

TALITA DE MATTOS SEYDELL

**Transferência “in vitro” de uma nanoemulsão artificial para a fração
HDL de pacientes com diabetes mellitus tipo 2**

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

São Paulo
2007

TALITA DE MATTOS SEYDELL

**Transferência “in vitro” de uma nanoemulsão artificial para a fração
HDL de pacientes com diabetes mellitus tipo 2**

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

Área de concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

São Paulo
2007

“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutro lugar o que ela não nos pode dar”.

Sigmund Freud

À minha mãe Ana Maria (Saudades) e à
minha filha Leila, minhas razões de viver...

Ao meu pai José Augusto Seydell, pelo exemplo do bom caráter, da dignidade, por me fazer a pessoa que hoje sou e pela força para que eu realizasse este grande sonho.

Ao meu irmão Tiago Seydell, minha referência de admiração, pela força em nossos difíceis momentos e por orgulhar-se de mim.

Ao Marcelo Stolf, meu grande
companheiro neste doutorado, pelo
incentivo, pela força, por acreditar na
minha capacidade, pelo infinito amor à
Leila e pelo exemplo que é como pai.

Ao meu avô José Augusto de Mattos,
pelo exemplo de vida, pela
perseverança, por me ter como filha
demonstrando seu infinito amor por
mim.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Raul Cavalcante Maranhão, pela grande e mais importante oportunidade profissional da minha vida. Pelos tantos momentos de grande compreensão quando eu mais precisei, por tanto querer me localizar e pela grande amizade, a qual quero levar para sempre. A minha eterna gratidão!

À professora Dra. Carmen Vinagre, por ter me trazido ao Laboratório de Lípidos, confiando no meu trabalho e pelas palavras de apoio nos difíceis momentos no decorrer destes anos.

Às minhas amigas Ana Cristina Lo Prete e Carolina Azevedo pela grande amizade, pela força, pelo apoio e pela grande ajuda para que este estudo se concretizasse. Vocês foram imprescindíveis na etapa final deste trabalho!!!!

À minha companheira dos “desabafos” Fernanda Maniero, por estar sempre me dando forças, pelos conselhos, pela experiência de vida compartilhada, por acreditar na minha capacidade e por estar sempre pronta em ajudar.

À minha amiga Vanessa Monteiro, amiga do início ao fim de todos estes anos, pelo apoio, ajuda, pelo incentivo e pela maravilhosa amizade.

À minha amiga “revelação”, Amanda Padoveze, por tantos conselhos, incentivo, por tanto fazer questão em me animar e pela amizade compartilhada estes anos.

Às amigas que me acompanharam nestes anos de estudo: Aleksandra Tiemi, Tatiane Vanessa Oliveira, Carolina Piras, Ana Carolina Gagliardi, Iara Kretzer, Cristina Pio, Tatiana Solano, Fabíola Filipini por toda a companhia, pela sincera amizade e por todo auxílio e força.

À Sheila Loyolla, pela enorme competência e profissionalismo, pela sincera amizade e por ter decorado todos os meus telefones tentando me localizar. Espero que me localize sempre!

A todas as funcionárias e alunas do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, em especial, Débora Deus e Maria da Conceição Latrilha pelas palavras de apoio e pela contribuição direta ou indireta no decorrer destes anos.

Aos meus queridos João Simões, Diva Stolf e Cristina Stolf, pelas portas sempre abertas, por me acolherem como filha e pelo grande amor à Leila.

À Sandra Hitomi Yamafuku, pelo brilhante profissionalismo, por ter me acompanhado estes anos e por acreditar na minha capacidade.

A todos os participantes deste estudo, pois sem eles nada disso seria possível.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
RESUMO.....	III
SUMMARY.....	IV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Metabolismo lipídico.....	1
1.2. HDL e Transporte Reverso do Colesterol.....	6
1.3. Nanoemulsão artificial.....	9
1.4. Justificativa.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Casuística.....	14
3.2. Material e Métodos.....	15
3.2.1. Determinações bioquímicas.....	15
3.2.2. Tamanho da HDL.....	16
3.2.3. Preparo da nanoemulsão.....	16
3.2.4. Ensaio da transferência dos lípides da nanoemulsão para a HDL.....	18
3.3. Análise estatística.....	19
4. RESULTADOS.....	21
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÕES.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA-1	“ATP-binding cassette transporters A1”
ADA	Associação Brasileira de Diabetes
Apo	apolipoproteína
CETP	proteína de transferência do éster de colesterol
DAC	doença arterial coronariana
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
HbA1C	Hemoglobina Glicada
HDL	lipoproteína de alta densidade
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
IMC	Índice de Massa Corporal
LCAT	lecitina-colesterol-acil transferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LH	lipase hepática
LLP	lipase lipoprotéica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial
PLTP	proteína de transferência de fosfolípidos
SR-B1	“scavenger receptor B1”
TRC	Tranporte Reverso do Colesterol
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Concentração plasmática dos lípidos, das apolipoproteínas e da glicose dos pacientes diabéticos e do grupo controle.....23
- Tabela 2: Transferências dos lípidos da LDE para HDL e tamanho da partícula HDL dos pacientes diabéticos e não-diabéticos.....24
- Tabela 3: Correlação entre as transferências de lípidos da LDE para HDL dos pacientes diabéticos.....24
- Tabela 4: Correlação entre as transferências de lípidos da LDE para HDL e as concentrações plasmáticas dos lípidos, das apolipoproteínas e da glicose.....25

RESUMO

SEYDELL, TM. Transferência “in vitro” de uma nanoemulsão artificial para a fração HDL de pacientes com diabetes mellitus tipo 2. São Paulo, 2007. 48p.
Tese - Doutorado. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo.

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo. A alta concentração plasmática de triglicérides e a baixa concentração do HDL-C são as principais alterações lipídicas no DM2. A hipertrigliceridemia, além de outros fatores, pode alterar a composição das lipoproteínas, ocasionando alterações funcionais das partículas. O efeito antiaterogênico da HDL se dá, sobretudo, devido à sua ação de promover o Transporte Reverso do Colesterol, sendo a troca lipídica entre as lipoproteínas uma das etapas desse processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o tamanho da partícula de HDL e sua capacidade em receber seus lípidos constituintes de outras lipoproteínas. O método é baseado na troca lipídica ocorrida entre uma nanoemulsão artificial (LDE) marcada radioativamente com ^{14}C -CL e ^3H -TG ou ^{14}C -FL e ^3H -CE que se assemelha à estrutura lipídica da LDL, usada como doador de lípidos. Neste trabalho foram estudados 45 pacientes diabéticos (53 ± 7 anos) e 45 indivíduos sem a doença (55 ± 8 anos), como grupo controle. As taxas de transferência de colesterol livre e fosfolípidos para a HDL foram maiores no grupo dos pacientes diabéticos quando comparados com o grupo controle (CL= $7,1\pm 1,7$ e $6,4\pm 1,4\%$, $p=0,0400$; FL= $23,6\pm 2,4$ e $19,3\pm 3,3\%$, $p<0,0001$, respectivamente). No entanto, não houve diferença na transferência de éster de colesterol e triglicérides entre os pacientes diabéticos e indivíduos controles. O tamanho da partícula de HDL também não foi diferente entre os grupos. As transferências de éster de colesterol, triglicérides e colesterol livre correlacionaram-se positivamente. Houve também correlação positiva entre a concentração plasmática do colesterol total e LDL-C com a taxa de transferência de triglicérides e entre a concentração plasmática da apoA1 com a taxa de transferência de éster de colesterol e de colesterol livre. Em virtude da partícula de HDL ter importante papel antiaterogênico, a maior transferência de FL e CL para a HDL no DM2, podem ser relevantes para estabelecer mecanismos antiaterogênicos associados a alterações na lipoproteína relacionados com o DM2.

Descritores: 1. Diabetes *mellitus* tipo 2. 2. Lipoproteína HDL. 3. Nanopartículas

ABSTRACT

SEYDELL, TM. Lipid transfer “in vitro” from an artificial nanoemulsion to the HDL fraction in patients with type 2 diabetes. São Paulo, 2007. 48p. Doctoral Thesis Defense - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo.

