

MARÍLIA DA COSTA OLIVEIRA SPRANDEL

Efeito do metabolismo e função das lipoproteínas de alta densidade (HDL) em pacientes diabéticos tipo 2 com e sem doença coronária obstrutiva

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Whady Armindo Hueb

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sprandel, Marília da Costa Oliveira

Efeito do metabolismo e função das lipoproteínas de alta densidade (HDL) em pacientes diabéticos tipo 2 com e sem doença coronária obstrutiva / Marília da Costa Oliveira Sprandel -- São Paulo, 2013.

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

Orientador: Whady Armino Hueb.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 2 2.Aterosclerose 3.Doença da artéria coronariana 4.Metabolismo dos lipídeos 5.Lipoproteínas HDL

USP/FM/DBD-292/13

Dedico

Aos meus pais, que são meus modelos de pessoas de bem e batalhadoras, que sempre me apoiaram, incentivaram e são uma luz na minha vida.

Ao Leopoldo, que sempre incentivou, ajudou, participou, dividiu e é o melhor companheiro que eu poderia desejar

Ao Fernando, que no meio desse caminho apareceu e me fez conhecer o sentimento maior de todos.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Whady Armindo Hueb, por quem tenho grande admiração. Obrigada por ter aceitado me orientar, me incentivado, apoiado em todos os momentos, por permitir que eu entrasse nesse grupo e por contribuir tanto para minha formação e essa etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, por ter aberto as portas do laboratório e permitido a realização desse trabalho, pela orientação, pela confiança e pela preocupação com a minha formação como pesquisadora.

A equipe MASS: Cibele, Eduardo, Laura, Marcela, Mirtes, Priscila, Paulo, Rosa, Teryo, que me auxiliaram ao longo de todo o trabalho, e a Eliana pelo auxílio com a FAPESP e toda burocracia do caminho.

Ao Antonio Casella, Alexandre Segre e Desidério pelas ricas discussões científicas e disponibilidade em ajudar.

A equipe do laboratório de metabolismo de lípidos: Andrea, Ana Elisa, Antônio, Camila Han, Carmen Vinagre, Conceição, Elaine Tavares, Elaine Daminelli, Maria Carolina, Tatiana, pelo acolhimento, pela convivência, pelo auxílio em tantos momentos necessários e pelos bons momentos passados juntos.

Aos estagiários do laboratório de lípidos pelo auxílio em experimentos, freezer e tudo mais, especialmente a Camila Miotti, Deborah Bispo e Juliana Cristina.

As funcionárias da pós graduação, Neusa, Juliana e Tatiane, pela atenção e disposição em ajudar.

A amiga Ana Luiza, que tornou as disciplinas mais divertidas, me ajudou com os pacientes e com tudo mais que pôde. Obrigada por ser tão prestativa e companheira.

Ao Wanderley por ter realizado as coletas de sangue com o maior respeito, boa vontade e bom humor que se pode ver em alguém e nos contagiar com isso.

A Débora pela amizade, por ser prestativa e pelas ricas discussões sobre meus resultados. E por ser nossa terapeuta, claro.

Ao amigo Jeferson Silva, por ter aliviado minhas dores, participado de tantas discussões científicas e me aconselhado.

A amiga Alekssandra Tiemi, pelo carinho, pela ajuda, por ter sido sempre um ombro amigo, uma companheira e alguém com quem posso contar para tudo.

A amiga Fernanda Pozzi, por ter me ajudado em experimentos, disciplinas e pela companhia.

A Fátima por ter sido sempre prestativa em me ajudar, mesmo com o -80°C.

A Priscila, por sempre ajudar, por ter me apresentado muitas coisas e pessoas fora do laboratório, e por ter sido lá aquela que nos incentiva e nos traz hábitos saudáveis de religiosidade. Você é a amiga com quem dividi a bancada e o palco.

A amiga Marina Bertato, que dividiu as dores físicas, alegrias, pelo carinho e por estar sempre presente, ainda que distante.

A Adriana Bulgarelli, Ana Carolina Gagliardi, Cristina Pio, Fernanda Maniero, por terem sido amigas que encontrei nesse caminho e que fizeram diferença na minha vida.

A Sílvia, que com seu trabalho, carinho e dedicação a mim e minha família tornaram possíveis o término deste trabalho.

A Garrafola, que sempre me escutou quando precisei, deu conselhos e por ter orgulho de mim, mesmo sem saber se eu fazia mestrado ou doutorado ou uma "pós".

Aos meus irmãos Thiago e Helder pelo apoio apesar das gozações, mas também por elas existirem e nos fazerem rir.

Aos meus pais, sempre, sempre, sempre, muito obrigada.

“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)

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
Diabetes mellitus tipo 2	2
Lipoproteína de alta densidade (HDL)	3
Dislipidemia no diabetes mellitus tipo 2	7
Transferência de lípidos e DAC	9
2. OBJETIVOS.....	13
3. MÉTODOS.....	15
Determinações Bioquímicas Séricas.....	17
Preparo da nanoemulsão lipídica artificial.....	18
Ensaio de transferência de colesterol não esterificado, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL.....	19
Composição de colesterol não esterificado, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos da HDL.....	20
Determinação do diâmetro da partícula HDL	20
Determinação da concentração da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP).....	21
Análise estatística	21
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO.....	38

6. IMPLICAÇÕES CLÍNICAS	47
7. CONCLUSÕES.....	49
8. ANEXO	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTAS

ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ABC A1	“ATP-binding cassette transporter A1”
AGL	Ácidos graxos livres
APO	Apolipoproteína
AT1	Angiotensina 1
HbA1c	Hemoglobina glicada
CA	Circunferência abdominal
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
CNE	Colesterol não esterificado
DAC	Doença arterial coronária
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EC	Ester de colesterol
ECA	Enzima de conversão da Angiotensina
FL	Fosfolípidos
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL- C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
IMC	Índice de massa corporal
LCAT	Lecitina: colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípido
TG	Triglicérides
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

TABELAS

Tabela 1: Características basais dos pacientes	24
Tabela 2: Características dos exames laboratoriais dos pacientes.....	26
Tabela 3: Medicamentos utilizados pelos pacientes para tratamento do DM2 e das comorbidades.....	27
Tabela 4: Diâmetro e composição lipídica da HDL.....	28
Tabela 5: Transferência de lípides (%) da nanoemulsão para HDL de pacientes DM2 com e sem DAC.....	29
Tabela 6: Medida da concentração de CETP e atividade de LCAT nos grupos estudados.....	30
Tabela 7: Concentração de CETP nos pacientes DM2 com e sem DAC de acordo com o uso de insulina.....	31
Tabela 8: Correlações entre as transferências de lípides e demais parâmetros dos pacientes	32
Tabela 8: Correlações entre as transferências de lípides e demais parâmetros dos pacientes (conclusão).....	33
Tabela 9: Correlações entre a atividade de LCAT, diâmetro da HDL, concentração de CETP e demais parâmetros dos pacientes.....	34
Tabela 9: Correlações entre a atividade de LCAT, diâmetro da HDL, concentração de CETP e demais parâmetros dos pacientes (conclusão)	35
Tabela 10: Análise dos fatores determinantes para as transferências lipídicas por regressão linear múltipla	37

FIGURAS

Figura 1. Estrutura da lipoproteína de alta densidade (HDL)	4
Figura 2. Estrutura da LDL e da nanoemulsão lipídica artificial.....	10

RESUMO

Sprandel MCO. *Efeito do metabolismo e função das lipoproteínas de alta densidade (HDL) em pacientes diabéticos tipo 2 com e sem Doença Coronária Obstrutiva* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está associado ao aumento da mortalidade por doença arterial coronária (DAC). O DM2 afeta o metabolismo de lípidos, levando à dislipidemia, caracterizada por hipertrigliceridemia e baixa concentração plasmática de HDL-colesterol. Transferências de lípidos entre HDL e outras lipoproteínas são passos cruciais no metabolismo e função da HDL. **Objetivo:** Investigar se o desenvolvimento de DAC em pacientes com DM2 está associado com alterações na transferência de lípidos para HDL. **Métodos:** Foram estudados 79 pacientes com DM2 portadores de DAC obstrutiva (DM2-DAC) e 76 pacientes com DM2 e artérias coronárias angiograficamente normais (DM2). Foram avaliados o perfil lipídico, apolipoproteínas, composição lipídica da HDL, dosagem de CETP e LCAT. No ensaio de transferência, as amostras de plasma foram incubadas por 1h a 37° com uma nanoemulsão artificial marcada com ³H-éster de colesterol e ¹⁴C-fosfolípidos ou ³H -triglicérides e ¹⁴C-colesterol não esterificado. A quantificação da transferência de lípidos da nanoemulsão doadora para a HDL foi feita após a precipitação da fração não HDL. O tamanho da HDL foi medido por laser light scattering. **Resultados:** Os pacientes DM2-DAC apresentaram maior concentração de colesterol total (DM2-DAC=218±48; DM2=193±36; p< 0,001), LDL-C (147±44 vs 124±33; p<0,001) e apoB (103,1±20,4 vs 96,0±19,5; p=0,03) que o grupo sem DAC. Os grupos não mostraram diferença com relação à concentração plasmática de triglicérides (DM2-DAC=171±73; DM2=154±70; p=0,1) e HDL-C (41±9 vs 38±8; p=0,07). A transferência de éster de colesterol (4,0±0,6 vs 4,3±0,7; p=0,005) e de colesterol não esterificado (7,6±1,2 vs 8,2±1,5; p=0,006) foi menor no grupo com DAC, porém esse grupo teve maior concentração de colesterol não esterificado no plasma (36,3±8,0 vs 33,6±6,5 ;p=0,02). A concentração de CETP foi menor no grupo DM2DAC (2,1±1,0 vs 2,5 ±1,1; p=0,02). O diâmetro das partículas de HDL não diferiu entre os grupos (8,9±1,2 vs 9,0±0,6; p=0,4), nem a composição lipídica da HDL (éster de colesterol: 52,2 ± 10,8 vs 50,6 ± 10,7; p=0,38; colesterol não esterificado: 9,0 ± 2,8 vs 8,4 ± 2,7; p=0,19; triglicérides: 13,4 ± 3,9 vs 12,4 ± 3,9; p=0,11 e fosfolípidos: 77,2 ± 16,7 vs 78,8 ± 20,5; p=0,60). A atividade da enzima LCAT não diferiu entre os grupos (1,34±0,12 vs 1,33±0,10; p=0,9). As transferências de todos os lípidos apresentaram correlação entre si. Na análise multivariada, a presença de DAC influenciou a transferência de éster de colesterol, quando ajustado para HDL-C, apoA1, CETP massa e LDL-C (r²=0,5, p=0,03) e a transferência de colesterol não esterificado, quando ajustado para apoA1, apoB, LCAT, glicemia, idade e sexo (r²=0,7, p=0,003). **Conclusão:** Na amostra estudada, pacientes diabéticos portadores de DAC apresentam menor transferência de colesterol para HDL comparados com os pacientes diabéticos sem DAC obstrutiva.

