDITZ, G. A. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. **American Journal of Epidemiology**, v. 132, n. 4, p. 612–628, out. 1990.

BERROUGUI, H.; MOMO, C. N.; KHALIL, A. Health benefits of high-density lipoproteins in preventing cardiovascular diseases. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 6, n. 6, p. 524–533, nov. 2012.

BOEKHOLDT, S. M. et al. Plasma levels of cholesteryl ester transfer protein and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the prospective

EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition)-Norfolk population study. **Circulation**, v. 110, n. 11, p. 1418-1423, 14 set. 2004.

BORGGREVE, S. E. et al. High plasma cholesteryl ester transfer protein levels may favour reduced incidence of cardiovascular events in men with low triglycerides. **Eur Heart J**, v. 28, n. 8, p. 1012-1018, abr. 2007.

BRAGA, P. G. S. et al. Regular Practice of Physical Activity Improves Cholesterol Transfers to High-Density Lipoprotein (HDL) and Other HDL Metabolic Parameters in Older Adults. **Nutrients**, v. 15, n. 23, p. 4871, 22 nov. 2023.

BRUNZELL, J.D. et al. Plasma lipoproteins in familial combined hyperlipidemia and monogenic familial hypertriglyceridemia. **J Lipid Res**, v. 24, n. 2, p. 147-155, fev. 1983.

CAMONT, L.; CHAPMAN, M. J.; KONTUSH, A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 10, p. 594–603, out. 2011.

CASTRO, G. R.; FIELDING, C. J. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre- β -migrating high-density lipoprotein. **Biochemistry**, v. 27, n. 1, p. 25–29, 1 jan. 1988.

CHAPMAN, M. J. et al. Cholesteryl ester transfer protein: at the heart of the action of lipid-modulating therapy with statins, fibrates, niacin, and cholesteryl ester transfer protein inhibitors. **European Heart Journal**, v. 31, n. 2, p. 149–164, 2 jan. 2010.

Clofibrate and niacin in coronary heart disease. **JAMA**, v. 231, n. 4, p. 360–81, 27 jan. 1975.

CUCHEL, M.; RADER, D. J. Macrophage Reverse Cholesterol Transport. **Circulation**, v. 113, n. 21, p. 2548–2555, 30 maio 2006.

DE LALLA, O. F.; GOFMAN, J. W. Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. **Methods Biochem Anal**, 1:459-478, 1954.

DUFFY, D.; RADER, D. J. Update on strategies to increase HDL quantity and function. **Nat Rev Cardiol**, v. 6, n. 7, p. 455-463, jul. 2009.

REFERENCE, B. A. et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. **European Heart Journal**, v. 38, n. 32, p. 2459–2472, 21 ago. 2017.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, jun. 1972.

GAO, F. et al. Correlation between the High Density Lipoprotein and its Subtypes in Coronary Heart Disease. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1906–1914, 2016.

GAW, A. HDL-C and triglyceride levels: relationship to coronary heart disease and treatment with statins. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 17, n. 1, p. 53-62, jan. 2003.

GINSBURG, G. S.; SMALL, D. M.; ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 14, p. 8216–27, 25 jul. 1982.

GLAVINOVIC, T. et al. Physiological Bases for the Superiority of Apolipoprotein B Over Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol as a Marker of Cardiovascular Risk. **J Am Heart Assoc**, v. 11, n. 20, p. e025858, 18 out. 2022.

GLOMSET, J. A. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: Plasma fatty acid transferase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 65, n. 1, p. 128–135, nov. 1962.

GORDON, D. J. et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. **Circulation**, v. 79, n. 1, p. 8–15, jan. 1989.

HAFFNER, S. M. et al. Mortality from Coronary Heart Disease in Subjects with Type 2 Diabetes and in Nondiabetic Subjects with and without Prior Myocardial Infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 4, p. 229–234, 23 jul. 1998.

HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A.-K. L.; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C. Inflammation and atherosclerosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 1, n. 1, p. 297–329, 1 fev. 2006.

HAYNES, R. et al. HPS2-THRIVE randomized placebo-controlled trial in 25 673 high-risk patients of ER niacin/laropiprant: trial design, pre-specified muscle and liver outcomes, and reasons for stopping study treatment. **European Heart Journal**, v. 34, n. 17, p. 1279–1291, 1 maio 2013.