Type II diabetes *mellitus* has become one of the world's main public health issues. High triglyceride concentrations and low HDL-C concentrations are the main in the plasma lipids found in DM2. Hipertriglyceridemia is but one of the factors that cause lipoprotein composition, which in turn can cause alterations in particle function. The antiatherogenic effect of HDL is due primarily to its ability to promote Reverse Cholesterol Transport, in which lipid transfer between lipoproteins is one step in the process. The objective of this study was to evaluate HDL particle size and its capacity to accept lipid constituents from other lipoproteins. The methodology utilized is based on the lipid transfer between with an artificial cholesterol-rich nanoemulsion labeled with ^3H -tryglicerides (TG) and ^{14}C -free cholesterol (FC) or ^3H -cholesteryl ester (CE) and ^{14}C -phospholipids (PL), structurally similar to LDL, used as a radioactive lipid donator. After LDE and other lipoprotein precipitation, the capacity of HDL to receive lipids is quantified by measuring the radioactivity present in the lipoprotein. Forty-five diabetic individuals (53 ± 7) and 45 non-diabetic individual (55 ± 8) as a control group were studied. The free cholesterol (FC) and phospholipids (PL) transfer rate to HDL was higher for the diabetic group when compared with control group (FC= 7.1 ± 1.7 e $6.4\pm 1.4\%$, $p=0.0400$; PL= 23.6 ± 2.4 e $19.3\pm 3.3\%$, $p<0.0001$, respectively). However, there was no transfer difference of the cholesteryl ester and triglycerides between the two study groups. No difference in the HDL particle size was observed in either group. There was found correlations between the lipid transfer rates and between the transfer rates and the lipoprotein profile of the diabetic individuals were also analyzed. The transfer of cholesteryl ester, triglycerides and free cholesterol correlated positively. There was also a positive correlation between the plasmatic concentration of total cholesterol and LDL-C with the triglyceride transfer and between the plasmatic concentration of apoAI with the cholesteryl ester and free cholesterol. This pattern of greater PL and FC transfer to HDL associated with DM2 can be a marker related to functional alterations in HDL that may contribute to atherogenic in those patients.

Descriptors: 1. Type 2 diabetes *mellitus*. 2. Lipoproeins HDL. 3. Nanoparticles

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo, principalmente em países desenvolvidos, onde são observados os maiores índices de sua prevalência e incidência (ROMAN; HARRIS, 1997). Estimativas sugerem mais de 170 milhões de pessoas (2,8%), que em 2030 chegaria a 360 milhões (4,4%) (WILD et al., 2004).

No Brasil, calcula-se que existam 5 milhões de diabéticos, 7,6% da população. A estimativa para 2030 na população brasileira chegará a aproximadamente 11 milhões de casos, estando entre as dez principais causas de mortalidade no país (WILD et al., 2004).

A alta prevalência se deve à inter-relação do diabetes com a doença cardiovascular, principal causa de morbidade e mortalidade nos diabéticos tipo 2, sendo responsável por 75-80% dos óbitos (KANNEL; MAGEE, 1979; BONOW et al., 1996; HSUEH; LAW, 1998). De acordo com recentes estimativas realizadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente um terço da mortalidade no mundo é decorrente da doença cardiovascular (OMS, 2004). Pacientes diabéticos apresentam 3 a 4 vezes mais chance de desenvolver doença coronariana (DAC) (MANSON et al., 1991).

O DM2 é uma doença metabólica complexa e multifatorial caracterizada por hiperglicemia resultante da resistência à ação da insulina ou da deficiência na secreção desta (CARPENTER et al., 1992; ECDCDM, 1997; ECDCDM, 2003; ADA, 2006; LYRA et al., 2006). As causas da doença ainda não são perfeitamente conhecidas, mas são atribuídos a uma grande predisposição genética,

sedentarismo, hipertensão arterial, dislipidemia, estresse, idade avançada, fármacos e a obesidade (ROBERT,1998).

A dislipidemia no DM2 é um importante fator de risco para a doença coronariana (DURRINGTON, 1998; BALLANTYNE et al., 1999). Esta é caracterizada por uma hipertrigliceridemia e baixa concentração plasmática do HDL-colesterol (HDL-C) (KREISBERG et al., 2003), acompanhada por maior produção de partículas de LDL-C pequenas e densas, as quais são consideradas mais aterogênicas (ROBERT,1998).

A baixa concentração plasmática do HDL-C correlaciona-se com aumento na produção da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (ROBERT, 1998). O aumento da produção hepática de VLDL leva ao aumento da concentração plasmática de triglicérides (McENENY et al., 2000), provavelmente decorrente da resistência insulínica. O aumento na concentração plasmática de triglicérides e VLDL refletem o aumento na concentração plasmática da apolipoproteína B (apo B). Esta apolipoproteína é também um fator proaterogênico bastante relevante na dislipidemia diabética (YUSUF et al., 2004). A hipertrigliceridemia pode alterar a composição das lipoproteínas (CAVALLERO et al., 1995; BRITES et al., 1999; PASSARELLI et al., 2000), aumentando a transferência de lípidos provenientes de outras classes de lipoproteínas e aumentando o catabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL) (BAGDADE et al., 1991; GUERIN et al., 1995, 2000a; ROBERT, 1998).

O efeito antiaterogênico da HDL se dá sobretudo devido à sua propriedade de transportar lípidos dos tecidos periféricos para o fígado, conhecido como Transporte Reverso do Colesterol (TRC) (BRITES et al., 2000; WANG; BRIGGS, 2004; BENJAMIN et al., 2005; LEWIS; RADER, 2005; BENJAMIN et al., 2005). Uma

das etapas deste processo é a troca bidirecional de lípidos entre as lipoproteínas. Estas trocas são realizadas por colisões ou facilitadas pelas proteínas de transferência, como a proteínas de transferência de éster de colesterol (CETP) e proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP). A CETP promove a transferência de éster de colesterol (CE) das lipoproteínas ricas em triglicérides (VLDL, LDL) em troca de triglicérides (GROENER; KOSTNER, 1987). Esta proteína é, então um importante modulador na composição das lipoproteínas plasmáticas (ARII et al., 1997), além de participar na determinação da concentração plasmática do HDL-C (NAVAB et al., 2004a). A PLTP facilita a transferência principalmente de fosfolípidos das lipoproteínas que contêm apolipoproteína B (apo B) para as HDL, apresentando relevante importância na regulação das mesmas (SETALA, et al., 2007; HUUSKONEN, et al., 2000).

As transferências de lípidos entre as lipoproteínas são dependentes da estrutura e da concentração da lipoproteína doadora e da receptora (GROENER; KOSTNER, 1987; BAGDADE, 1991; GUERIN et al., 1995), assim como da atividade das proteínas de transferência já mencionadas (TALL et al., 1985; ALBERS et al., 1996; LAGROST et al., 1998; EHNHOLM, 1999; VAN TOL et al., 1999).

Alterações no metabolismo lipídico relacionados também ao TRC estão envolvidas nos mecanismos da aterosclerose no diabetes, sendo também essenciais para a homeostase do colesterol no organismo. Neste estudo, a habilidade da HDL no DM2 em receber lípidos simultaneamente, como colesterol livre (CL), éster de colesterol (CE), fosfolípidos (FL) e triglicérides (TG) foi avaliada por meio de uma nanoemulsão artificial (LDE) com composição lipídica semelhante à lipoproteína de baixa densidade (LDL) natural e também foi mensurado o tamanho das partículas de HDL.

1.1. Metabolismo lipídico

Os lípidos da dieta sofrem hidrólise pelas lipases pancreáticas e intestinal (PATSCHE,1998). No processo de digestão, estes lípidos, juntamente com os fosfolípidos, ácidos e sais biliares formam as micelas. A formação dessas micelas é fundamental para o aumento da ação das lipases que hidrolisam os lípidos complexos, tornando-os mais simples e mais facilmente absorvíveis. Os produtos da hidrólise difundem-se para a mucosa intestinal. Os lípidos absorvidos no interior das células são reconvertidos em triglicérides, e juntamente com o colesterol da dieta, são acrescidos de proteínas sintetizadas nas células da parede, para então formar os quilomícrons, os quais possuem como principal componente protéico a apo B-48 (PATSCHE,1998).

Pelo ducto torácico, os quilomícrons atingem a circulação sanguínea, onde sofrem a ação da lipase lipoprotéica (LLP) e trocas de componentes lipídicos com outras lipoproteínas, principalmente as HDL, enriquecendo-se em apo CII. A apo CII é um cofator de ativação da LLP. Uma vez ativada, essa enzima inicia o processo de hidrólise dos triglicérides, liberando monoglicéreis e ácidos graxos (BLANCHETTE-MACKIE, 1973). A apo CIII, também presente na lipoproteína, inibe a LLP, dando o gatilho para o final do catabolismo (WANG; TALL, 2003).

As partículas resultantes do processo de lipólise são denominadas remanescentes de quilomícrons (GOLDMAN; BRAUNWALD, 2000). Os remanescentes de quilomícrons, simultaneamente adquirem apo E, que tem alta afinidade pelo receptor B/E (receptor de LDL), presente nas células hepáticas (DOMINICZAK, M. H., 1997). Então a remoção dos quilomícrons na circulação

ocorre pela interação deste receptor com a apo E, sendo então metabolizados. Seus componentes de superfície contribuem para a formação da HDL.