Descritores: Diabetes mellitus, Doença arterial coronária, metabolismo de lípidos, HDL

ABSTRACT

Sprandel MCO. Effect of metabolism and function of high density lipoprotein (HDL) in type 2 diabetic patients with and without obstructive coronary artery disease [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

Aim: Type 2 diabetes mellitus (DM2) is associated with morbidity and mortality secondary to coronary artery disease (CAD). DM2 affects lipid metabolism, and diabetic dyslipidemia is characterized by increased levels of triglycerides and reduced levels of HDL-cholesterol. Lipid transfer between HDL and the other lipoproteins is a crucial step in HDL function and metabolism. **Objective:** The purpose of this study was investigate whether the susceptibility of patients with type 2 diabetes mellitus to develop CAD is related with alterations in lipid transfers to HDL. **Methods:** 79 patients with DM2 and obstructive CAD (DM2-CAD) and 76 with DM2 (DM2 group) and angiographic normal coronary arteries were studied. Lipid profile, apolipoproteins, HDL lipid composition, CETP and LCAT activity were evaluated. In the lipid transfer assay, fasting plasma samples were incubated for 1h at 37°C with a donor artificial nanoemulsion labeled with ³H -cholesteryl-esters and ¹⁴C-phospholipids or ³H-triglycerides and ¹⁴C-unesterified cholesterol. Radioactive lipids transferred from the donor nanoemulsion to HDL were quantified in the supernatant after chemical precipitation of non-HDL fractions and nanoemulsion. HDL size was measured by laser light scattering. **Results:** In DM2-CAD, total cholesterol (DM2-DAC=218±48; DM2=193±36; p< 0,001), LDL-C (147±44 vs 124±33; p<0,001) and apoB (103,1±20,4 vs 96,0±19,5; p=0,03) were higher than in DM2 group. The groups showed no differences with respect to plasma triglycerides levels (DM2-DAC=171±73; DM2=154±70; p=0,1) nor HDL-C (41±9 vs 38±8; p=0,07). DM2-CAD showed diminished transfer to HDL of esterified cholesterol (4,0±0,6 vs 4,3±0,7; p=0,005) and unesterified cholesterol (7,6±1,2 vs 8,2±1,5; p=0,006). However, the DM2-CAD group showed higher levels of plasmatic unesterified cholesterol (36,3±8,0 vs 33,6±6,5 ;p=0,02). CETP mass was lower in the DM2-CAD group (2,1±1,0 vs 2,5 ±1,1; p=0,02). HDL particle diameter was not different between groups (8,9±1,2 vs 9,0±0,6; p=0,4) neither its lipid composition (esterified cholesterol: 52,2 ± 10,8 vs 50,6 ± 10,7; p=0,38; unesterified cholesterol: 9,0 ± 2,8 vs 8,4 ± 2,7; p=0,19; triglycerides: 13,4 ± 3,9 vs 12,4 ± 3,9; p=0,11; phospholipids: 77,2 ± 16,7 vs 78,8 ± 20,5; p=0,60). LCAT activity was not different in the two groups (1,34±0,12 vs 1,33±0,10; p=0,9). In multivariate analysis, DAC influenced cholesteryl ester transfer, when adjusted to HDL-C, apoA1, CETP mass and LDL-C (r²=0,5, p=0,03), and unesterified cholesterol transfer, when adjusted to apoA1, apoB, LCAT, glycemia, age and sex (r²=0,7, p=0,003). **Conclusion:** In these sample, DM2-CAD patients show diminished cholesterol transfer to HDL particles when compared to diabetic patients without obstructive CAD.

Descriptors: Diabetes mellitus, Coronary artery disease, lipid metabolism, HDL.

1. INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais comum de diabetes e está associada com aumento da morbidade e também da mortalidade. Os pacientes portadores de DM2 estão de 2 a 4 vezes mais susceptíveis a desenvolverem complicações micro e macrovasculares sistêmicas, além de neuropatia, nefropatia, anormalidades oftálmicas e doença cardiovascular do que indivíduos não-diabéticos (1, 2).

O DM2 é uma das doenças mais importantes a nível global. Estima-se que o número de pessoas com diabetes tenha dobrado nas últimas décadas, passando a mais de 366 milhões de pessoas, sendo que a expectativa é que esse número chegue a 552 milhões em 2030 (3).

Trata-se de uma doença progressiva, caracterizada por declínio da função das células β do pâncreas, deficiência na secreção de insulina e resistência periférica a insulina, porém suas contribuições para o desenvolvimento da hiperglicemia pode variar devido à heterogeneidade da doença (4).

O DM2 é associado com morbidade e aumento da mortalidade por doença cardiovascular e é considerado um fator de risco para esta doença (5). A aterosclerose, em pacientes com DM2, é caracterizada por doença arterial coronária (DAC), doença arterial periférica e doenças vasculares cerebrais (2).

O padrão de acometimento aterosclerótico é semelhante em diabéticos e não diabéticos, porém os diabéticos têm doença de progressão mais rápida e acometimento mais difuso, maior incidência de oclusão multiarterial na coronariografia e maior número de segmentos de vasos doentes em relação

a não diabéticos (2, 6). No diabético o infarto agudo do miocárdio frequentemente é mais extenso, apresentando menores taxas de sobrevivência em médio prazo quando comparado com a população de não diabéticos (5).

O processo de aterogênese no DM2 não difere substancialmente do que ocorre em indivíduos não diabéticos, envolvendo disfunção endotelial, processos de natureza inflamatório-proliferativa, depósito lipídico, alterações de coagulação e stress oxidativo, entre outros distúrbios (2, 7).

A fisiopatologia da aterosclerose supostamente acelerada no diabetes não está bem esclarecida. Parte do risco cardiovascular associado ao DM2 se deve aos fatores de risco agrupados, como hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade e dislipidemia. Todavia, estima-se que 75-90% do risco se deva diretamente ao diabetes e que ele potencialize o risco associado aos demais fatores (8). Pacientes com DM2 também tem maior incidência e progressão de cálcio na artéria coronária, predizendo eventos cardiovasculares (9).

Por outro lado, a existência de pacientes portadores de DM2 com artérias coronárias angiograficamente normais constituem um desafio na compreensão da fisiopatologia da doença, na presença dos mesmos fatores de risco.

Lipoproteína de alta densidade (HDL)

A lipoproteína de alta densidade é composta por partículas heterogêneas com tamanho variando entre 7 a 14nm (10). A HDL nascente é produzida no fígado e intestino como partículas discóides compostas de fosfolípidos (FL) e colesterol não esterificado (CNE). Essas partículas captam o

excesso de colesterol não esterificado das células dos tecidos periféricos e da superfície das lipoproteínas ricas em triglicérides, sendo convertidas em partículas maiores, as HDL₃. A aquisição de lípidos e esterificação do colesterol pela ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) transforma as partículas em forma esférica, as HDL₂. O éster de colesterol (EC) é mais hidrofóbico que o colesterol não esterificado e, portanto se move para o núcleo da partícula. Esse processo previne que o colesterol volte por difusão passiva da HDL para as células periféricas (1). A apolipoproteína (apo) A1 atua como co-fator da LCAT, como a maior parte da apo A1 presente no plasma está na fração HDL e a LCAT também é associada à HDL, a esterificação do colesterol ocorre principalmente nessas lipoproteínas (11, 12).

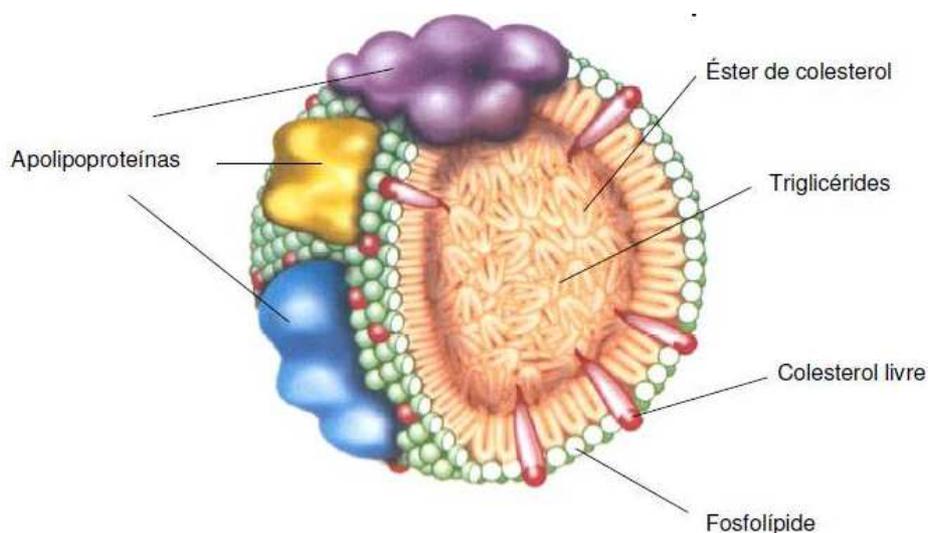


Figura 1. Estrutura da lipoproteína de alta densidade (HDL)

A HDL continua a ser remodelada pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) e lipase hepática. A CETP promove a troca de éster de colesterol por triglicérides (TG) entre as lipoproteínas (13). Na HDL, a ação da CETP retira éster de colesterol da partícula e a enriquece com TG, que são hidrolisados pela lipase hepática. A HDL também desempenha a importante função de doar apolipoproteínas para as lipoproteínas ricas em triglicérides, necessárias ao metabolismo das mesmas. A PLTP transfere fosfolípidos da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e de densidade intermediária (IDL) para a HDL (14) e catalisa a fusão de pequenas HDL (HDL₃) durante o processo de formação da HDL maior (1).

Um importante mecanismo anti-aterogênico da HDL está relacionado ao transporte reverso de colesterol. Nesse processo, a HDL remove colesterol dos tecidos periféricos, entre eles os macrófagos da íntima arterial, e o transporta para o fígado, onde ele pode ser excretado na bile e nas fezes (15) (16). Foi demonstrado que o efluxo celular de colesterol para HDL está negativamente associado com a espessura média da íntima da carótida independentemente da concentração de HDL e de apo A1 (17). Além disso, tem surgido várias evidências de que o efluxo celular de colesterol eficiente é dependente tanto dos altos níveis de HDL-colesterol (HDL-C) quanto da qualidade biológica das diferentes partículas HDL.

A HDL também pode proteger contra a oxidação de LDL e de fosfolípidos (18), devido à associação de paraoxonase 1, estimular a função endotelial através da síntese de óxido nítrico e tem atividades anti-inflamatória, antitrombótica e vasodilatadora, que contribuem para a ação anti-aterogênica

da lipoproteína (19, 20). Além disso, a HDL e sua principal proteína, apo A1, agem na homeostase da glicose estimulando a secreção de insulina e aumentando a captação de glicose pelo músculo esquelético (21-23).

A HDL é, portanto, constantemente remodelada e a transferência de lípidos é essencial para o papel dessa lipoproteína na esterificação do colesterol e no transporte reverso. Ambos os processos são interligados e são a chave para a homeostase do colesterol no organismo. A esterificação estabiliza o “pool” plasmático do colesterol, enquanto o transporte reverso permite o transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado e sua eliminação pela bile (24).