HOLLEBOOM, A.G. et al. Plasma levels of lecithin:cholesterol acyltransferase and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: a prospective case-control analysis nested in the EPIC-Norfolk population study. **J Lipid Res**, v. 51, n. 2, p. 416-421, fev. 2010.

HOLVEN, K. B. et al. Subjects with low plasma HDL cholesterol levels are characterized by an inflammatory and oxidative phenotype. **PLoS One**, v. 8, n. 11, e78241, 11 nov. 2013.

HOVINGH, G. K. et al. Cholesterol ester transfer protein inhibition by TA-8995 in patients with mild dyslipidaemia (TULIP): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. **Lancet**, v. 386, n. 9992, p. 452-460, 1 aug. 2015.

INAZU, A. et al. Increased High-Density Lipoprotein Levels Caused by a Common Cholesteryl-Ester Transfer Protein Gene Mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 18, p. 1234–1238, nov. 1990.

INAZU, A. et al. Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency caused by two prevalent mutations as a major determinant of increased levels of high density lipoprotein cholesterol. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 5, p. 1872–1882, 1 nov. 1994.

JONAS, A. Lecithin cholesterol acyltransferase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1529, n. 1-3, p. 245-256, 15 dez. 2000.

JOUSILAHTI, P. et al. Sex, Age, Cardiovascular Risk Factors, and Coronary Heart Disease. **Circulation**, v. 99, n. 9, p. 1165–1172, 9 mar. 1999.

KAPPELLE, P. J. et al. High plasma cholesteryl ester transfer but not CETP mass predicts incident cardiovascular disease: a nested case-control study. **Atherosclerosis**, v. 217, n. 1, n. 249-252, jul. 2011.

KONTUSH, A. HDL and Reverse Remnant-Cholesterol Transport (RRT): Relevance to Cardiovascular Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 26, n. 12, p. 1086–1100, dez. 2020.

KONTUSH, A.; CHANTEPIE, S.; CHAPMAN, M. J. Small, Dense HDL Particles Exert Potent Protection of Atherogenic LDL Against Oxidative Stress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 10, p. 1881–1888, out. 2003.

KONTUSH, A.; CHAPMAN, M. J. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. **Current Opinion in Lipidology**, v. 21, n. 4, p. 312–318, ago. 2010.

LAMARCHE, B. et al. Metabolic heterogeneity associated with high plasma triglyceride or low HDL cholesterol levels in men. **Arterioscler Thromb**, v. 13, n. 1, p. 33-40, jan. 1993.

LERNER, D. J.; KANNEL, W. B. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. **American Heart Journal**, v. 111, n. 2, p. 383–390, fev. 1986.

LIBBY, P. et al. Atherosclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 56, 16 dez. 2019.

LIMA, E. S.; MARANHÃO, R. C. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. **Clin Chem**, v. 50, n. 6, p. 1086-1088, jun. 2004.

VAN LINTHOUT, S. et al. High-density lipoprotein at the interface of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disorders. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 13, p. 1504-1516, maio. 2010.

LO PRETE, A. C. et al. In Vitro Simultaneous Transfer of Lipids to HDL in Coronary Artery Disease and in Statin Treatment. **Lipids**, v. 44, n. 10, p. 917–924, 16 out. 2009.

de MACEDO RIBEIRO, F. R. C. et al. Disturbances of the transfer of cholesterol to high-density lipoprotein (HDL) in patients with peripheral artery disease with or without type 2 diabetes mellitus. **Vasc Med**, v. 26, n. 6, p. 602-607, dez. 2021.

MACKNESS, B.; TURKIE, W.; MACKNESS, M. Paraoxonase-1 (PON1) promoter region polymorphisms, serum PON1 status and coronary heart disease. **Archives of Medical Science**, v. 9, n. 1, p. 8–13, 2013.

MACMAHON, S. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease *1Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. **The Lancet**, v. 335, n. 8692, p. 765–774, mar. 1990.

MADSEN, C. M.; VARBO, A.; NORDESTGAARD, B. G. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. **European Heart Journal**, v. 38, n. 32, p. 2478–2486, 21 ago. 2017.

MADSEN, E. et al. Risk of Acute Myocardial Infarction. **Epidemiology**, v. 24, n. 5, p. 637–642, set. 2013.

MALAKAR, A. KR. et al. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 10, p. 16812–16823, 20 out. 2019.