O fígado lança à circulação as VLDL que, de modo análogo aos quilomícrons, sofrem ação da LPL. Após sua secreção na circulação, a VLDL entra em contato com outras lipoproteínas e através de colisões com a HDL, adquire da mesma as apos E e CII. A partir do catabolismo da VLDL, serão formadas as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) podendo seguir dois caminhos (THOMPSON et al., 2002) as maiores são removidas pelo fígado através da ligação ao receptor específico de apo E e de apo B e E (receptor B/E ou receptor de LDL) ou as partículas de menor tamanho podem ser removidas pelo fígado ou continuarem perdendo triglicérides e fosfolípidos através da ação da Lipase Hepática (LH). As IDL perdem todas as apos com exceção da apo B-100 e se convertem em LDL.

As LDL têm como função, transportar colesterol para a síntese de membranas de células em divisão e a síntese de hormônios esteróides no córtex da supra-renal e gônadas. Sua catabolização ocorre através de interação com receptores específicos presentes na superfície das células nos tecidos hepáticos e extra-hepáticos, que reconhecem as apos B-100 e E. O fígado é o principal órgão responsável pela sua captação (THOMPSON et al., 2002). A regulação do receptor de LDL é o principal fator que controla as concentrações plasmáticas de LDL-C. Defeitos no receptor ou na apo B-100 dificultam a captação celular da partícula e resultam na sua remoção plasmática deficiente e conseqüentemente aumento da concentração plasmática de LDL-C. O aumento da concentração de LDL-C no espaço subendotelial pode levar à sua oxidação e ocasionar mudanças na sua composição lipídica e protéica. Há, então, maior possibilidade de a LDL tornar-se pequena e densa e de a LDL ser oxidada. Uma vez modificada, esta passa a não

ser reconhecida por receptores específicos e é removida da circulação sanguínea através de receptores de varredura ou receptores “scavenger” (SRB-1), presentes em células do sistema retículo endotelial, como macrófagos. Essas células tornam-se repletas de colesterol, convertendo-se em células espumosas, cujo aparecimento é o evento inicial no processo aterogênico (THOMPSON et al., 2002).

1.2. HDL e Transporte Reverso do Colesterol

A lipoproteína de alta densidade é formada por um grupo de partículas bastante heterogêneas. As HDL são as menores (7-17nm) e as mais densas ($1,063 < d < 1,21$ g/mL) das frações lipoprotéicas plasmáticas (SEGRETT et al., 2000; KOPPAKA, 2001; LUND-KATZ et al., 2004), possuem migração eletroforética α e são subdivididas de acordo com seu conteúdo lipídico, com seu tamanho e com a quantidade de proteínas. Sua estrutura consiste em um núcleo lipídico hidrofóbico de éster de colesterol (15 a 20%) e pequena quantidade de triglicérides (2 a 7%). Este núcleo é circundado por uma camada monofásica de fosfolípidos (26 a 32%), colesterol não esterificado (3 a 5%) e apolipoproteínas (45 a 75%) (SEGRETT et al., 1999,2000; BENJAMIN et al., 2005). São subdivididas em quatro subclasses: HDL₁, HDL₂, HDL₃ e HDL₄, sendo as HDL₂ e as HDL₃ as mais abundantes no plasma (EISENBERG, 1984).

A apo AI é o maior componente estrutural da HDL, fazendo parte de aproximadamente 70% de suas proteínas. A segunda maior apolipoproteína da HDL é a apo AII, representando 20%. Outras proteínas também são encontradas em menores quantidades como as apo E, apo AIV, apo V, apo J, apo CI, apo CII e apo

CIII (ASZTALOS; SCHAEFER, 2003; BARTER et al., 2003; KARLSSON et al., 2005).

A HDL é formada no fígado e intestino e é lançada na circulação sob a forma discóide (pré β -HDL). As apo AI proveniente do catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides são lipidadas. A lipidação ocorre pela remoção de fosfolípidos e colesterol de tecido hepático e extra-hepático através do transportador de membrana “ATP-binding cassette transporter A1” (ABCA1), formando a HDL discóide (ORAM, 2002; WANG; TALL, 2003; SMITH et al., 2004). O ABCA1 é um importante regulador do efluxo do colesterol celular e da lipidação da apo AI, sendo o mediador na formação da HDL esférica e madura (ORAM, 2002; KONTUSH; CHAPMAN, 2006). As apolipoproteínas AII e AIV, por serem capazes de facilitar o efluxo celular de fosfolípidos e colesterol, também sofrem lipidação dando origem as pré β -HDL. A HDL pode também ser formada a partir da ação da LLP nas lipoproteínas ricas em triglicérides, que então, liberam apolipoproteínas, fosfolípidos e colesterol (BARTER et al., 2003). Esta HDL nascente é instável (ATMEH; ABDELRAZEQ, 2005) e requer lípidos (ORAM, 2002).

Na fração plasmática contendo HDL também são encontradas enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, incluindo a LCAT, CETP, PLTP e enzimas antioxidantes (NAVAB et al., 2004a; KONTUSH, 2004), o que confere à lipoproteína outras funções além do transporte reverso do colesterol, como: ação antioxidante, antiinflamatória, produção de óxido nítrico, antitrombótica e antiplaquetária (TOMÁS, 2004; ASSMANN; NOFER, 2003; ASSMANN; GOTTO, 2004; NAVAB et al., 2004b).

Uma importante função da HDL é promover o TRC, no qual o colesterol é transportado dos tecidos periféricos até o fígado, onde é excretado. Dessa forma,

esse transporte evita que o colesterol se acumule nas células, o que seria um grave transtorno à homeostase. O efluxo do colesterol pode ocorrer de duas maneiras distintas (YOUNG et al., 2004). Uma forma inespecífica que se reflete na difusão passiva aquosa do colesterol para fora da membrana celular na direção de moléculas receptoras em função do gradiente de concentração celular, não havendo necessidade de uma ligação a um receptor específico (BARTER et al., 2003). A segunda forma, a interação da HDL com os receptores SR-B1 pode promover o efluxo de colesterol se houver um gradiente de concentração favorável (RADER, 2002). Esta forma de efluxo envolve interações específicas, sendo dependente de proteínas de membrana plasmática.

Depois da captação do excesso de colesterol das células de tecidos periféricos e da superfície das lipoproteínas ricas em triglicérides, a HDL discóide é convertida em uma partícula menor, a HDL₃ que possui forma esférica e um núcleo hidrofóbico. Esse processo de conversão chamado esterificação é mediado pela enzima lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT), enzima sintetizada e secretada principalmente pelo fígado. A LCAT, ativada pela apo AI (JONAS, 2000), transfere um ácido graxo da posição-2 do fosfolípide (lecitina) para o grupo hidroxila da molécula de colesterol.

A HDL₃ continua a receber colesterol e principalmente fosfolípidos das membranas celulares, mas agora através do receptor SRB-I que estão presentes no fígado, monócitos e glândula adrenal (RUBINS et al., 2000). A HDL₃ também recebe colesterol não esterificado e fosfolípidos provenientes da lipólise realizada pela LLP dos quilomícrons e da VLDL por intermédio da proteína de transferência de fosfolípidos (VON ECKARDSTEIN et al., 2001). Este colesterol recebido pela PLTP também é esterificado pela LCAT, formando, então a HDL₃ em uma partícula maior,

a HDL₂ (VON ECKARDSTEIN et al., 2001). O colesterol esterificado da HDL₂ é transferido, por meio da proteína transportadora de éster de colesterol, da HDL₂ para as demais lipoproteínas que contêm apo B (GLOMSET, 1970; MARCEL et al., 1980; VAN TOL, 2002; LÊ GOFF et al., 2004). As lipoproteínas ricas em triglicérides, por sua vez transferem triglicérides para a HDL₂. Os triglicérides recebido pela HDL₂ tornam-se substrato para a lipase hepática. A lipase hepática (LH) é uma glicoproteína hidrofóbica produzida pelo fígado e que está em associação com as lipoproteínas no plasma, convertendo a HDL₂ novamente em HDL₃, que retorna para o ciclo de remoção tecidual do colesterol ou continuam a sofrer degradação dos seus constituintes (EISENBERG, 1984; VON ECKARDSTEIN et al., 2001; SANTAMARINA et al., 2004). A HDL também desempenha a importante função de doar apolipoproteínas para o quilomícron, VLDL e IDL, necessários ao metabolismo das mesmas (KWITEROVICH Jr., 2000).

Este conjunto de acontecimentos entre as lipases e o receptor SRB-I resulta no remodelamento da HDL₂, originando as pré β -HDL e retornando ao ciclo de remoção tecidual.