Como o processo de transferência de lípidos é determinante para a composição e metabolismo da HDL, também é possível que as outras funções antiateroscleróticas da lipoproteína sejam afetadas nesse processo. Um exemplo clássico da influência deste processo é o “efeito gangorra” que acontece nas hipertrigliceridemias, que determinam a diminuição do HDL-C: quando aumenta a concentração das VLDL, ricas em triglicérides, aumenta a transferência de colesterol da HDL para a VLDL e a transferência de triglicérides da VLDL para a HDL. A HDL fica então enriquecida em triglicérides e perde parte do seu conteúdo de colesterol. Isto desestabiliza a partícula da HDL, pela ação da lipase hepática sobre os TG, levando à diminuição das HDL no plasma (25).

A concentração de colesterol de HDL no plasma e da apo A1 estão negativamente relacionados com a incidência de DAC. Ao lado da terapêutica de redução do LDL-colesterol (LDL-C), o aumento do HDL-C tornou-se também um

importante alvo terapêutico para a prevenção primária e secundária dos eventos cardiovasculares.

Entretanto, estudos têm mostrado que apenas a alta concentração de HDL-C não é suficiente para reduzir os eventos cardiovasculares e o metabolismo dessas partículas, que são variadas e modificadas dinamicamente, ainda precisa ser melhor compreendido (16).

Dislipidemia no diabetes mellitus tipo 2

A dislipidemia é o principal distúrbio metabólico encontrado no DM2. As principais alterações encontradas são hipertrigliceridemia, devido a um aumento de produção hepática de VLDL e a uma diminuição da atividade da lipoproteína lipase (LPL), e HDL-C diminuído (26) . Nesses indivíduos os níveis de colesterol LDL geralmente não estão significativamente anormais, mas essa anormalidade frequentemente leve associada ao diabetes implica uma anormalidade qualitativa na estrutura do LDL, ou seja, tamanho diminuído e densidade aumentada da partícula de LDL (27).

Os ácidos graxos livres (AGL) derivados do tecido adiposo são a principal fonte de TG para o fígado e para a produção de VLDL. O influxo aumentado de VLDL ricas em TG no DM2 tem importantes consequências para o metabolismo intravascular das lipoproteínas. Essas partículas são um bom substrato para a CETP, que promove a troca de éster de colesterol por TG entre a HDL e as outras lipoproteínas. Portanto, essas lipoproteínas se tornam relativamente ricas em TG e pobres em EC. Como consequência, elas são hidrolizadas pela LPL e lipase hepática com a produção de LDL pequenas e

densas (por causa da depleção de TG e EC na partícula) e menores HDL (28). O aumento de TG é maior quando o DM2 está descompensado por aumento dos AGL que chegam ao fígado, e pela diminuição do clearance de VLDL via LPL que é estimulada pela insulina (29, 30).

Os níveis plasmáticos aumentados de TG, baixos níveis de HDL e partículas de LDL pequenas e densas geralmente ocorrem em conjunto, em um padrão de lipoproteínas referido como dislipidemia aterogênica (31). No estudo United Kingdom Prospective Diabetes Study Group foi evidenciado que um aumento na concentração de LDL-C e a diminuição de HDL-C eram principais fatores de risco e preditores do infarto do miocárdio, sinalizando a importância do controle lipídico no diabético (32).

As concentrações diminuídas de HDL se refletem principalmente em decréscimos nas partículas maiores. Foi observado que as HDL pequenas geradas nos pacientes com DM2 tem metabolismo anormal (29). Nos indivíduos com DM2 além de uma velocidade aumentada de catabolismo de HDL, há diversas indicações de que a composição da HDL pode estar alterada (26, 33). Nos diabéticos foi observada uma proporção aumentada de TG na HDL e essas alterações da composição parecem estar relacionadas à atividade da LPL do tecido adiposo. O alto nível de triglicérides na HDL dirige o transporte de lípidos entre lipoproteínas ricas em TG e partículas de HDL (34).

Além disso, a glicação não enzimática da HDL parece interferir com a ligação ao receptor de HDL (35). As anormalidades na composição da HDL foram notadas mesmo em indivíduos com controle glicêmico ótimo (36). Além disso, a HDL dos DM2 tem menor atividade antioxidante e vasodilatadora (26).

Portanto, as partículas de HDL dos DM2 mostram importantes alterações não só quantitativas mas também qualitativas. Todas essas alterações na composição da HDL podem reduzir o seu papel no transporte reverso do colesterol e, portanto, na sua função antiaterosclerótica.

Transferência de lípidos e DAC

Recentemente, desenvolvemos uma nova metodologia de grande praticidade para avaliar simultaneamente as transferências para a HDL dos quatro principais lípidos da circulação, o éster de colesterol, fosfolípidos, triglicérides e o colesterol não esterificado (37). Neste ensaio, uma nanoemulsão artificial similar a LDL (Figura 2) é usada como doadora de lípidos radioativos para a HDL num ensaio *in vitro*. Após incubação da nanoemulsão radioativa com o plasma, a HDL é separada no sobrenadante por precipitação química das outras lipoproteínas e da nanoemulsão artificial. A transferência dos quatro lípidos da nanoemulsão para a fração HDL é medida quantificando-se a radioatividade no sobrenadante após a incubação.

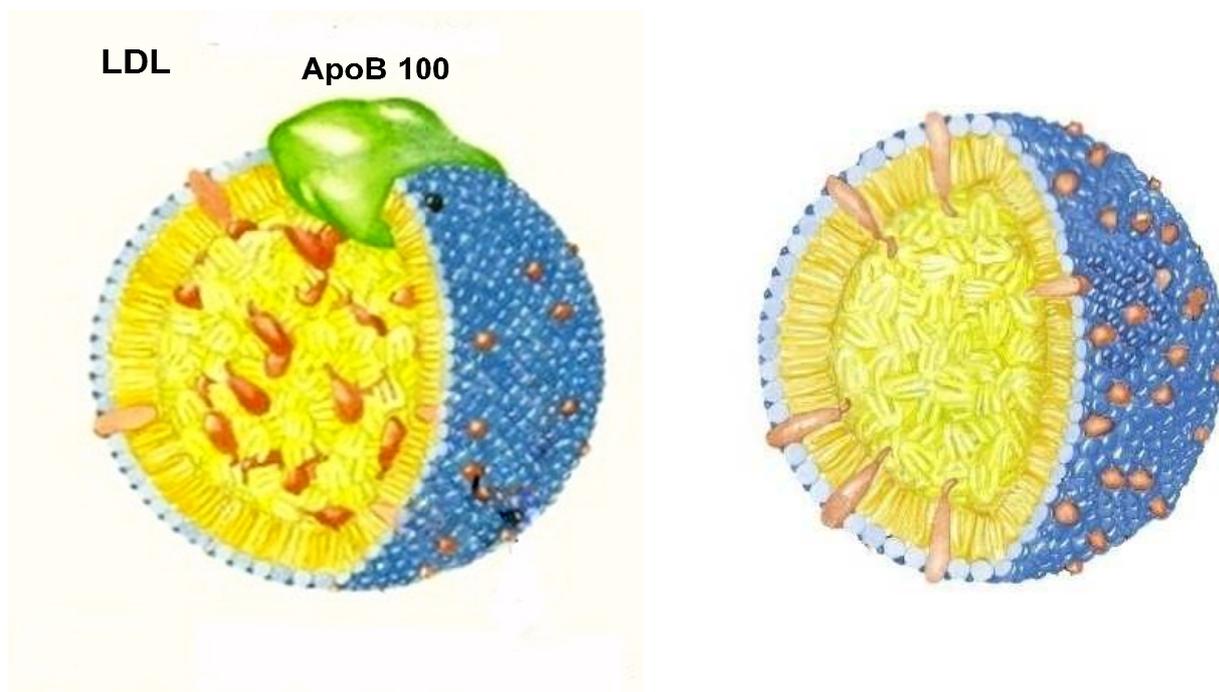


Figura 2. Estrutura da LDL e da nanoemulsão lipídica artificial

A transferência de lípidos entre classes de lipoproteínas é bidirecional e depende da estrutura e concentração da lipoproteína doadora e receptora, assim como da ação de proteínas de transferências, a CETP e a PLTP (20, 38, 39). Os trabalhos onde se investigou a relação entre transferências de lípidos e proteínas de transferência e a incidência de doença arterial coronária (DAC) são contraditórios.

A expressão de PLTP está aumentada em diferentes patologias associadas com o aumento do risco de DCV, como obesidade, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 1 e 2 (40, 41). Ela aumenta a produção hepática de VLDL e está associada a proteínas pró-inflamatórias do plasma (42). Foi relatado que a atividade e concentração de PLTP estão aumentadas em pacientes com doença cardiovascular (43-45) e está correlacionada positivamente com baixos níveis de HDL (46). Contraditoriamente, foi

reportado que a baixa atividade de PLTP é um fator de risco para aterosclerose periférica (47).

Já com relação a CETP, não está claro se a sua concentração e atividade está diminuída ou aumentada no DM2 (48-52). Estudos mostram que a deficiência da CETP reduz o transporte de triglicérides e éster de colesterol entre HDL e partículas ricas em triglicérides elevando os níveis de HDL, indicando que o aumento da atividade da CETP pode ser pro aterogênico (24). Estudos observacionais do Framingham e LURIC mostraram que baixas concentrações plasmáticas de CETP estavam associadas com maior morbidade e mortalidade cardiovascular (53, 54). No Framingham heart study, a atividade de CETP foi inversamente correlacionada à incidência de DAC (54). Contraditoriamente, outro estudo mostra que o papel da concentração de CETP no plasma parece não estar relacionado a incidentes cardiovasculares (55).

A abordagem terapêutica em que os níveis HDL são aumentados através do bloqueio da CETP, utilizando o fármaco Torcetrapib, não se mostrou benéfica na prevenção da DAC. Pelo contrário, até aumentou a frequência de eventos, o que levou à suspensão dos ensaios clínicos com este fármaco (56). O aumento de HDL-C não levou a um desfecho favorável, não houve efeito no volume do ateroma dos segmentos doentes na maioria dos pacientes tratados com Torcetrapib.

No entanto, novos bloqueadores de CETP estão sendo desenvolvidos, com os quais os efeitos colaterais do Torcetrapib, como a ativação do sistema renina-angiotensina podem ser evitados (57). A escolha da HDL como alvo terapêutico mostra a importância da função antiaterogênica desta lipoproteína.

Embora haja muitos estudos enfocando o transporte de lípidos da membrana celular para a HDL, o transporte entre as diferentes classes de lipoproteínas é pouco explorado.

A complexa relação entre transferência de lípidos e aterogênese ainda é desconhecida. A transferência de lípidos tem um papel crítico no metabolismo da HDL do plasma remodelando constantemente as lipoproteínas e, portanto, interferindo nos seus vários aspectos funcionais.

Como ocorrem perturbações marcantes do status da HDL no DM2, como a queda na sua concentração e alterações na transferência de lípidos que afetam a lipoproteína, é fundamental o entendimento das alterações do metabolismo da HDL no DM2, um terreno muito complexo e ainda bastante inexplorado.

Por isso torna-se importante saber quais as alterações do status metabólico da HDL em pacientes com DM2 com DAC que podem ter contribuído para o desenvolvimento de DAC, ou ainda que fatores no status metabólico da HDL podem ter protegido os pacientes com DM2 sem DAC contra o desenvolvimento de DAC.