MANTHEI, K. A. et al. Molecular basis for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by a compound that increases HDL cholesterol. **eLife**, v. 7, 27 nov. 2018.

MARANHÃO, R. C. et al. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. **Lipids**, v. 28, n. 8, p. 691–696, ago. 1993.

MARANHÃO, R. C. et al. Lipid transfers to HDL are predictors of precocious clinical coronary heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 3–4, p. 502–505, fev. 2012.

MARON, D. J., FAZIO S., LINTON M. F. Current perspectives on statins. **Circulation**, v. 101, n. 2, p. 207–213, jan. 2000.

MARTINEZ, L. R. C. et al. Transfer of lipids to high-density lipoprotein (HDL) is altered in patients with familial hypercholesterolemia. **Metabolism**, v. 62, n. 8, p. 1061–1064, ago. 2013.

MÄRZ, W. et al. HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. **Clinical Research in Cardiology**, v. 106, n. 9, p. 663–675, 24 set. 2017.

MASCARENHAS-MELO, F. et al. Implication of low HDL-c levels in patients with average LDL-c levels: a focus on oxidized LDL, large HDL subpopulation, and adiponectin. **Mediators Inflamm.** 2013;2013:612038.

MASCITELLI, L.; PEZZETTA, F. High-density lipoprotein cholesterol and sex difference in coronary heart disease risk. **Am J Med**, v. 119, n. 5, p. e17, maio. 2006.

MCGOWAN, M. P. There Is No Evidence for an Increase in Acute Coronary Syndromes After Short-Term Abrupt Discontinuation of Statins in Stable Cardiac Patients. **Circulation**, v. 110, n. 16, p. 2333–2335, 19 out. 2004.

MILLER, M.; ZHAN, M. Genetic determinants of low high-density lipoprotein cholesterol. **Curr Opin Cardiol**, v. 19, n. 4, p. 380-384, jul. 2004. 2004.

NICHOLLS, S. J. et al. Lipid lowering effects of the CETP inhibitor obicetrapib in combination with high-intensity statins: a randomized phase 2 trial. **Nat Med**, v. 28, n. 8, p. 1672-1678, aug. 2022.

NISSEN, S. E. et al. Effect of Recombinant ApoA-I Milano on Coronary Atherosclerosis in Patients With Acute Coronary Syndromes. **JAMA**, v. 290, n. 17, p. 2292, 5 nov. 2003.

NOFER, J.-R. et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 4, p. 569–581, 15 fev. 2004.

NOWBAR, A. N. et al. Mortality From Ischemic Heart Disease. **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**, v. 12, n. 6, jun. 2019.

OCKENE, I. S.; MILLER, N. H. Cigarette Smoking, Cardiovascular Disease, and Stroke. **Circulation**, v. 96, n. 9, p. 3243–3247, 4 nov. 1997.

OLIVEIRA, C. P. et al. Removal from the plasma of the free and esterified forms of cholesterol and transfer of lipids to HDL in type 2 diabetes mellitus patients. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 65, 7 dez. 2012.

ORAVEC, S. et al. HDL subfractions analysis: a new laboratory diagnostic assay for patients with cardiovascular diseases and dyslipoproteinemia. **Neuro endocrinology letters**, v. 32, n. 4, p. 502–9, 2011.

OUIMET, M.; BARRETT, T. J.; FISHER, E. A. HDL and Reverse Cholesterol Transport. **Circ Res**, v. 124, n. 10, p. 1505-1518, 10 may. 2019.

PAPADEMETRIOU, V. et al. Influence of risk factors on peripheral and cerebrovascular disease in men with coronary artery disease, low high-density lipoprotein cholesterol levels, and desirable low-density lipoprotein cholesterol levels. HIT Investigators. Department of Veterans Affairs HDL Intervention Trial. **Am Heart J**, v. 136 6(4 Pt 1), p. 734-740, out. 1998.

PROSPECTIVE STUDIES COLLABORATION. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. **The Lancet**, v. 373, n. 9669, p. 1083–1096, mar. 2009.

RADER, D. J. High-density lipoproteins and atherosclerosis. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 8, p. 62–70, out. 2002.

REGIELI, J. J. et al. Paraoxonase Variants Relate to 10-Year Risk in Coronary Artery Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 14, p. 1238–1245, set. 2009.