1.3. Nanoemulsão artificial

O metabolismo das lipoproteínas tem sido investigado através do uso de uma nanoemulsão com composição lipídica semelhante à LDL natural (LDE), mas sem a parte protéica da lipoproteína (GINSBURG et al., 1982; MARANHÃO et al., 1993). Resultados obtidos em estudos com ratos mostraram que a LDE apresentava cinética plasmática semelhante à da LDL natural, sugerindo que estivesse sendo

captada pelos mesmos receptores que retiram a LDL da circulação. A LDE não tem proteína, mas na circulação plasmática, em contato com as lipoproteínas naturais, adquire apo E, que é reconhecida pelo receptor da LDL (MARANHÃO et al., 1993). Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com LDE pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico (MARANHÃO et al., 1997). No entanto, a partícula artificial tem mais afinidade pelos receptores da LDL do que a própria LDL natural (HIRATA et al., 1999). Isto acontece porque o meio ligante ao receptor utilizado pela LDE é a apo E, que tem mais afinidade pelo receptor do que a apo B100 da LDL natural.

Em outras experiências, a LDE foi injetada em indivíduos normolipidêmicos e em portadores de hipercolesterolemia (MARANHÃO et al., 1997). Nesta situação, o defeito básico consiste em receptores B e E defeituosos, o que resulta em captação deficiente da LDL e seu acúmulo no plasma. Nestes pacientes a LDE foi removida muito lentamente da circulação, confirmando o comportamento esperado e mostrando o potencial da nanoemulsão como instrumento para investigação das dislipidemias.

Portanto, viu-se a possibilidade de utilizar a LDE como modelo de lipoproteína doadora de lípidos na investigação da capacidade da HDL de receber colesterol livre, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos de lipoproteínas.

1.4. JUSTIFICATIVA

A baixa concentração plasmática da HDL é um fator de grande relevância na dislipidemia diabética (TASKINEN, 2003). Além da concentração diminuída da HDL, muitos estudos vêm explorando os aspectos qualitativos desta lipoproteína.

Alterações químicas e modificações na composição das HDL estão também envolvidas nos mecanismos da aterosclerose no diabetes, ocasionando menor eficiência no efluxo do colesterol (CAVALLERO et al., 1995; PASSARELLI et al., 2000; BRITES et al., 1999). É importante salientar que essas alterações podem estar relacionadas a alterações da função antiaterogênica da lipoproteína (HANSEL et al., 2004; NOBECOURT et al., 2005).

Visto que o transporte reverso e outras funções da HDL dependem de trocas lipídicas que constantemente remodelam a estrutura da lipoproteína, o movimento de lipídeos recebidos e doados pela HDL é possivelmente importante para a manutenção da estrutura, estabilidade e função da partícula (NORATA et al. 2006; FERRETTI et al., 2006).

Em nosso laboratório, foram desenvolvidas metodologias originais visando abordar o problema de alguns dos aspectos qualitativos da HDL e suas relações com diversas doenças. Esses métodos consistem na determinação do diâmetro médio das partículas de HDL no plasma e no processo de transferência de colesterol livre, éster de colesterol, triglicérides e fosfolípidos para a HDL. Para tanto, na avaliação da transferência é utilizada uma nanoemulsão artificial como doadora de lípidos radioativos.

Esta abordagem permite avaliar a capacidade da HDL de pacientes DM2 de receber seus principais constituintes lipídicos e o possível envolvimento de alterações nesta via do transporte reverso do colesterol com a doença.

2. OBJETIVOS

- Verificar *in vitro* se o tamanho das partículas de HDL e sua capacidade de receber lípidos de uma nanoemulsão artificial estão alteradas em pacientes com DM2.

4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Os pacientes foram selecionados no Ambulatório do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor – HC – FMUSP), os quais foram convidados a comparecer no laboratório com 12h de jejum para a coleta de sangue e realização da anamnese clínica.

Antes de ingressarem no estudo foi explicado aos participantes o objetivo do projeto. Todos assinaram termos de consentimento livre e esclarecido após detalhada explicação verbal feita pelo pesquisador responsável. O protocolo deste estudo de número FR-052212 foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

- *Grupo Diabético:* Os pacientes eram diabéticos por pelo menos 5 anos, já haviam sido diagnosticados previamente e foram considerados sem complicações diabéticas crônicas evidentes de acordo com o controle clínico realizado pelos profissionais de saúde que lhes prestam assistência. Os pacientes apresentavam hemoglobina glicada (HbA_{1c}) de valor igual ou superior a 7% (ADA, 2006), com média de idade de 53 ± 7 anos, sendo 20 do sexo feminino e 25 do sexo masculino. Os pacientes eram sedentários, não apresentavam disfunção hepática clínica, renal (creatinina sérica $\geq 1,5$ mg/dL), tireoideana (TSH $\geq 2,5$ µg/dL) ou neoplasia, não faziam uso freqüente de bebida alcoólica e apresentavam média do Índice de Massa Corporal (IMC) de $27,5 \pm 2,2$ kg/m². Onze pacientes (24%) eram

tabagistas, 21 (46%) eram hipertensos, 32 (71%) faziam uso de metformina (300mg/dL), 3 (6%) de glibenclamida e 10 (22%) faziam uso de metformina em combinação com glibenclamida. Dos 45 participantes, 5 faziam uso de estatinas, as quais foram suspensas por 2 meses que antecederam o estudo.

- *Grupo Controle:* Foram estudados 45 indivíduos com média de idade 55 ± 8 anos, sendo 22 do sexo feminino e 23 do sexo masculino, normolipidêmicos, não hipertensos, sedentários, não tabagistas, não faziam uso freqüente de bebida alcoólica. Estes indivíduos apresentavam IMC de $24,9 \pm 5,0$ kg/m².

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Determinações bioquímicas

Foram realizadas as determinações bioquímicas dos pacientes diabéticos e indivíduos controle do colesterol total (CT), frações (VLDL, LDL e HDL), triglicérides (TG), glicemia de jejum em amostras de soro obtidas após 12 horas de jejum. A determinação do CT e HDL-C foi realizada pelo método colorimétrico-enzimático, COD-PAD (Labtest Diagnostica S.A, Minas Gerais, Brasil). As concentrações do colesterol de LDL e VLDL foram determinadas segundo a fórmula de Friedewald (1972).

As determinações da HbA_{1C} e das concentrações plasmáticas da apo AI e apo B foram realizadas pelo método imunoturbidimétrico.

3.2.2. Tamanho da HDL

O tamanho da partícula de HDL foi determinado por espalhamento de luz utilizando o equipamento *Laser Light Scattering* (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp.) (LIMA; MARANHÃO, 2004). Em uma amostra de plasma com EDTA obtida após coleta de sangue e centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos foram adicionados 500 µL do precipitante polietilenoglicol 8.000 (40%) em 500 µL de plasma. O conteúdo foi agitado por 30 segundos e centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm. Ocorrendo a separação por precipitação química das frações que contém apo B (VLDL, LDL), foram coletados 500 µL do sobrenadante contendo HDL o qual foi diluído em uma solução de NaCl 0,15M e 0,01% de EDTA (pH 7,5) e filtrado através de um filtro millipore® 0,22 µm de porosidade.

O diâmetro das partículas (nm) em solução foi mensurado pela luz espalhada, coletada em um ângulo de 90° e expressos pelo resultado médio obtido em 5 corridas de um minuto cada.

3.2.3. Preparo da nanoemulsão

A nanoemulsão foi preparada segundo a técnica descrita por GISNBURG et al. (1982) modificada por MARANHÃO et al. (1993).

Foram pipetados em dois frascos de vidro 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de colesterol oleato, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol livre (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), dissolvidos em clorofórmio-etanol (2:1 v/v). Posteriormente, foram adicionados às misturas de lípidos os radioisótopos [¹⁴C]

colesterol oleato e [^{14}C] fosfatidilcolina ou [^3H] colesterol e [^3H] glicerol tri oleato (Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

A seguir, cada mistura de lípidos foi seca sob fluxo de nitrogênio, em banho de água (37°C) e mantida em dessecador a vácuo, por 16 horas, a 4°C, para a remoção total dos solventes residuais. Ao final desse tempo, se adicionou 10 mL de tampão TRIS-HCl 0,01 M, pH 8,0 às misturas dessecadas. A seguir, as suspensões de lípidos foram emulsificadas por irradiação ultrassônica durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 e 55°C, na qual os componentes estão em estado de transição cristal-liquído, controlada por termômetro digital inserido diretamente nos frascos de vidro. A irradiação ultrassônica foi realizada com uma potência de 125 watts, em modo contínuo de operação por um sonicador 450 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, USA), equipado com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro.

Ao término da irradiação ultrassônica as duas nanoemulsões foram purificadas por ultracentrifugação (Ultracentrífuga Sorvall, modelo OTD Comb, Wilmington, EUA) equipada com rotor TH 641, durante 30 minutos, a 35.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante das soluções (1,0 mL), contendo partículas que flutam em densidade 1,006 g/ml, foram descartados. O volume restante foi submetido a nova ultracentrifugação a 35.000 rpm, durante 2 horas, a 4°C, após adição de brometo de potássio sólido (KBr), para ajustar a densidade em 1,210 g/mL. Do sobrenadante foram removidos 2,0 mL, os quais continham a fração das partículas de tamanho e composição desejados. O KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão tris HCl 0,01 M, pH 8. Finalmente, as emulsões foram esterilizadas por filtração em membrana Milipore (0,22 μm de porosidade) sob fluxo laminar e armazenadas a 4°C por no máximo quinze dias.