2. OBJETIVOS

Objetivamos avaliar a transferência de lípidos para a HDL em pacientes diabéticos com e sem doença coronária obstrutiva e as possíveis alterações nas enzimas envolvidas nessa etapa do metabolismo.

3. MÉTODOS

Foram selecionados do banco de dados do projeto MASS pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 com doença arterial coronária estável com lesão obstrutiva >80% nas três artérias coronárias principais. Além disso, foram também incluídos pacientes com artérias coronárias angiograficamente normais. Os dados para avaliação das artérias coronárias foram obtidos por estudo cineangiocoronariográfico e, o critério diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, foi aquele proposto pela American Diabetes Association.

Critérios para inclusão: Todos os pacientes livres de sintomas e com controles laboratoriais normais.

Critérios para não inclusão: miocardiopatia hipertrófica ou dilatada, infarto do miocárdio recente diabetes mellitus tipo 1, uso de medicamentos hipolipemiantes, tabagistas, doenças crônico-degenerativas, hipertensão arterial grave, insuficiência renal (concentrações plasmáticas de creatinina, acima dos valores de referência), insuficiência hepática (atividade das enzimas aspartatoaminotransferase (AST), alanina amino transferase (ALT), gama glutamiltransferase (γ GT) e fosfatase alcalina acima dos valores de referência, triglicérides acima do valor de 400 mg/dl, hipotireoidismo hemorragias recentes, trombocitopenia, punção espinal recente ou cirurgia recente

Os pacientes foram avaliados quanto às características clínicas e laboratoriais e foram orientados detalhadamente sobre os objetivos do estudo, assim como todos os procedimentos envolvidos no protocolo de pesquisa. Além disso, foram orientados para obedecerem à dieta pobre em gorduras saturadas e também em hidrato de carbono.

Após todos os esclarecimentos, os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido do estudo atual além de um termo prévio,

aprovado pela Comissão Científica do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas sob o nº946/94/56 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – CAPPesq sob o nº264/94.

Esse estudo foi parcialmente financiado pela FAPESP sob o nº2010/51826-8.

Determinações Bioquímicas Séricas

As avaliações do perfil lipídico e glicose foram realizadas no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor-HCFMUSP. Todos os participantes estavam em jejum de 12 horas.

A determinação dos níveis plasmáticos de colesterol total, TG e glicose foi realizada através de método colorimétrico enzimático (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, Brasil).O colesterol de HDL foi determinado pelo mesmo método utilizado para o colesterol total, após precipitação química das lipoproteínas que contêm apo B, utilizando-se reagente precipitante constituído por cloreto de magnésio e ácido fosfotungstíco. Segundo o método de Friedewald, o valor do colesterol de LDL foi calculado pela diferença entre o colesterol total e a somatória do colesterol de HDL e colesterol de VLDL. O colesterol de VLDL foi calculado através da divisão dos níveis plasmáticos de triglicérides por 5.

$LDL-C = [colesterol\ total - (HDL-C + VLDL-C)]$

$Colesterol\ de\ VLDL = triglicérides / 5$

As concentrações plasmáticas de apo A1 e apo B foram determinadas através do método turbidimétrico (Roche, USA). A dosagem do colesterol não esterificado foi feita pelo método enzimático colorimétrico (Wako- Wako Pure Chemical Industrie).

Preparo da nanoemulsão lipídica artificial

A nanoemulsão lipídica artificial foi preparada segundo a técnica descrita por GINSBURG et al. (58) modificada por MARANHÃO et al. (59). Em um frasco são pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio: metanol (2:1). Posteriormente, foram adicionados à mistura de lípidos os isótopos ^3H - éster de colesterol e ^{14}C -fosfatidilcolina ou ^3H -triglicerídeos e ^{14}C -colesterol não esterificado. Os solventes residuais foram então evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dessecação a vácuo, por 16h, a 4°C. Após a adição de 10 mL de tampão tris-HCl 0,01M, pH 8, a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultra-sônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil) potência 125 watts, durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55°C. Para obtenção da nanoemulsão lipídica artificial na faixa de diâmetro e tamanho desejados, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (ultracentrífuga, rotor Beckman SW –41). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a 200.000 x g por 30 minutos, a 4°C, foi removido por aspiração (1 mL) e desprezado. Ao

restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para 1,21g/mL. Após a segunda centrifugação (200.000 x g por 2 horas a 4°C), a nanoemulsão lipídica artificial foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão tris HCl 0,01 M, pH 8. Finalmente, a emulsão foi esterilizada por filtração em membrana Milipore de 0,22 µm de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até 15 dias.

Ensaio de transferência de colesterol não esterificado, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL

O ensaio de transferência de lípidos foi realizado segundo descrito por Lo Prete et al. (37). Uma alíquota de 200 µL de plasma dos participantes foi incubada com 50 µL da nanoemulsão LDE marcada com os lípidos radioativos (oleato de colesterol-¹⁴C, trioleína-³H, colesterol-³H e fosfolípidos-¹⁴C), 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 MgCl₂) seguido de agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos, a 3000 rotações por minuto. O infranadante, contendo a nanoemulsão LDE e as lipoproteínas plasmáticas que contém apo B, VLDL e LDL foi desprezado. O sobrenadante, contendo a HDL, foi submetido à contagem da radioatividade presente, que corresponde à transferência dos lípidos radioativos da LDE para a HDL do indivíduo. Foi calculada a percentagem de transferência de cada um dos lípidos

radioativos, considerando como 100%, a radioatividade total utilizada na incubação. Foi efetuada a correção dos valores pelo HDL-C do indivíduo e os resultados foram expressos em percentagem de lípidos transferidos / mL de plasma / mg/dL de HDL-C.

Composição de colesterol não esterificado, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos da HDL

A HDL foi separada por precipitação das lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2%/ MgCl₂ 3M, v/v). A mistura foi agitada por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm.

No sobrenadante foi determinada a concentração de colesterol não esterificado e fosfolípidos pelo método enzimático da Wako Chemicals. O TG foi determinado pelo método enzimático Triglicérides GPO-ANA pelo sistema de medida colorimétrica (Life Science UV/Vis Spectrophotometer, DU[®]530, Beckman). A concentração de éster de colesterol foi obtida pela diferença entre a concentração de HDL-C e de colesterol não esterificado da fração HDL multiplicado por 1,67.

Determinação do diâmetro da partícula HDL

O tamanho das lipoproteínas foi medido por espalhamento de luz (*light scattering*, utilizando o equipamento *Laser Light Scattering* (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp.). A LDL foi isolada por ultracentrifugação em gradiente de densidade e a HDL foi separada por precipitação química das partículas

lipoprotéicas que contém apo B, através da adição de 500 μ L polietilenoglicol 8000 (PEG) (200g/L). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em solução de NaCl (0,15M) e, em seguida, passado em filtro Millipore 0,22 μ m de diâmetro. A medida do diâmetro da HDL foi medida por espalhamento de luz, coletado em um ângulo de 90° e 658 nm e expresso pelos resultados médios obtidos em 5 corridas de 1 minuto e 30 segundos cada (60).

Determinação da concentração de CETP

A massa de CETP foi determinada pelo método de imunoenensaio da Alpco Diagnostics (CETP ELISA). Nesse método, a CETP presente no plasma dos pacientes reage com dois anticorpos monoclonais e a concentração da proteína é proporcional à absorbância da amostra.

Análise estatística

Os dados foram apresentados com média \pm desvio padrão. Para a comparação da média dos dois grupos foi utilizado o teste t de Student. Para se testar a homogeneidade entre as proporções foi utilizado o teste exato de Fisher.

Os estudos de correlação foram efetuados através dos testes de correlação de Pearson. Em todas as análises efetuadas, os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

A análise de regressão linear múltipla foi usada para investigar a influência de DAC e outros fatores independentes na transferência de lípidos

para a HDL. O modelo foi baseado no conjunto de variáveis que tiveram significância ($p < 0,1$) na análise univariada, além de sexo, idade e IMC. Foi então ajustado um modelo de regressão linear do tipo "enter", para a escolha dos parâmetros mais importantes na explicação das variáveis de transferência. A relação entre as variáveis é expressa pelo coeficiente de múltipla regressão (β), que fornece a informação sobre a relação entre a transferência lipídica e as variáveis independentes. O software utilizado para a realização dos testes foi o SPSS 20.0 para Windows.

4. RESULTADOS

Dos 155 pacientes com DM2 da amostra estudada, 79 eram portadores de doença coronária obstrutiva. Desses, 42 eram do sexo masculino e 37 do feminino formando assim o grupo 1 (DM2+DAC). Dos 76 pacientes restantes, sem obstrução angiográfica nas artérias coronárias, 33 eram do sexo masculino e 42 do feminino, formando o grupo 2 (DM2).

Os grupos eram semelhantes com relação à idade, IMC, circunferência abdominal e presença de hipertensão, como mostra a tabela 1. O grupo com DAC apresentou maior tempo de diabetes que o grupo DM2, com mediana de 8,5 e 6,4 anos, respectivamente.

Tabela 1: Características basais dos pacientes

Parâmetros	Grupos		p
	DM2 G1 (n=76)	DM2+DAC G2 (n =79)	
Homens	33	42	0,27
Mulheres	42	37	0,27
Idade	63 ± 9	63 ± 8	0,84
IMC (Kg/m²)	31,4 ± 6,2	30,8 ± 6,1	0,57
CA	107 ± 16	104 ± 13	0,17
HAS -n (%)	70(92%)	70(89%)	0,58
Tempo de DM2 (anos)	7 ± 6	10 ± 9	0,01

Dados expressos pela média ± desvio padrão. DM2: Diabetes tipo 2; DAC; Doença Arterial Coronária; G1:Grupo1; G2:Grupo 2. IMC: índice de massa corporal, CA: Circunferência abdominal, HAS:hipertensão arterial sistêmica.

As características laboratoriais dos pacientes tais como a concentração plasmática de lípides e apolipoproteínas e controle glicêmico estão listadas na tabela 2. O grupo DM2 com DAC apresentou maior concentração de colesterol total, LDL-C e apo B e a concentração de HDL-C foi semelhante nos dois grupos. Além disso, o grupo DM2+DAC apresentou maior concentração de colesterol não esterificado no plasma sem diferença na relação colesterol total/colesterol não esterificado entre os grupos. A concentração de ácidos graxos livres foi semelhante entre os grupos DM2 com e sem DAC. Os grupos foram semelhantes também com relação a glicemia de jejum e HbA_{1c}.

Tabela 2: Características dos exames laboratoriais dos pacientes

Características laboratoriais	Grupos		
	DM2 G1 (n=76)	DM2+DAC G2 (n =79)	p
Glicemia (mg/dL)	132 ± 33	127 ± 44	0,40
Triglicérides (mg/dL)	154 ± 70	171 ± 73	0,13
Colesterol (mg/dL)			
Total	193 ± 36	218 ± 48	<0,001
HDL	41 ± 9	38 ± 8	0,07
LDL	124 ± 33	147 ± 44	<0,001
não esterificado	33,6 ± 6,5	36,3 ± 8,0	0,02
CT/Colesterol não esterificado	5,8 ± 1,0	6,2 ± 1,2	0,05
TG/HDL	4,0 ± 2,4	4,6 ± 2,2	0,14
HbA_{1c} (%)	7,2 ± 1,6	7,1 ± 1,8	0,85
Apolipoproteína (mg/dL)			
A1	139,3 ± 28,1	132,5 ± 24,3	0,11
B	96,0 ± 19,5	103,1 ± 20,4	0,03
Ácidos graxos livres (mEq/L)	0,52 ± 0,25	0,46 ± 0,20	0,10

Dados expressos pela média ± desvio padrão. DM2: Diabetes tipo 2, DAC: Doença Arterial Coronária, G1:Grupo1, G2:Grupo 2, HDL: lipoproteína de alta densidade, LDL: lipoproteína de baixa densidade, HbA_{1c}: Hemoglobina glicada.