REHM, J.; GREENFIELD, T. K.; ROGERS, J. D. Average Volume of Alcohol Consumption, Patterns of Drinking, and All-Cause Mortality: Results from the US National Alcohol Survey. **American Journal of Epidemiology**, v. 153, n. 1, p. 64–71, 1 jan. 2001.

ROSS, R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 14 jan. 1999.

ROTH, G. A. et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 25, p. 2982–3021, dez. 2020.

ROUSSET, X. et al. Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 16, n. 2, p. 163-171, abr. 2009.

RYE, K.-A.; BARTER, P. J. Regulation of High-Density Lipoprotein Metabolism. **Circulation Research**, v. 114, n. 1, p. 143–156, 3 jan. 2014.

SCHWARTZ, G. G. et al. Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 22, p. 2089–2099, 29 nov. 2012.

SEGREST, J. P.; HARVEY, S. C.; ZANNIS, V. Detailed Molecular Model of Apolipoprotein A-I on the Surface of High-Density Lipoproteins and Its Functional Implications. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 10, n. 6, p. 246–252, ago. 2000.

SENTÍ, M. et al. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. **European Journal of Internal Medicine**, v. 14, n. 3, p. 178–184, maio 2003.

SHAH, P. K. et al. Effects of Recombinant Apolipoprotein A-I_{Milano} on Aortic Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Circulation**, v. 97, n. 8, p. 780–785, 3 mar. 1998.

SHAH, P. K. et al. High-Dose Recombinant Apolipoprotein A-I_{Milano} Mobilizes Tissue Cholesterol and Rapidly Reduces Plaque Lipid and Macrophage Content in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Circulation**, v. 103, n. 25, p. 3047–3050, 26 jun. 2001.

SIGAL, G. A. et al. Lipid Metabolism in Subclinical Hypothyroidism: Plasma Kinetics of Triglyceride-Rich Lipoproteins and Lipid Transfers to High-Density Lipoprotein Before and After Levothyroxine Treatment. **Thyroid**, v. 21, n. 4, p. 347–353, abr. 2011.

SIRTORI, C. R. et al. Cardiovascular Status of Carriers of the Apolipoprotein A-I_{Milano} Mutant. **Circulation**, v. 103, n. 15, p. 1949–1954, 17 abr. 2001.

SOARES, A. A. S. et al. HDL acceptor capacities for cholesterol efflux from macrophages and lipid transfer are both acutely reduced after myocardial infarction. **Clinica Chimica Acta**, v. 478, p. 51–56, mar. 2018.

SPRANDEL, M. C. et al. Alterations in lipid transfers to HDL associated with the presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. **Cardiovasc Diabetol**, 2015;14:107, ago. 2015.

STRONG, J. P. Prevalence and Extent of Atherosclerosis in Adolescents and Young Adults<<SUBTITLE&>Implications for Prevention From the Pathobiological

Determinants of Atherosclerosis in Youth Study</SUBTITLE>; **JAMA**, v. 281, n. 8, p. 727, 24 fev. 1999.

SUN, T. et al. Low serum paraoxonase1 activity levels predict coronary artery disease severity. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, p. 19443-19454, 21 mar. 2017.

TARDIF, J.-C. et al. Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized trial. **European Heart Journal**, v. 35, n. 46, p. 3277–3286, 2 dez. 2014.

VAISBERG, M. et al. Lipid Transfer to HDL is Higher in Marathon Runners than in Sedentary Subjects, but is Acutely Inhibited During the Run. **Lipids**, v. 47, n. 7, p. 679–686, 9 jul. 2012.

VERSCHUREN, W. M. et al. Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures. Twenty-five-year follow-up of the seven countries study. **JAMA**, v. 274, n. 2, p. 131–6, 12 jul. 1995.

VINAGRE, J. C. et al. Plasma kinetics of chylomicron-like emulsion and lipid transfers to high-density lipoprotein (HDL) in lacto-ovo vegetarian and in omnivorous subjects. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 3, p. 981–987, 26 abr. 2014.

WILLIAMS, C. M. Lipid metabolism in women. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 1, p. 153–160, 7 fev. 2004.

YAHAGI, K. et al. Sex differences in coronary artery disease: Pathological observations. **Atherosclerosis**, v. 239, n. 1, p. 260–267, mar. 2015.

ZHANG, Y. et al. HDL subfractions and very early CAD: novel findings from untreated patients in a Chinese cohort. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30741, 4 nov. 2016.