A vidraria utilizada no preparo das emulsões foi submetida a um processo de despirogenização através de vapor seco, 180°C, durante 2 horas e esterilização em vapor úmido, 120° C, durante 30 minutos. Os materiais plásticos foram esterilizados através de exposição à luz ultravioleta de onda curta, as quais possuem um componente com comprimento de onda de 253,7 nm durante 12 horas. Todo o procedimento de preparo das emulsões foi realizado em capela de fluxo laminar vertical.

3.2.4. Ensaio da transferência dos lípides da nanoemulsão para a HDL

Realizada a coleta de sangue com EDTA (1,5 g/L) foram obtidos 200 µL de plasma por centrifugação (centrífuga Sorval RT7), a uma rotação de 3.000 rpm durante 15 minutos. Os 200 µL foram incubados a 37°C em agitador orbital Gyromax 706R em ependorff com 50 µL da nanoemulsão marcada radioativamente com ¹⁴C-colesterol livre e ³H-triglicérides ou com ³H-colesterol éster e ¹⁴C-fosfolípidos. Após 1 hora, foram adicionados 250 µL do precipitante de lipoproteínas que contém apo B (Sulfato de Dextran 0,2% e Cloreto de Magnésio a 0,3 mol/L, v/v).

A solução foi agitada por 30 segundos e depois centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos, ocorrendo, então, a precipitação desta emulsão juntamente com as partículas contendo apo B. Finalmente, 250 µL do sobrenadante foram pipetados em tubos de cintilação com 5 mL de solução cintiladora (Packard BioScience, Groeningen, Netherlands) para a realização da contagem da radioatividade no

sobrenadante. A radioatividade foi mensurada por meio do equipamento Packard 1600 TR model Liquid Scintillation Analyzer (Palo Alto, CA).

Para análise e correção de interferentes durante as etapas de precipitação e contagem da radioatividade, foi utilizada uma amostra “branco”. Esta amostra consiste de 200 μ L de solução tampão TRIS-HCl (pH 7,4) com 50 μ L da nanoemulsão, seguindo todo o protocolo do ensaio conforme descrito acima.

A transferência dos quatro lípides marcados foi expressa em percentagem da radioatividade transferida da LDE para a HDL por hora de uma amostra de plasma, incubada e sem a adição do precipitante (amostra padrão).

3.3. Análise estatística

Todos os valores foram expressos em média \pm desvio padrão ($M \pm DP$), considerando-se como nível crítico para probabilidade de significância valores $<0,05$.

As análises de comparações entre os dois grupos foram realizadas utilizando-se t-test quando os dados se apresentaram de forma Gaussiana e o teste Mann-Whitney quando os dados mostraram distribuição não Gaussiana.

O coeficiente de correlação linear de Spearman foi aplicado para correlacionar os lípides transferidos da nanoemulsão para a HDL com os parâmetros analisados e entre as transferências dos quatro lípides. Os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes quando P bicaudal foi $< 0,05$ para um intervalo de confiança de 95%.

Utilizou-se software GraphPad Prism TM, versão 3.0 para as análises estatísticas.

4. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os valores como média e desvio padrão das concentrações plasmáticas dos lípides, a concentração plasmática das apolipoproteínas, e a média do tamanho das partículas da fração HDL dos pacientes diabéticos e dos indivíduos controles. A concentração plasmática da glicose nos diabéticos foi 42% maior em comparação com o grupo controle, $p < 0,0001$.

Não houve diferença nas concentrações plasmáticas do colesterol total, LDL-C e apo AI entre o grupo de pacientes diabéticos e o grupo controle, $p < 0,05$. A concentração plasmática do HDL-C no grupo dos pacientes diabéticos foi 14,5% menor ($p = 0,0311$) e a concentração plasmática dos triglicérides 41% maior ($p < 0,0001$), quando comparados com os indivíduos controles. Houve aumento de aproximadamente 40% na concentração de VLDL-C nos pacientes com DM2 ($p < 0,0001$).

Nos pacientes diabéticos, a concentração plasmática da apo B foi maior do que a do grupo controle, $p = 0,0121$. Não houve diferença no tamanho das partículas de HDL entre ambos os grupos estudados.

A Tabela 2 mostra os valores em porcentagem de lípidos (éster de colesterol, fosfolípidos, triglicérides e colesterol livre) transferidos da nanoemulsão para a HDL dos pacientes diabéticos e dos indivíduos controles.

Não houve diferença na transferência de éster de colesterol e triglicérides da nanoemulsão para a HDL nos pacientes diabéticos quando comparados aos indivíduos controles. Com relação à transferência de colesterol livre e fosfolípidos,

estas se apresentaram aproximadamente 9 e 18% maior no grupo dos pacientes diabéticos quando comparados com o grupo controle.

A Tabela 3 mostra os resultados das análises de correlações entre os valores das transferências em porcentagem dos lipídeos da nanoemulsão para a HDL no grupo dos pacientes com DM2. Houve correlação positiva entre as transferências de éster de colesterol e colesterol livre ($r= 0,4898$), entre as transferências de éster de colesterol e triglicérides ($r= 0,4425$) e entre as transferências de triglicérides e colesterol livre ($r= 0,5131$).

A Tabela 4 mostra os resultados das correlações entre as transferências em porcentagem dos quatro lípidos para a HDL e os demais parâmetros analisados no grupo de pacientes diabéticos. Houve correlação positiva entre a transferência e triglicérides com a concentração plasmática de colesterol ($r= 0,2940$) e do LDL-C ($r= 0,2915$). Também foi encontrada correlação positiva entre a concentração plasmática da Apo A1 com a transferência de éster de colesterol ($r= 0,3639$) e de colesterol livre ($r=0,3682$).

Tabela 1: Concentração plasmática dos lípidos, das apolipoproteínas e da glicose dos pacientes diabéticos e do grupo controle.

Parâmetros (mg/dL)	Grupo Controle (n=45)	Diabéticos (n=45)	P*
Colesterol Total	172 ± 25	170 ± 48	ns
HDL-C	48 ± 11	41 ± 12	0,0311
LDL-C	104 ± 26	94 ± 44	ns
VLDL-C	20 ± 7	33 ± 17	< 0,0001
Triglicérides	99 ± 38	169 ± 80	< 0,0001
Apo A1	137 ± 14	132 ± 27	ns
Apo B	71 ± 26	88 ± 26	0,0121
Glicose	92 ± 9	157 ± 82	< 0,0001
HbA_{1c} (%)	-----	8 ± 1	-----

Abreviaturas: HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa; Apo A1: Apolipoproteína A1; Apo B: Apolipoproteína B; HbA_{1c}: hemoglobina glicada; p: probabilidade de significância; ns: não significativo; p<0,005.

*Teste t de Student.

Tabela 2: Transferências dos lípidos da LDE para HDL e tamanho da partícula HDL dos pacientes diabéticos e não-diabéticos.

	Grupo Controle (n=45)	Grupo diabéticos (n=45)	p*
Transferência de Lípidos (%)			
³ H -CE	3,7 ± 1,3	3,9 ± 1,0	ns
¹⁴ C-FL	19,3 ± 3,3	23,4 ± 2,1	< 0,0001
³ H-TG	4,8 ± 1,5	4,3 ± 0,8	ns
¹⁴ C-CL	6,3 ± 1,2	6,9 ± 1,3	0,0316
Tamanho HDL (nm)	9,0 ± 1	9,2 ± 1	ns

Abreviaturas: ³H-CE: éster de colesterol; ¹⁴C-FL: fosfolípidos; ³H-TG: triglicérides; ¹⁴C-CL: colesterol livre; HDL: lipoproteína de alta densidade p: probabilidade de significância; ns: não significativo; p<0,005.

*Teste t de Student.

Tabela 3: Correlação entre as transferências de lípidos da LDE para HDL dos pacientes diabéticos tipo2.

Lípides (%)	¹⁴ C-FL		³ H-TG		¹⁴ C-CL	
	r	p	r	p	r	p
³ H -CE	0,1002	0,4978	0,4425	0,0016	0,4898	0,0004
¹⁴ C-FL			0,0391	0,7895	0,2489	0,0846
³ H-TG					0,5131	0,0002

Abreviaturas: ³H-CE: éster de colesterol; ¹⁴C-FL: fosfolípidos; ³H-TG: triglicérides; ¹⁴C-CL: colesterol livre; p: probabilidade de significância; p<0,005. Dados expressos como coeficientes de correlação (r) de Spearman.

Tabela 4: Correlação entre as transferências de lípidos da LDE para HDL e os parâmetros analisados nos pacientes diabéticos tipo2.