Na tabela 3 constam os medicamentos utilizados pelos pacientes. Aproximadamente 30% dos pacientes de ambos os grupos faziam uso de insulina. A metformina foi o hipolipemiante mais utilizado, seguido de

sulfoniurías. No grupo com DAC 30 pacientes (38%) faziam uso da associação metformina e sulfoniuréia, enquanto no grupo sem DAC esse número foi de 15 pacientes (20%, $p=0,01$). O uso de AAS foi mais presente no grupo DM2 com DAC do que sem DAC, enquanto vasodilatadores e diuréticos foram mais usados no grupo sem DAC do que com DAC..

Tabela 3: Medicamentos utilizados pelos pacientes para tratamento do DM2 e das comorbidades

Medicamentos	Grupos		
	DM2 G1 (n=76)	DM2+DAC G2 (n =79)	p
Insulina	26%	33%	0,38
Metformina	67%	84%	0,02
Sulfoniurías	29%	25%	0,71
Tiazolidinedionas	0%	3%	0,49
Beta bloqueador	63%	76%	0,11
Bloqueador de canal de cálcio	41%	29%	0,13
Vasodilatador de ação central	17%	5%	0,02
Inibidor de ECA	58%	43%	0,07
Diurético	49%	11%	<0,0001
AAS	62%	90%	<0,0001
Bloqueador do receptor AT1	26%	27%	1,0

Dados expressos em porcentagem, teste exato de Fisher. DM2: Diabetes tipo 2, DAC: Doença Arterial Coronária, G1: Grupo1, G2:Grupo 2, ECA: Enzima de conversão da Angiotensina, AAS: Acido Acetil Salicílico, AT1: Angiotensina 1.

A Tabela 4 mostra o tamanho das partículas de HDL e a composição lipídica destas partículas nos pacientes estudados.

Não houve diferença no diâmetro médio da partícula de HDL dos dois grupos estudados e a composição de lípides foi semelhante entre os grupos.

Tabela 4: Diâmetro e composição lipídica da HDL

Parâmetros	Grupos		p
	DM2 G1 (n=76)	DM2+DAC G2 (n =79)	
Diâmetro da HDL (nm)	9,0 ± 0,6	8,9 ± 1,2	0,39
Composição de lípides da HDL (%)			
Ester de colesterol	34,7 ± 5,6	34,0 ± 5,5	0,45
Colesterol não esterificado	6,0 ± 1,7	5,6 ± 1,6	0,16
Triglicérides	8,9 ± 2,5	8,4 ± 2,6	0,26
Fosfolípidos	50,3 ± 6,1	52,0 ± 6,0	0,12

Dados expressos pela média ± desvio padrão. . DM2: Diabetes tipo 2, DAC: Doença Arterial Coronária, G1: Grupo1, G2:Grupo 2, HDL: lipoproteína de alta densidade.

Além disso, foi analisada a taxa de transferência do colesterol não esterificado, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos da nanoemulsão artificial para a HDL plasmática dos pacientes dos grupos 1 e 2, cujos resultados estão exibidos na tabela 5.

O grupo DM2 com DAC teve menor transferência de colesterol não esterificado e éster de colesterol para HDL do que o grupo sem DAC.

Tabela 5: Transferência de lípidos (%) da nanoemulsão para HDL de pacientes DM2 com e sem DAC.

Taxa de transferência	Grupos		
	DM2 G1 (n=76)	DM2+DAC G2 (n =79)	p
³ H-éster de colesterol (%)	1,3 ± 0,7	4,0 ± 0,6	0,005
¹⁴ C- fosfolípides (%)	15,5 ± 2,6	25,9 ± 2,1	0,35
³ H- triglicérides (%)	1,0 ± 0,7	4,9 ± 0,8	0,54
¹⁴ C- colesterol não esterificado (%)	1,2 ± 1,5	7,6 ± 1,2	0,006

Dados expressos pela média ± desvio padrão. DM2: Diabetes tipo 2, DAC: Doença Arterial Coronária, G1: Grupo1, G2:Grupo 2

Com relação à CETP, o grupo DM2 com DAC apresentou menor concentração plasmática dessa proteína do que o grupo DM2 sem DAC, como mostrado na tabela 6. A atividade da enzima LCAT foi semelhante nos dois grupos.

Tabela 6: Medida da concentração de CETP e atividade de LCAT nos grupos estudados.

Parâmetros	Grupos		p
	DM2 G1 (n=76)	DM2+ DAC G2 (n =79)	
CETP (mg/dL)	2,5 ± 1,1	2,1 ± 1,0	0,02
LCAT (470/390nm)	1,33 ± 0,10	1,34 ± 0,12	0,90

Dados expressos pela média ± desvio padrão. DM2: Diabetes tipo 2, DAC: Doença Arterial Coronária, G1: Grupo1, G2:Grupo 2, CETP: proteína de transferência de éster de colesterol. LCAT: Lecitina:colesterol acil transferase.

A tabela 7 mostra a massa de CETP dos grupos separados com relação ao uso ou não de insulina. Os dados de transferência lipídica destes grupos se encontram no anexo.

Tabela 7: Concentração de CETP nos pacientes DM2 com e sem DAC de acordo com o uso de insulina

Parâmetro	Grupos		p
	DM2		
CETP (mg/dL)	Sem insulina	Com insulina	0,02
	(n=48)	(n=17)	
	2,3 ± 0,9	3,0 ± 1,3	
	DM2+DAC		p
	Sem insulina	Com Insulina	0,71
	(n= 52)	(n= 23)	
	2,1 ± 1,0	2,0 ± 0,9	

Dados expressos pela média ± desvio padrão. DM2: Diabetes tipo 2, DAC: Doença Arterial Coronária, G1: Grupo1, G2:Grupo 2, CETP: proteína de transferência de éster de colesterol.

A tabela 8 mostra as correlações entre as transferências de lípidos e os parâmetros antropométricos e bioquímicos dos pacientes. A transferência de todos os lípidos se correlacionou positivamente com a concentração de HDL-C, porém essa correlação foi mais forte na transferência de colesterol não esterificado ($r= 0,63$).

A concentração de apo A1 também se correlacionou com as transferências dos quatro lípidos, enquanto a apo B se correlacionou somente com a transferência de colesterol não esterificado. A transferência de triglicérides e de fosfolípidos se correlacionou com a concentração de LDL-C.

Com relação à composição de lípidos da HDL, o colesterol não esterificado e o éster de colesterol tiveram correlação positiva individualmente

com todas as transferências. O conteúdo de TG da HDL se correlacionou somente com a transferência de éster de colesterol.

A massa de CETP se correlacionou positivamente com a transferência de éster de colesterol, ($r= 0,48$), e apresentou correlação mais fraca com as transferências de colesterol não esterificado e triglicérides.

A taxa de transferência de colesterol não esterificado se correlacionou positivamente com as transferências dos outros lípides: éster de colesterol, fosfolípides e triglicérides.

Tabela 8: Correlações entre as transferências de lípides e demais parâmetros dos pacientes

Parâmetros	Transferências			
	Éster de colesterol	Fosfolípides	Colesterol não-esterificado	Triglicérides
Idade	-0,129	0,057	0,009	-0,042
CA	0,022	-0,107	-0,075	-0,050
IMC	0,075	-0,038	-0,127	0,012
Colesterol total	0,252**	0,246**	0,001	0,194*
HDL-C	0,333**	0,269**	0,633**	0,383**
LDL-C	0,218*	0,220**	-0,005	0,182*
Triglicérides	0,103	-0,144	-0,229**	0,030
não HDL-C	0,212*	0,188*	-0,078	0,180*
Triglicéride/HDL	0,046	-0,059	-0,322**	-0,044
Glicemia	0,081	-0,098	-0,154	-0,108

continua

Tabela 9: Correlações entre as transferências de lípides e demais parâmetros dos pacientes (conclusão)

Parâmetros	Transferências			
	Éster de colesterol	Fosfolípides	Colesterol não-esterificado	Triglicérides
CNE	0,119	0,007	-0,255**	0,040
CT/CNE	0,128	0,253**	0,226**	0,154
Apo A1	0,584**	0,316**	0,697**	0,334**
Apo B	0,091	0,109	-0,219**	0,096
HbA1c	0,027	-0,054	-0,022	0,044
Tempo de DM2	-0,105	-0,126	-0,125	-0,056
Diâmetro da HDL	0,122	-0,099	0,055	-0,006
LCAT	-0,235**	-0,317**	-0,460**	-0,283**
CETP massa	0,522**	0,117	0,185*	0,183*
AGL	0,044	-0,158	0,490	-0,054
Transferência de EC	1	0,048	0,364**	0,224**
Transferência de FL	0,048	1	0,568**	0,576**
Transferência de CNE	0,364**	0,568**	1	0,561**
Transferência de TG	0,224**	0,576**	0,561**	1
Composição da HDL:				
CNE	0,121	0,057	0,321**	0,204*
TG	0,185*	-0,151	-0,134	-0,193*
FL	-0,035	-0,036	-0,161	-0,129
EC	-0,084	0,091	0,141	0,170

Valores expressos em r: coeficiente de correlação de Pearson. * p<0,05; **p<0,01. CA: Circunferência abdominal, IMC: índice de massa corpórea, HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade, LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade, Apo: apolipoproteína, HbA_{1c}: Hemoglobina glicosilada, DM2: diabetes mellitus tipo 2, LCAT: Lecitina colesterol acil transferase, CETP: proteína de transferência de éster de colesterol; AGL: ácidos graxos livres; EC:éster de colesterol, FL: fosfolípides, CNE: colesterol não esterificado, TG: triglicérides.

A tabela 9 mostra as correlações expressas pelo coeficiente de correlação de Pearson entre a atividade de LCAT, o diâmetro da HDL e a concentração de CETP com os demais parâmetros dos pacientes. A atividade de LCAT se correlacionou negativamente com o HDL-C, apo A1 e ácidos graxos livres. O diâmetro da HDL se correlacionou negativamente com a concentração de colesterol total e colesterol da fração não-HDL. A massa de CETP se correlacionou positivamente com a apo A1 e com a concentração de triglicérides e colesterol não esterificado da HDL.

Tabela 10: Correlações entre a atividade de LCAT, diâmetro da HDL, concentração de CETP e demais parâmetros dos pacientes

Parâmetros	Atividade de LCAT	Diâmetro da HDL	Massa de CETP
Idade	0,022	-0,038	-0,097
CA	0,102	0,086	-0,043
IMC	0,088	0,055	0,002
Colesterol total	-0,141	-0,237**	0,110
HDL-C	-0,313**	-0,056	0,168
LDL-C	-0,170	-0,162	0,059
Triglicérides	0,034	0,027	-0,012
não HDL-C	-0,120	-0,229**	0,050
TG/HDL	0,083	0,003	-0,020
Glicemia	0,100	0,054	0,018

continua

Tabela 11: Correlações entre a atividade de LCAT, diâmetro da HDL, concentração de CETP e demais parâmetros dos pacientes (conclusão)

Parâmetros	Atividade de LCAT	Diâmetro da HDL	Massa de CETP
CNE	-0,044	-0,150	0,058
CT/CNE	-0,059	-0,150	0,033
Apo A1	-,383**	0,053	0,305**
Apo B	-0,141	-0,183*	0,096
HbA1c	-0,037	-0,110	0,068
Tempo de DM2	0,146	0,029	0,024
Diâmetro da HDL	0,037	1	0,032
Massa de CETP	-0,149	0,032	1
AGL	0,265**	-0,001	-0,056
LCAT	1	0,037	-0,149
Composição da HDL:			
Colesterol não esterificado	-0,111	0,151	0,181*
Triglicérides	0,135	0,069	0,196*
Fosfolípidos	0,037	-0,003	-0,176
Ester de colesterol	-0,066	-0,073	0,049

Valores expressos em r: coeficiente de correlação de Pearson. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. LCAT: Lecitina colesterol acil transferase, CETP: proteína de transferência de éster de colesterol, CA: Circunferência abdominal, IMC: índice de massa corpórea, HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade, LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade, TG: triglicérides, Apo: apolipoproteína, AGL: ácidos graxos livres, HbA_{1c}: Hemoglobina glicosilada, DM2: diabetes mellitus tipo 2.

Os resultados da análise multivariada estão expostos na tabela 10. A transferência de éster de colesterol é influenciada pela presença de DAC, HDL-C, apo A1, LDL-C e massa de CETP (r^2 do modelo =0,53, $p<0,001$).

A transferência de fosfolípidos não é influenciada pela presença de DAC, porém é determinada por LDL-C, apo A1, sexo e idade (r^2 do modelo =0,40, $p<0,001$). A transferência de triglicérides também não foi dependente da presença de DAC, mas é influenciada pela concentração de apoA1 e atividade de LCAT (r^2 do modelo =0,17, $p<0,001$).

Já a transferência de colesterol não esterificado é influenciada pela presença de DAC, apo A1, apo B, LCAT, glicemia e sexo (r^2 do modelo = 0,70, $p<0,001$).

Tabela 12: Análise dos fatores determinantes para as transferências lipídicas por regressão linear múltipla

Transferências	Variáveis independentes	β	p
Éster de colesterol	DAC	-0,211	0,031
	HDL-C	-0,02	0,009
	LDL-C	0,003	0,024
	Apo A1	0,017	<0,001
	CETP massa	0,241	<0,001
Fosfolípidos	DAC	-0,042	0,796
	LDL-C	0,009	<0,001
	Apo A1	0,022	<0,001
	Sexo	-0,403	0,023
	Idade	-0,026	0,003
Triglicérides	DAC	-0,139	0,273
	Apo A1	0,009	0,001
	LCAT	-1,2	0,05
Colesterol não esterificado	DAC	-0,416	0,003
	Apo A1	0,037	<0,001
	Apo B	-0,017	<0,001
	LCAT	-3,184	<0,001
	Glicemia	-0,005	0,003
	Sexo	-0,365	0,021

β : coeficiente de regressão múltipla, DAC: Doença arterial coronária, HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade, LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade, apoA1 e B: apolipoproteína A1 e B, CETP: proteína de transferencia de éster de colesterol, LCAT: Lecitina colesterol acil-transferase.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo observamos que o grupo de pacientes com DM2 e com DAC apresentou maior concentração de LDL-C, não HDL-C e apo B que o grupo DM2. Já a concentração de TG e de HDL-C não foi diferente. Dados da literatura comparando o perfil lipídico de pacientes com DM2 com e sem DAC são escassos. Nesse aspecto, similar aos nossos resultados, Seviour et al. (61) relataram que a concentração de LDL-C e apo B foram maiores nos pacientes DM2 com DAC do que sem DAC, sem diferenças nos valores de HDL-C ou triglicérides. No estudo de Kahri et al. (50), todos os três parâmetros lipídicos, LDL-C, HDL-C e triglicérides foram iguais em DM2 com e sem DAC. Portanto, esses dois estudos prévios e o nosso convergem que os traços da dislipidemia clássica do diabetes, baixo HDL-C e alto triglicérides, não foram fatores diferenciadores entre os pacientes DM2 com e sem DAC. Da mesma maneira, a concentração de ácidos graxos livres, que é elevado em DM2 resultando da mobilização de ácidos graxos na deficiência a insulina, não foi diferente entre os grupos e não foi abordado na literatura como um fator de risco para DAC.

Foi observado em uma metanálise que a metformina é capaz de baixar os níveis de CT e LDL-C, além de triglicérides (62). No nosso estudo, o grupo DM2 com DAC, apesar de fazer maior uso de metformina, apresentou maior concentração de colesterol total e LDL-C que os diabéticos sem DAC. Em outro trabalho foi visto também que, quando em associação com sulfoniuréias, a metformina pode baixar a concentração de HDL-C, sem apresentar influência sobre a concentração de TG ou de LDL-C (63).

Dobiasova et al. observou que o log TG/HDL-C é forte preditor de DAC (64). Outros trabalhos também mostram a razão TG/HDL-C como importante preditor de DAC (65, 66) e sua relação com o aumento da mortalidade e

severidade da doença (67). No presente trabalho, a razão TG/HDL-C se correlacionou positivamente com outros fatores de risco para DAC, como IMC e concentração de apo B e colesterol total. A razão TG/HDL-C também se correlacionou positivamente com a concentração de colesterol não esterificado no plasma e negativamente com a transferência de colesterol não esterificado para a HDL e sua concentração na partícula HDL. Entretanto, não houve diferença na razão TG/HDL-C entre os grupos com e sem DAC. Essa medida está relacionada a resistência a insulina e é, portanto, mais alta em pacientes com DM2. (68).

Com relação à transferência de lípidos para HDL, o grupo DM2+DAC apresentou menor taxa de transferência de colesterol não esterificado e éster de colesterol para HDL. Maranhão et al. (69) também observaram que pacientes com DAC precoce apresentam menor transferência de colesterol não esterificado para HDL, porém maior transferência de éster de colesterol. Nesse estudo, todos os tradicionais lípidos de fatores de risco como LDL-C, HDL-C e TG foram semelhantes entre os pacientes com e sem DAC. Em um estudo com idosos com DAC a transferência de colesterol não esterificado também foi menor do que em idosos saudáveis (70). Em um estudo com diabetes mellitus tipo 2, a transferência de éster de colesterol e triglicérides estava aumentada enquanto a de colesterol não esterificado não foi alterada, porém no estudo a comparação foi feita com indivíduos saudáveis (71).

Apesar da diferença na concentração de colesterol não esterificado no plasma, não encontramos essa diferença na composição da HDL dos pacientes. Syvanne et al. relataram que as HDL2 e HDL3 de pacientes com DAC estão depletadas de colesterol não esterificado (72). Um estudo que

comparou idosos saudáveis, com a mesma média de idade do nosso estudo, com indivíduos jovens relatou que a HDL dos idosos contém menos colesterol não esterificado (73). Já Frohlich e Dobiasova observaram, em concordância com nossos resultados, que mulheres com DAC tem maior concentração de colesterol não esterificado no plasma, sem diferença na concentração de desse lípide na fração HDL (74). Além disso, no estudo de correlação encontramos que a concentração de colesterol não esterificado no plasma se correlaciona negativamente com a transferência de colesterol não esterificado e concentração desse lípide na composição da fração HDL. Esse resultado sugere que devido a menor entrada de colesterol não esterificado na HDL, onde ele é esterificado, mais resta na fração não-HDL.

Com relação a transferência de éster de colesterol, foi observado que a transferência estava aumentada em pacientes com DAC quando comparados com controles (55), e também em diabéticos comparados com controles (75) (76). Todavia, o método difere deste usado no nosso estudo: a avaliação da transferência foi feita da HDL para as lipoproteínas ricas em apo B. Elchebly et al. relataram que a transferência de éster de colesterol estava diminuída em DM2, quando comparados com controles, sem alteração na atividade de CETP (49). Esse resultado foi tanto na transferência para HDL como naquela para as lipoproteínas ricas em apo B. Porém, esses estudos não foram feitos em diabéticos com e sem DAC.

A menor transferência de éster de colesterol encontrada nesse estudo nos pacientes DM2 com DAC pode ser explicada pela CETP, proteína responsável pelas transferências de éster de colesterol, que teve menor concentração nesse grupo. Os resultados da análise multivariada confirmam a

influência da CETP na transferência de éster de colesterol para HDL. Ainda não está bem estabelecido na literatura se a concentração de CETP está aumentada, inalterada ou diminuída na DAC (45, 54, 55, 77), porém não foi comparada em pacientes diabéticos com e sem DAC. Neste contexto, poderia ser sugerido que a alta concentração de CETP, concomitantemente com a alta transferência de éster de colesterol para HDL é protetora contra DAC em pacientes DM2.

As transferências de triglicérides e fosfolípidos não estavam alteradas nos DM2+DAC comparados com os DM2. Com relação aos triglicérides, como a concentração de CETP foi menor no grupo com DAC, seria esperado que a entrada de triglicérides também estivesse diminuída, já que as transferências de TG também são mediadas pela CETP e, como esperado, no nosso estudo de correlação, menor concentração de CETP corresponde a menor transferência de TG para HDL.

A CETP também se correlacionou positivamente com o conteúdo de TG na composição da HDL. Isso era esperado pois o resultado da ação da CETP é o enriquecimento da fração HDL com TG.

Alguns estudos mostram que atividade e massa de CETP aumentam com insulino terapia ou análogo de insulina (78, 79). Já Siebel et al. relataram que a inibição de CETP leva a um aumento da insulina (22, 80). Outro estudo sugere que a CETP pode modular o metabolismo da glicose (81). Apesar de não termos visto diferença na transferência de lípidos para HDL entre quem usa ou não insulina, os grupos apresentaram diferença com relação à massa de CETP quando separados pelo uso de insulina. Mas apenas o grupo sem DAC teve maior massa de CETP quando em uso de insulina. É interessante

ressaltar que um dos novos medicamentos que estão sendo testados no tratamento de aterosclerose, o dalcetrapib, em estudos clínicos de fase IIb, foi capaz de aumentar a massa de CETP e a concentração de colesterol não esterificado na HDL (82).

Santos et al. relataram que pacientes com DAC tiveram maior taxa de esterificação do que aqueles sem DAC (83). Dobiasova et al. observaram que a fração da taxa de esterificação no plasma é alto preditor de DAC. Nesse estudo, verificamos que a atividade da enzima responsável pela esterificação do colesterol, a LCAT, foi semelhante nos dois grupos. Apesar disso, na análise multivariada ela foi a maior determinante na transferência de colesterol não esterificado, diminuindo-a.