Parâmetros (mg/dL)	Transferência de Lípidos (%)							
	³ H –CE		¹⁴ C-FL		³ H-TG		¹⁴ C-CL	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Colesterol Total	-0,8877	0,5485	-0,1440	0,3235	0,2940	0,0425	-0,1204	0,4099
HDL-C	0,0058	0,06967	-0,0504	0,7336	0,0916	0,5358	0,1954	0,1832
LDL-C	-0,0694	0,6391	-0,117	0,4209	0,2915	0,0444	-0,191	0,1874
Triglicérides	-0,2403	0,1000	0,05206	0,7224	-0,0558	0,7033	-0,1711	0,2399
Apo A1	0,0639	0,0406	0,2900	0,1074	-0,0086	0,9626	0,3682	0,0381
Apo B	-0,0516	0,7791	0,1343	0,4635	-0,1239	0,4992	-0,3087	0,0856
Glicose	0,0060	0,9675	-0,2706	0,0600	0,1204	0,4097	-0,079	0,5888

Abreviaturas: HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; Apo A1: Apolipoproteína A1; Apo B: Apolipoproteína B; p: probabilidade de significância; ³H-CE: éster de colesterol; ¹⁴C-FL: fosfolípidos; ³H-TG: triglicérides; ¹⁴C-CL: colesterol livre; p: probabilidade de significância; p<0,005. Dados expressos como coeficientes de correlação (r) de Spearman.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que o grupo dos pacientes com DM2 apresentou as alterações de perfil lipídico características da doença, ou seja, hipertrigliceridemia acompanhada de concentração diminuída de HDL-C (BAGDADE et al., 1991; ROBERT, 1998; McENENY et al., 2000; GUERIN et al., 1995, 2000a; KRENTZ, 2003; TASKINEN, 2003).

A hipertrigliceridemia de jejum reflete o acúmulo de VLDL na circulação e é decorrente da resistência à insulina. A insulina estimula a síntese e a atividade da lipase lipoprotéica. Na situação de resistência insulínica, a deficiência enzimática leva à diminuição da lipólise e acúmulo da VLDL (ROBERT, 1998). O catabolismo dos quilomícrons, que têm via metabólica em comum com a da VLDL, também é afetado pela deficiência da lipase lipoprotéica. Portanto, é esperado que os pacientes com DM2 deste trabalho também apresentem alterações nesse metabolismo. O metabolismo de quilomícrom, no entanto, de avaliação complexa, não foi abordado neste estudo.

A par da deficiência na remoção da VLDL, a resistência à insulina também produz aumento de síntese desta lipoproteína (ROBERT, 1998). Além disso, a síntese de apo B, proteína que participa ativamente do processo de síntese da VLDL no hepatócito, também está aumentada (TASKINEN, 2003). Embora não tenha havido diferença na LDL-C, lipoproteína na qual a maior parte da apo B está contida, a concentração de apo B foi 13% maior no grupo de pacientes DM2. Isto pode ser reflexo do acúmulo de VLDL, uma vez que esta lipoproteína também possui a apo B.

Uma outra interpretação para o aumento da apo B sem aumento do LDL-C nos pacientes com DM2 é a de que tenha ocorrido aumento do número de partículas

de LDL, porém com menor conteúdo de colesterol. Essa interpretação está em concordância com outra característica do DM2, o aumento da subfração pequena e densa da LDL, reconhecidamente mais aterogênica do que as outras subfrações da lipoproteína. A LDL pequena e densa tem conteúdo de colesterol menor. Assim, pode ocorrer aumento no número de partículas sem aumento do colesterol presente na partícula de LDL. Vale lembrar que cada partícula de LDL, assim como de VLDL, tem apenas uma única molécula de apo B. Desta forma, a apo B é o marcador do número de partículas dessas frações lipoprotéicas, não representando a concentração de colesterol presente nas mesmas.

A principal causa da diminuição da concentração do HDL-C encontrada nos pacientes com DM2 do presente estudo e na literatura é a hipertrigliceridemia (KRENTZ, 2003; TASKINEN, 2003). O “efeito gangorra” VLDL-HDL, ou triglicérides-HDL-C, decorre das trocas lipídicas entre as duas classes de lipoproteína. A CETP promove trocas de triglicérides e de ésteres de colesterol entre a VLDL e a HDL. Embora a ação da CETP seja bidirecional, resulta em maior transferência de ésteres de colesterol da HDL para as VLDL e maior transferência de triglicérides da VLDL para a HDL. Pela lei de ação de massas, o acúmulo de VLDL exacerba o processo de trocas lipídicas. Com isso, a HDL fica depletada em ésteres de colesterol e enriquecida em triglicérides, sujeitando a lipoproteína a sofrer hidrólise do conteúdo de triglicérides pela lipase hepática. O catabolismo é aumentado, dessa forma reduzindo os níveis de HDL-C na circulação (LAMARCHE et al., 1999). Além disso, a atividade da LH *per se* pode encontrar-se aumentada nesses pacientes (TASKINEN, 2003; KONTUSH; CHAPMAN, 2006) ocasionando maior lipólise dessas HDL ricas em triglicérides e diminuição do HDL-C (ROBERT, 1998).

Um outro mecanismo de diminuição do HDL-C no DM2 está relacionado à diminuição da atividade da lipase lipoprotéica (BORGREVE et al., 2003; RASHID, et al., 2003; SCHLITT et al., 2003). Supostamente, precursores da HDL são gerados a partir da lipólise dos quilomícrons e das VLDL, pelo desprendimento dos lípidos da camada superficial dessas lipoproteínas. Com a diminuição da atividade lipolítica, é diminuída a geração desses precursores, reduzindo uma fonte de síntese da HDL.

Neste trabalho, os pacientes com DM2 não apresentaram alterações na recepção pela HDL dos lípidos do núcleo da lipoproteína – ésteres de colesterol e triglicérides – provenientes da nanoemulsão. Por outro lado, a recepção pela fração HDL dos lípidos presentes na camada superficial das partículas lipoprotéicas – fosfolípidos e colesterol livre – foi aumentada nos pacientes em comparação com o grupo controle. Vale comentar que em outro trabalho de nosso laboratório no qual a metodologia foi utilizada em pacientes com síndrome metabólica, onde predomina também a resistência à insulina no quadro clínico, obtivemos resultados semelhantes (Silva, dados não publicados).

No ensaio realizado neste estudo, vários fatores influenciam a transferência de lípidos da nanoemulsão para a HDL. Entre eles, a concentração, composição e estrutura das diversas classes de lipoproteínas, incluindo a HDL. Embora tenhamos mensurado apenas a transferência para a HDL, recuperada no sobrenadante, parte dos lípidos radioativos da nanoemulsão deve ter sido transferida para as classes contendo apo B, que sofreram precipitação química no ensaio juntamente com a nanoemulsão, tendo sido assim descartadas. No que diz respeito à concentração plasmática, as lipoproteínas contendo apo B teriam uma vantagem competitiva, já que nos pacientes com DM2, a VLDL estava aumentada

enquanto a HDL estava diminuída. O aumento de apo B também sugere que tenha havido aumento do número de partículas de LDL, como discutido anteriormente. Portanto, com base unicamente nas concentrações das classes de lipoproteínas presentes no plasma, comparando-se DM2 com seus controles, seria de se presumir que a fração HDL dos DM2 recebesse em menor quantidade os quatro lípidos marcados da nanoemulsão, o que não aconteceu em nossos resultados. Esses achados sugerem que não somente a concentração, mas também a composição e estrutura da HDL possam interferir na sua capacidade receptora de lípidos.

Sabe-se que a HDL pode sofrer modificações em sua estrutura e composição, o que acarreta em alterações funcionais da partícula (SPARKS et al., 1995; LAMARCHE et al., 1999; KONTUSH; CHAPMAN, 2006; FERRETI et al., 2005; NORATA et al., 2006). É descrito na literatura que alterações na composição e metabolismo da HDL podem estar associadas ao DM2 (NORATA et al., 2006).

A atividade de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico são provavelmente determinantes de alterações funcionais da HDL (CABANA et al., 1996). É descrito que os pacientes diabéticos apresentam aumento na atividade da LH e diminuição da LLP e LCAT (AUERBACH; PARKS, 1989; ETTINGER et al., 1990; CABANA et al., 1996; DE GROOTH et al., 2004a; LE GOFF et al., 2004). Desse modo, é sugerido que a hipertrigliceridemia e conseqüente enriquecimento da HDL com triglicérides, encontrada no grupo DM2, possa alterar a funcionalidade da partícula. Outro fator que pode alterar a estrutura, e conseqüentemente, algumas das funções da HDL no grupo DM2, é a elevada glicação não enzimática, visto que esta ocorre na parte protéica da lipoproteína (HEDRICK et al., 2000; ZHENG et al., 2004).