A LCAT é a enzima que gera quase todo o éster de colesterol no plasma e é ativada pela apoA1 na HDL. No diabetes a presença de produtos avançados de glicação afeta as apolipoproteínas, incluindo a apoA1. A glicação da apoA1 pode aumentar a transferência de éster de colesterol da HDL para lipoproteínas que contém apo B (84). A apoA1 glicada também afeta propriedades funcionais da HDL como a habilidade de ativar a LCAT, diminuindo a atividade da LCAT na esterificação do colesterol (84, 85).

Apesar de um estudo observar alta atividade de LCAT no DM (86), foi relatado que pacientes com DM2 apresentam baixa atividade de LCAT quando comparados com controles (87), e que a atividade de LCAT está negativamente associada com os níveis de HbA1c (88), porém essa correlação não apareceu no nosso estudo. A atividade de LCAT é controversa na aterosclerose (12, 89, 90) e não foi antes estudada em pacientes diabéticos com e sem DAC. Nos grupos aqui estudados, supomos que não haja diferença

significante na glicação das apolipoproteínas e lipoproteínas plasmáticas entre os grupos, devido aos níveis semelhantes de HbA_{1c} dos pacientes.

Outra correlação encontrada foi a de ácidos graxos livres com LCAT e conteúdo de TG na partícula HDL. A atividade de LCAT enriquece a HDL de éster de colesterol, que é trocado via CETP por triglicérides com outras lipoproteínas. A HDL rica em triglicérides sofre maior ação da lipase hepática e, portanto, ocorre maior liberação de ácidos graxos no plasma.

A composição das lipoproteínas doadoras e receptoras é fundamental no processo de transferência. A composição lipídica da fração HDL não foi diferente nesse estudo entre os grupos DM2 com e sem DAC, o que foi de certa forma inesperado em vista da menor transferência de colesterol não esterificado e éster de colesterol para HDL. Porém, as VLDL e LDL dos pacientes com DAC podem estar com composição diferentes daquelas dos pacientes sem DAC. Além disso, como o processo de transferência é bidirecional, não podemos afirmar que ocorreu um enriquecimento ou empobrecimento da HDL com relação a determinado lipídeo pois não foi dosado o que é transferido da HDL para as outras lipoproteínas. Portanto, o fato de a transferência de éster de colesterol e colesterol não esterificado ter sido menor no grupo DM2+DAC não implica necessariamente na redução desses lipídeos na composição da HDL.

Morton et al. relatou que a concentração de colesterol não esterificado das lipoproteínas doadoras modula a transferência de éster de colesterol para HDL (91). Como o pool de colesterol não esterificado no plasma está aumentado nos DM2 com DAC, é possível que a nanoemulsão doadora se

torne enriquecida com colesterol não esterificado no plasma desses pacientes, o que contribuiria para os nossos resultados dos DM2+DAC versus DM2.

É importante ressaltar que para o processo de transferência de lípidos não somente a composição mas também a concentração das lipoproteínas doadoras e receptoras é fundamental (38, 39). Neste estudo, a concentração de HDL-C e apoA1 foi semelhante nos dois grupos, portanto as menores taxas de transferência de colesterol não esterificado e éster de colesterol não estão relacionadas a menor concentração da lipoproteína receptora, mas sim a um distúrbio no processo de transferência para HDL.

Com relação ao tamanho da partícula HDL, foi relatado que HDL de menor tamanho está associada a alto risco cardiovascular (92, 93). Foi visto também que em pacientes diabéticos havia uma maior prevalência de HDL menores, devido a maior ação da lipase hepática nesses pacientes (1, 29). No presente estudo não houve diferença no diâmetro da HDL entre os grupos, todavia a frequência de subpopulações de HDL menores ou maiores pode variar dentro dos nossos grupos de estudo.

Nossos resultados com a análise multivariada mostram que a associação entre DAC e as transferências de colesterol (esterificado e não esterificado) existem mesmo após ajustar para potenciais confundidores.

Esse estudo comparando pacientes DM2+DAC com pacientes DM2 mostrou novas características associadas a presença de DAC no diabetes. Entre elas, a menor transferência de colesterol não esterificado, corroborado pelo maior conteúdo deste no plasma, que pode estar relacionado a um distúrbio no metabolismo intravascular do colesterol não esterificado. A concentração de CETP diminuída nos DM2+DAC é também um novo achado

que provavelmente causou a redução da transferência de éster de colesterol para HDL nestes pacientes. Como atualmente estão sendo desenvolvidos e testados inibidores de CETP para tratamento de DAC e novos alvos terapêuticos têm sido procurados, esses resultados podem ser de grande importância para o entendimento de ações farmacológicas.

6. IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

O resultado desse estudo encontrou importantes informações sobre a função da HDL. O conhecimento sobre essa função abre perspectivas importantes sobre a gênese da aterosclerose. Ainda que o conhecimento dessa propriedade, aliado aos já bem conhecidos fatores de risco para a doença arterial coronária, indica que avaliar os níveis de HDL-colesterol não são suficientes por si só para entender a funcionalidade dessa partícula. Nesse cenário, o nosso estudo mostra um método prático de avaliação de função da HDL e a possibilidade futura de um novo marcador para DAC, contribuindo assim para estabelecer mais uma ferramenta na prevenção secundária da condição.

7. CONCLUSÕES

Na amostra estudada, pacientes diabéticos portadores de doença arterial coronária obstrutiva apresentam menor transferência de colesterol (esterificado e não esterificado) para HDL e menor concentração de CETP quando comparados com os pacientes diabéticos sem DAC obstrutiva.

ANEXO: Transferências lipídicas nos grupos DM2 e DM2+DAC separados pelo uso de insulina

Taxa de transferência	Grupo DM2		
	Sem insulina (n=48)	Com insulina (n=17)	p
³ H-éster de colesterol (%)	4,25 ± 0,72	4,48 ± 0,81	0,26
¹⁴ C- fosfolípides (%)	25,85 ± 2,42	25,18 ± 2,85	0,33
³ H- triglicérides (%)	5,01 ± 0,66	5,11 ± 0,75	0,61
¹⁴ C- colesterol não esterificado (%)	8,28 ± 1,38	8,11 ± 1,62	0,65

Dados expressos pela média ± desvio padrão. DM2: Diabetes tipo 2.

Taxa de transferência	Grupo DM2+DAC		
	Sem insulina (n=52)	Com insulina (n=23)	p
³ H-éster de colesterol (%)	4,02 ± 0,64	3,93 ± 0,65	0,56
¹⁴ C- fosfolípides (%)	25,86 ± 2,25	25,95 ± 1,84	0,85
³ H- triglicérides (%)	4,85 ± 0,83	5,01 ± 0,88	0,46
¹⁴ C- colesterol não esterificado (%)	7,45 ± 1,17	7,83 ± 1,33	0,21

Dados expressos pela média ± desvio padrão. DM2: Diabetes tipo 2, DAC:doença arterial coronária.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Farbstein D, Levy AP. HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2012;10(3):353-61.
2. Pasterkamp G. Methods of accelerated atherosclerosis in diabetic patients. *Heart*. 2013;99(10):743-9.
3. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2011;94(3):311-21.
4. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011;378(9786):169-81.
5. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 1998;339(4):229-34.
6. Granger CB, Califf RM, Young S, Candela R, Samaha J, Worley S, et al. Outcome of patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction treated with thrombolytic agents. The Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group. *Journal of the American College of Cardiology*. 1993;21(4):920-5.
7. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002;287(19):2570-81.
8. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes care*. 1993;16(2):434-44.

9. Wong ND, Nelson JC, Granston T, Bertoni AG, Blumenthal RS, Carr JJ, et al. Metabolic syndrome, diabetes, and incidence and progression of coronary calcium: the Multiethnic Study of Atherosclerosis study. *JACC Cardiovascular imaging*. 2012;5(4):358-66.
10. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *Journal of lipid research*. 1984;25(10):1017-58.
11. Czarnecka H, Yokoyama S. Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(4):2023-8.
12. Savel J, Lafitte M, Pucheu Y, Pradeau V, Tabarin A, Couffignal T. Very low levels of HDL cholesterol and atherosclerosis, a variable relationship--a review of LCAT deficiency. *Vascular health and risk management*. 2012;8:357-61.
13. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *Journal of lipid research*. 1993;34(8):1255-74.
14. Nishida HI, Nishida T. Phospholipid transfer protein mediates transfer of not only phosphatidylcholine but also cholesterol from phosphatidylcholine-cholesterol vesicles to high density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(11):6959-64.
15. Leanca CC, Passarelli M, Nakandakare ER, Quintao EC. [HDL: the yin-yang of cardiovascular disease]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2010;54(9):777-84.
16. Fisher EA, Feig JE, Hewing B, Hazen SL, Smith JD. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(12):2813-20.

17. de la Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Asztalos BF, Cuchel M, Rader DJ, Rothblat GH. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(4):796-801.
18. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(10):1881-8.
19. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation research*. 2006;98(11):1352-64.
20. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacological reviews*. 2006;58(3):342-74.
21. Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, Natoli AK, Henstridge DC, Penfold SA, et al. High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2009;119(15):2103-11.
22. Siebel AL, Natoli AK, Yap FY, Carey AL, Reddy-Luthmoodoo M, Sviridov D, et al. Effects of high-density lipoprotein elevation with cholesteryl ester transfer protein inhibition on insulin secretion. *Circulation research*. 2013;113(2):167-75.
23. Fryirs MA, Barter PJ, Appavoo M, Tuch BE, Tabet F, Heather AK, et al. Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(8):1642-8.
24. Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R, Future Forum Editorial B. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis*. 2003;168(2):195-211.

25. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *European journal of clinical investigation*. 2003;33(12):1051-69.
26. Verges B. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2009;23(6):681-5.
27. Siegel RD, Cupples A, Schaefer EJ, Wilson PW. Lipoproteins, apolipoproteins, and low-density lipoprotein size among diabetics in the Framingham offspring study. *Metabolism: clinical and experimental*. 1996;45(10):1267-72.
28. Arca M, Pigna G, Favoccia C. Mechanisms of diabetic dyslipidemia: relevance for atherogenesis. *Current vascular pharmacology*. 2012;10(6):684-6.
29. Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2006;35(3):491-510, vii-viii.
30. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(7):1225-36.
31. Grundy SM. Atherogenic dyslipidemia: lipoprotein abnormalities and implications for therapy. *The American journal of cardiology*. 1995;75(6):45B-52B.
32. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *Bmj*. 1998;317(7160):703-13.

33. Gordon SM, Davidson WS, Urbina EM, Dolan LM, Heink A, Zang H, et al. The effects of type 2 diabetes on lipoprotein composition and arterial stiffness in male youth. *Diabetes*. 2013;62(8):2958-67.
34. Taskinen MR. Pathogenesis of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2001;109 Suppl 2:S180-8.
35. Duell PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosylation of HDL and impaired HDL-receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes*. 1991;40(3):377-84.
36. Bagdade JD, Buchanan WE, Kuusi T, Taskinen MR. Persistent abnormalities in lipoprotein composition in noninsulin-dependent diabetes after intensive insulin therapy. *Arteriosclerosis*. 1990;10(2):232-9.
37. Lo Prete AC, Dina CH, Azevedo CH, Puk CG, Lopes NH, Hueb WA, et al. In vitro simultaneous transfer of lipids to HDL in coronary artery disease and in statin treatment. *Lipids*. 2009;44(10):917-24.
38. Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1999;286(1-2):145-61.
39. Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clinical biochemistry*. 2003;36(6):421-9.
40. van Tol A. Phospholipid transfer protein. *Current opinion in lipidology*. 2002;13(2):135-9.

41. Dullaart RP, Vergeer M, de Vries R, Kappelle PJ, Dallinga-Thie GM. Type 2 diabetes mellitus interacts with obesity and common variations in PLTP to affect plasma phospholipid transfer protein activity. *Journal of internal medicine*. 2012;271(5):490-8.
42. Yazdanyar A, Yeang C, Jiang XC. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Current atherosclerosis reports*. 2011;13(3):242-8.
43. Schlitt A, Bickel C, Thumma P, Blankenberg S, Rupprecht HJ, Meyer J, et al. High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(10):1857-62.
44. Yatsuya H, Tamakoshi K, Hattori H, Otsuka R, Wada K, Zhang H, et al. Serum phospholipid transfer protein mass as a possible protective factor for coronary heart diseases. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2004;68(1):11-6.
45. Robins SJ, Lyass A, Brocchia RW, Massaro JM, Vasan RS. Plasma lipid transfer proteins and cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis*. 2013;228(1):230-6.
46. Chen X, Sun A, Mansoor A, Zou Y, Ge J, Lazar JM, et al. Plasma PLTP activity is inversely associated with HDL-C levels. *Nutrition & metabolism*. 2009;6:49.
47. Schgoer W, Mueller T, Jauhiainen M, Wehinger A, Gander R, Tancevski I, et al. Low phospholipid transfer protein (PLTP) is a risk factor for peripheral atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):219-26.

48. Le Goff W, Guerin M, Chapman MJ. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia. *Pharmacology & therapeutics*. 2004;101(1):17-38.
49. Elchebly M, Porokhov B, Pulcini T, Berthezene F, Ponsin G. Alterations in composition and concentration of lipoproteins and elevated cholesteryl ester transfer in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Atherosclerosis*. 1996;123(1-2):93-101.
50. Kahri J, Syvanne M, Taskinen MR. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity in non-insulin-dependent diabetic patients with and without coronary artery disease. *Metabolism: clinical and experimental*. 1994;43(12):1498-502.
51. Inukai Y, Ito K, Hara K, Yamazaki A, Takebayashi K, Aso Y, et al. Serum cholesteryl ester transfer protein concentrations are associated with serum levels of total cholesterol, beta-lipoprotein and apoproteins in patients with type 2 diabetes mellitus. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2007;16(5):367-72.
52. Triolo M, Kwakernaak AJ, Perton FG, de Vries R, Dallinga-Thie GM, Dullaart RP. Low normal thyroid function enhances plasma cholesteryl ester transfer in Type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2013;228(2):466-71.
53. Ritsch A, Scharnagl H, Eller P, Tancevski I, Duwensee K, Demetz E, et al. Cholesteryl ester transfer protein and mortality in patients undergoing coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Circulation*. 2010;121(3):366-74.
54. Vasan RS, Pencina MJ, Robins SJ, Zachariah JP, Kaur G, D'Agostino RB, et al. Association of circulating cholesteryl ester transfer protein activity with incidence of cardiovascular disease in the community. *Circulation*. 2009;120(24):2414-20.

55. Kappelle PJ, Perton F, Hillege HL, Dallinga-Thie GM, Dullaart RP. High plasma cholesteryl ester transfer but not CETP mass predicts incident cardiovascular disease: a nested case-control study. *Atherosclerosis*. 2011;217(1):249-52.
56. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *The New England journal of medicine*. 2007;357(21):2109-22.
57. Barter PJ, Rye KA. Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. *Journal of lipid research*. 2012;53(9):1755-66.
58. Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(14):8216-27.
59. Maranhao RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*. 1993;28(8):691-6.
60. Lima ES, Maranhao RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem*. 2004;50(6):1086-8.
61. Seviour PW, Teal TK, Richmond W, Elkeles RS. Serum lipids, lipoproteins and macrovascular disease in non-insulin-dependent diabetics: a possible new approach to prevention. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1988;5(2):166-71.
62. Wulffele MG, Kooy A, de Zeeuw D, Stehouwer CD, Gansevoort RT. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Journal of internal medicine*. 2004;256(1):1-14.

63. Zhang F, Xiang H, Fan Y, Ganchuluun TA, Kong W, Ouyang Q, et al. The effects of sulfonylureas plus metformin on lipids, blood pressure, and adverse events in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Endocrine*. 2013.
64. Dobiasova M. [AIP--atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice]. *Vnitřní lékařství*. 2006;52(1):64-71.
65. Luz PLd, Favarato D, Faria-Neto Junior JR, Lemos P, Chagas ACP. High ratio of triglycerides to hdl-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics*. 2008;63(4).
66. Hadaegh F, Khalili D, Ghasemi A, Tohidi M, Sheikholeslami F, Azizi F. Triglyceride/HDL-cholesterol ratio is an independent predictor for coronary heart disease in a population of Iranian men. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2009;19(6):401-8.
67. Murguia-Romero M, Jimenez-Flores JR, Sigris-Flores SC, Espinoza-Camacho MA, Jimenez-Morales M, Pina E, et al. Plasma triglyceride/HDL-cholesterol ratio, insulin resistance, and cardiometabolic risk in young adults. *Journal of lipid research*. 2013;54(10):2795-9.
68. Kannel WB, Vasan RS, Keyes MJ, Sullivan LM, Robins SJ. Usefulness of the triglyceride-high-density lipoprotein versus the cholesterol-high-density lipoprotein ratio for predicting insulin resistance and cardiometabolic risk (from the Framingham Offspring Cohort). *The American journal of cardiology*. 2008;101(4):497-501.
69. Maranhao RC, Freitas FR, Strunz CM, Santos RD, Mansur AJ, Mansur AP. Lipid transfers to HDL are predictors of precocious clinical coronary heart disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012;413(3-4):502-5.

70. Azevedo CH, Wajngarten M, Prete AC, Diament J, Maranhao RC. Simultaneous transfer of cholesterol, triglycerides, and phospholipids to high-density lipoprotein in aging subjects with or without coronary artery disease. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(9):1543-8.
71. Oliveira CP, Maranhao RC, Bertato MP, Wajchenberg BL, Lerario AC. 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*. 2012;11:65.
72. Syvanne M, Ahola M, Lahdenpera S, Kahri J, Kuusi T, Virtanen KS, et al. High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *Journal of lipid research*. 1995;36(3):573-82.
73. Holzer M, Trieb M, Konya V, Wadsack C, Heinemann A, Marsche G. Aging affects high-density lipoprotein composition and function. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1831(9):1442-8.
74. Frohlich J, Dobiasova M. Fractional esterification rate of cholesterol and ratio of triglycerides to HDL-cholesterol are powerful predictors of positive findings on coronary angiography. *Clin Chem*. 2003;49(11):1873-80.
75. Riemens S, van Tol A, Sluiter W, Dullaart R. Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM: relationships with apolipoprotein B-containing lipoproteins and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis*. 1998;140(1):71-9.
76. Bagdade JD, Lane JT, Subbaiah PV, Otto ME, Ritter MC. Accelerated cholesteryl ester transfer in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1993;104(1-2):69-77.

77. Duwensee K, Breitling LP, Tancevski I, Rothenbacher D, Demetz E, Patsch JR, et al. Cholesteryl ester transfer protein in patients with coronary heart disease. *European journal of clinical investigation*. 2010;40(7):616-22.
78. Aslan I, Kucuksayan E, Aslan M. Effect of insulin analog initiation therapy on LDL/HDL subfraction profile and HDL associated enzymes in type 2 diabetic patients. *Lipids in health and disease*. 2013;12:54.
79. Ai M, Tanaka A, Baba T, Yui K, Numano F. Increased cholesteryl ester transfer protein and changes in lipid metabolism from initiating insulin therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;947:356-61.
80. Fazio S, Linton MF. Killing two birds with one stone, maybe: CETP inhibition increases both high-density lipoprotein levels and insulin secretion. *Circulation research*. 2013;113(2):94-6.
81. Ju X, Cui Q, Zhang M, Wang W, Jiang J, Chang Y, et al. Human cholesteryl ester transfer protein enhances insulin-mediated glucose uptake in adipocytes. *Life sciences*. 2011;89(13-14):479-84.
82. Ballantyne CM, Miller M, Niesor EJ, Burgess T, Kallend D, Stein EA. Effect of dalcetrapib plus pravastatin on lipoprotein metabolism and high-density lipoprotein composition and function in dyslipidemic patients: results of a phase IIb dose-ranging study. *American heart journal*. 2012;163(3):515-21, 21 e1-3.
83. Santos RD, Hueb W, Oliveira AA, Ramires JA, Maranhao RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or without coronary artery disease. *Journal of lipid research*. 2003;44(3):464-9.
84. Passarelli M, Catanozi S, Nakandakare ER, Rocha JC, Morton RE, Shimabukuro AF, et al. Plasma lipoproteins from patients with poorly controlled diabetes mellitus and "in vitro" glycation of lipoproteins enhance the transfer

rate of cholesteryl ester from HDL to apo-B-containing lipoproteins. *Diabetologia*. 1997;40(9):1085-93.

85. Nobecourt E, Davies MJ, Brown BE, Curtiss LK, Bonnet DJ, Charlton F, et al. The impact of glycation on apolipoprotein A-I structure and its ability to activate lecithin:cholesterol acyltransferase. *Diabetologia*. 2007;50(3):643-53.

86. Kappelle PJ, de Boer JF, Perton FG, Annema W, de Vries R, Dullaart RP, et al. Increased LCAT activity and hyperglycaemia decrease the antioxidative functionality of HDL. *European journal of clinical investigation*. 2012;42(5):487-95.

87. Nakhjavani M, Morteza A, Karimi R, Banihashmi Z, Esteghamati A. Diabetes induces gender gap on LCAT levels and activity. *Life sciences*. 2013;92(1):51-4.

88. Nakhjavani M, Esteghamati A, Esfahanian F, Ghanei A, Rashidi A, Hashemi S. HbA1c negatively correlates with LCAT activity in type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2008;81(1):38-41.

89. Ng DS. The role of lecithin:cholesterol acyltransferase in the modulation of cardiometabolic risks - a clinical update and emerging insights from animal models. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1821(4):654-9.

90. Rousset X, Shamburek R, Vaisman B, Amar M, Remaley AT. Lecithin cholesterol acyltransferase: an anti- or pro-atherogenic factor? *Current atherosclerosis reports*. 2011;13(3):249-56.

91. Morton RE. Free cholesterol is a potent regulator of lipid transfer protein function. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(25):12235-41.

92. Arsenault BJ, Lemieux I, Despres JP, Gagnon P, Wareham NJ, Stroes ES, et al. HDL particle size and the risk of coronary heart disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Atherosclerosis*. 2009;206(1):276-81.

93. Dobiasova M, Frohlich J, Sedova M, Cheung MC, Brown BG. Cholesterol esterification and atherogenic index of plasma correlate with lipoprotein size and findings on coronary angiography. *Journal of lipid research*. 2011;52(3):566-71.