Outro fator que influencia na transferência de lípidos entre lipoproteínas é a ação das proteínas de transferência, CETP e PLTP. No DM2 os dados da literatura referentes à CETP são contraditórios. Enquanto em alguns estudos foi encontrado aumento da atividade da CETP (RIEMES et al., 1998; BRITES et al., 2000; LE GOFF et al., 2004) em outros ela estava inalterada (SYVANNE et al., 1995; ELCHEBLY et al., 1996; JONES et al., 1996; LOTTENBERG et al., 1996; ARIL et al., 1997; BORGGREVE et al., 2003). Portanto, levando em conta o conjunto dos dados da literatura, no que tange à atividade da CETP, não seria de se esperar alteração na recepção pela fração HDL dos ésteres de colesterol e triglicérides, lípidos cuja transferência é mediada pela CETP.

A PLTP medeia a transferência de fosfolípidos e de colesterol livre entre as lipoproteínas (SETALA et al., 2007; HUUSKONEN et al., 2000). Conforme os estudos de Borggreve et al (2003) e Riemens et al.(1998), a atividade dessa proteína está aumentada no DM2. Vários trabalhos mostram que os fosfolípidos modulam a estrutura da partícula de HDL (KONTUSH; CHAPMAN, 2006; BRITES et al., 2000; HUUSKONEN et al., 2001). Desse modo, no presente estudo é sugerido que a maior quantidade de fosfolípidos recebidos pela HDL no grupo Diabético esteja envolvida com alteração estrutural da lipoproteína.

É de se apontar que a ação da PLTP, que depende de colisões entre partículas de lipoproteínas para impulsionar a transferência de fosfolípidos e colesterol livre, superou a concentração das classes de lipoproteínas, que era desfavorável, como já discutido, ao resultado encontrado de maior recepção pela HDL desses dois lípidos.

As alterações, nos pacientes com DM2, da recepção pela fração HDL do colesterol livre e fosfolípidos da nanoemulsão doadora registradas no presente

trabalho podem determinar importantes modificações nas diversas funções da lipoproteína. Essas funções, na esterificação do colesterol, no transporte reverso do colesterol, a ação antioxidante, antiinflamatória, na produção de óxido nítrico, bem como a ação antitrombótica e antiplaquetária, dependem das várias enzimas e proteínas que se ligam à superfície da HDL, como discutido anteriormente. A afinidade dessas diversas proteínas pelas partículas da HDL é determinada por forças não-covalentes, do tipo dipolo-dipolo ou van der Waals. Essas proteínas, para se acomodarem à superfície da partícula, devem ser preferencialmente anfífilas, com estrutura alfa-hélice. O fato de ocorrer no DM2 uma transferência maior para HDL de fosfolípidos e de colesterol livre - justamente os componentes da superfície lipoprotéica - pode acarretar alterações eletrostáticas na superfície da lipoproteína que mudem a afinidade das moléculas de proteína ligadas à HDL, determinando um novo arranjo protéico. Como consequência, seria de se esperar modificações nas diversas funções atribuídas à HDL, decorrentes dessas modificações de composição da camada superficial da lipoproteína.

O grupo de pacientes DM2 que participaram deste estudo fazia uso de hipoglicemiantes. Esses medicamentos poderiam ter provocado alterações no metabolismo lipídico que alterassem os resultados do presente trabalho, embora esses dados ainda não estejam bem elucidados na literatura. Com relação ao uso da metformina no controle da glicemia, a literatura mostra resultados bastante discrepantes quanto à sua ação no metabolismo lipídico (WULFFELE, et al., 2004; DESPRES, 2003; REAVEN, 1988). Estudos relatam que o medicamento pode reduzir a concentração plasmática do colesterol total e dos triglicérides e aumentar o HDL-C (GINSBERG, et al., 1999; GRANT, 1996; YKI-JARVINEN, et al., 1999; ROBINSON, et al., 1998). Em contrapartida, outros estudos relatam que a

metformina não apresenta qualquer alteração no perfil lipídico dos pacientes com DM2 (GROOP, et al., 1989; RAINS, et al., 1988). Além da metformina, alguns dos pacientes diabéticos faziam uso de sulfoniluréias. No entanto, de acordo com estudo realizado por Chu et al. (2003), esta classe de hipoglicemiante não promove alterações no metabolismo lipídico. Além disso, outros trabalhos mostraram que o uso destes dois hipoglicemiantes em associação também não interfere no metabolismo lipídico (JABER, et al., 2002; STROWING, et al., 2002; WULFFELE, et al., 2002; CHU et al., 2003).

Ao analisar o tamanho da partícula de HDL, não foi encontrada diferença entre os grupos estudados. Alguns estudos têm reportado que subclasses de pequenas HDL contribuem para o aumento do risco de doença cardiovascular, enquanto que as subclasses de grandes HDL são associadas com diminuição desse risco (JIA et al., 2006). Vale lembrar que o tamanho desta lipoproteína está relacionado principalmente ao conteúdo de éster de colesterol presente no núcleo da partícula (BARTER; RYE, 2006). Isto pode explicar o resultado encontrado no presente estudo, visto que não houve diferença na capacidade da HDL dos dois grupos em receber éster de colesterol. A falta de efeito do DM2 no tamanho de partícula da fração HDL sugere que a doença não altera o perfil de subclasses dessa lipoproteína.

Um aspecto pouco explorado na literatura é o efeito da HDL na estabilização do “pool” plasmático de colesterol. Ao promover a esterificação do colesterol recebido das outras classes de lipoproteína ou das membranas celulares, a HDL transforma-se em sua forma química mais estável. Logo, grande parte do éster de colesterol presente no centro da partícula é “dependente” do fluxo de colesterol livre para a HDL, ou seja, quanto mais colesterol livre é recebido, mais

éster de colesterol será formado por meio da LCAT. Este éster de colesterol formado é transferido para as lipoproteínas que contêm apo B, as quais em troca, doam triglicérides. Para que ocorra a troca desses dois lípidos entre as lipoproteínas é necessária a presença da proteína de transferência, CETP (STEIN; STEIN, 2005). Desse modo, quanto mais colesterol livre é captado, mais colesterol será esterificado e mais triglicérides será recebido. De acordo com esses conceitos, pode-se explicar as correlações positivas encontradas no presente trabalho entre as taxas de transferência de éster de colesterol, colesterol livre e triglicérides.

Os pacientes diabéticos hipertrigliceridêmicos apresentam maior concentração de triglicérides nas partículas de VLDL (KRENTZ, 2003; TASKINEN, 2003), com conseqüente aumento na transferência deste lípido para a HDL (BAGDADE et al., 1991; GUERIN et al., 1995, 2000a). A alteração da proporção entre éster de colesterol e triglicérides na HDL diminui a estabilidade da partícula, ocasionando desprendimento da apo AI presente na superfície da lipoproteína (SPARKS et al., 1995). Portanto, é sugerido que as correlações positivas encontradas entre a concentração plasmática de apo AI e as taxas de transferência de éster de colesterol e colesterol livre seja devida ao fato da apo AI, associada à partícula de HDL, ser ativadora da LCAT (BORGGREVE et al., 2003). Desse modo, ao passo que a apo AI ativa o processo de esterificação, torna a partícula de HDL mais ávida por colesterol livre, aumentando a captação deste lípido. Além disso, a captação do éster de colesterol seria secundária ao aumento da captação do colesterol livre, como descrito anteriormente, explicando a correlação da transferência deste lípido com a concentração plasmática de apo AI.

Outras correlações positivas foram encontradas entre as concentrações plasmáticas de LDL-C e colesterol total com a taxa de transferência de triglicérides.

O colesterol total representa 65% da concentração do LDL-C (HAMMAD et al., 1998). Desse modo, o aumento de colesterol total assim como de LDL-C representa aumento da concentração de lipoproteínas doadoras de lípidos para a HDL. É sabido que na troca lipídica ocorrida entre as lipoproteínas, o principal lípido recebido pela HDL em troca do éster de colesterol é o triglicéride. Portanto, é esperado que na presença de aumento das lipoproteínas doadoras, como ocorre na hipertrigliceridemia encontrada no grupo DM2, haja aumento na transferência de triglicérides para a HDL, confirmando as correlações encontradas.

Em virtude da partícula de HDL ter importante papel antiaterogênico, estes resultados podem ser relevantes para estabelecer novos mecanismos relacionados à aterogênese no DM2.

6. CONCLUSÕES

- Ocorreu maior transferência *in vitro* de colesterol livre e de fosfolípidos da nanoemulsão artificial para a fração HDL nos pacientes com DM2 do que no grupo controle, sugerindo que haja alterações na superfície da HDL em DM2 que possam ocasionar distúrbios nas funções da lipoproteína.

- A transferência de éster de colesterol e de triglicérides para a HDL foi igual nos pacientes com DM2 à observada no grupo controle.

- O tamanho da partícula de HDL no grupo DM2 foi similar ao do grupo controle.

REFERÊNCIAS

ALBERS, J. J.; TU, A. Y.; PAIGEN, B.; CHEN, H.; CHEUNG, M. C.; MARCOVINA, S. M. Transgenic mice expressing human phospholipid transfer protein have increased HDL/non-HDL cholesterol ratio. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 26, p. 262-267, 1996.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**, v.29, p.43-48, 2006.

AMERICAM DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care In: Diabetes (Position Statement). **Diabetes Care.**, v. 28, p.4-36, 2005.

ARII, K.; SUEHIRO, T.; YAMAMOTO, M.; ITO H.; HASHIMOTO, K. Supression of plasma cholesteryl ester transfer protein activity in acute hyperinsulinemia and effect of plasma nonesterified fatty acid. **Metabolism**, v.46, p. 1166-1170, 1997.

ASSMANN, G.; GOTTO, A. M. Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerodis. **Circulation**, v. 109, p. III8-III14, 2004.

ASSMANN, G.; NOFER, Jr. Atheroprotective effects of high-density lipoprotein. **Annu. Ver. Méd.**, v. 54, p. 321-341, 2003.

ASZTALOS, B. F.; SCHAEFER, E. J. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. **Am. J. Cardiol.**, v. 91, p. 12-17, 2003.

ATMEH, R. F.; ABDELRAZEQ, I.O. Small high density lipoprotein subclasses: some of their physico-chemical properties and stability in solution. **Acta Biochim., Pol.**, v. 52, p. 515-525, 2005.

AUERBACH, B. J.; PARKS, J. S. Lipoprotein abnormalities associated with lipopolysaccharide-induced lecithin: cholesterol acyltransferase and lipase deficiency. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p.10264-10270, 1989.

BAGDADE, J. D.; RITTER, M. C.; SUBBIAIAH, P. V. Accelerated cholesteryl ester transfer in plasma of patients with hypercholesterolemia. **J. Clin. Invest.**, v.84, p. 1259-1265, 1991.

BALLANTYNE, C. M.; HERD, J. Á; FERLIC, L. L.; DUNN, J. K.; FARMER, J. A.; JONES, P.H.; SCHEIN, J. R.; GOTTO, A M Jr. Influence of low HDL on progression of coronary artery disease and response to fluvastatin therapy. **Circulation**, v. 99, p.736-743, 1999.

BARTER P. J, RYE K.A. Relationship between the concentration and antiatherogenic activity of high-density-lipoproteins. **Curr. Opin. Lipid.**, v. 17, p. 399-403, 2006.

BARTER, P. J.; RYE, K. A. Relationship between the concentration and antiatherogenic activity of high-density lipoproteins. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 17, p. 399-403, 2006.

BARTER, P. J., BREWER, H. B. JR; CHAPMAN, M. J.; HENNEKENS, C. H.; RADER, D. J., TALL, A. R. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and onhibiting atherosclerosis. **Arteriocler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. 160-167, 2003.

BENJAMIN, J. A.; KAROL, E. W.; ALAN, M. F.; MOHAMAD, N.; GREGG, C. F. High-Density Lipoprotein Function. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.46, p.1792-1798, 2005.

BONOW, R. O.; BOHANNON, N.; HAZZARD, W. Risk stratification in coronary artery disease in special populations. **Am. J. Med.**, v.101, p.17S-22S, 1996.

BORGGREVE, S. E.; VRIES, R.; DULLAART, R. P. F. 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. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.33, p. 1051-1069, 2003.

BRITES, F. D; CAVALLERO, E.; DE GEITEE, C.; NICOLAIEW, N.; JACOTOT, B.; ROSSENEU, M.; FRUCHART, J. C.; WIKINSKI, R. L.; CASTRO, G. R. Abnormal capacity to indice cholesterol efflux and a new LpA-1 pre-beta particle in Type 2 diabetc patients. **Clin. Chim. Acta.**, v. 279, p. 1-14, 1999.

BRITES, F. D.; BONAVIDA, C. D.; DE GEITERE, C.; CLOES, M.; DELFLY, B.; YAEL, M. J.; FRUCHART, J.; WIKINSKI RW, G. R. C. Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels. **Atherosclerosis**, v. 152, p. 181-192, 2000.

CABANA, V. G.; LUKENS, J. R.; RICE, K. S.; HAWKINS, T. J.; GETZ, G. S. HDL content and composition in acute phase response in three species: triglyceride enrichment of HDL a factor in its decrease. **J. Lipid. Res.**, v. 37, p. 2662-2674, 1996.

CARPENTER, M. W.; COUSTAN, D.R. Criteria for screening tests for gestational diabetes. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.144, p.768-773, 1982.

CAVALLERO, E.; BRITES, F. D.; DELFLY, B.; NICOLAIEW, N.; DECOSSIN, C.; DE GEITERE, C.; FRUCHART, J. C.; WIKINSKI, R.; JACOTOT., B.; CASTRO, G. Abnormal reverse cholesterol transport in controlled type II diabetic patients. Studies on fasting and postprandial LpA-I particles. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.15, p.2130-2135, 1995.

CHU, J. W.; ABBASI, F.; MCLAUGHLIN, T. L.; LAMENDOLA, C.; SCHAAF, P.; CARLSON, T. H.; LEARY, E. T.; REAVEN, G. M. Lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with oral antihyperglycaemic agents. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 5, p. 333-337, 2003.

DE GROOTH, G. J.; KLERKX, A. H.; STROES, E. S.; STALENHOEF, A. F.; KASTELEIN, J. J.; KUIVENHOVEN, J. A. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. **J. Lipid. Res.**, v. 45, p. 1967-1974, 2004a.

DESPRES, J. P. Potential contribution of metformin to the management of cardiovascular disease risk in patients with abdominal obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes and Metabolism**, v. 29, p. 6S53-6S61, 2003.

DOMINICZAK, M. H. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma. In: N. RIFAI, G. R; WARNICK; DOMINICZAK, M. H. Handbook of Lipoprotein Testing. Editors AACC Press. Washington (DC). 1997. p. 1-24.

DURRINGTON, P. N. Triglycerides are more important in atherosclerosis than epidemiology has suggested. **Atherosclerosis**, v. 141 (1), p. S57-S62, 1998.

EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. **J. Lipid Res.**, v.25, p. 1017, 1984.

ELCHEBLY, M.; PULCINI, B.; POROKHOV, B.; BERTHEZÉNE, F.; PONSIN, G. Multiple abnormalities in the transfer of phospholipids from VLDL and LDL to HDL in non-insulin-dependent diabetes. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.26, p.216-223, 1996.

ETTINGER, W. H.; MILLER, L. D.; ALBERS, J. J.; SMITH, T.K.; PARKS, J. S. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor cause a fall in plasma concentration of lecithin: cholesterol acyltransferase in cynomolgus monkeys. **J. Lipid. Res.**, v.31, p.1099-1107, 1990.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T.; NÈGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R.; DOUSSET, N.; CURATOLA, G. Structural modifications of HDL and functional consequences. **Atherosclerosis**, v. 184, p. 1-7, 2006.

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

GINSBERG, H.; PLUTZKY, J.; SOBEL, B. E. A review of metabolic and cardiovascular effects of oral antidiabetic agents: beyond glucose level lowering. **Journal of Cardiovascular Risk**, v. 6, p. 337-346, 1999.

GINSBURG, G. S.; SMALL, D. M.; ATKINSON, D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters: protein free models of low density lipoprotein. **J. Bio. Chem.**, v. 257, p. 8216-8227, 1982.

GLOMSET, J.A.; NORUM, K.R.; KING, W. Plasma lipoproteins in familial lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency: lipid composition and reactivity in vitro. **J. Clin. Invest. Oct.**, v. 49, p. 1827, 1970.

GOLDMAN, L.; BRAUNWALD, E. **Cardiologia na clínica geral**. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro (RJ): 2000. p. 425-447.

GOTTO A. M. JR; BRINTON, E. A. Assessing low levels of high density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 43, p. 717-724, 2004.

GRANT, P.J. The effects of high- and medium-dose metformin therapy on cardiovascular risk factors in patients with type II diabetes. **Diabetes Care**, v. 19, p. 64-66, 1996.

GROENER, J. E.; KOSTNER, G. M. Lipid transfer protein-catalyzed exchange of cholesteryl ester between high density lipoproteins and apo B-containing lipoproteins. **J. Lipid. Res.**, v. 28, p. 1053-1056, 1987.

GROOP, L.; WIDEN, E.; FRANSSILA-KALLUNKI, A.; EKSTRAND, A.; SALORANTA, C.; SCHALIN, C.; ERIKSSON, J. Different effects of insulin and oral antidiabetic agents on glucose and energy metabolism in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 32, p. 599-605, 1989.

GUERIN, M.; DOLPHIN, P. J.; CHAPMAN, M. J. A new in vitro method for the simultaneous evaluation of cholesteryl ester exchange and mass transfer between HDL and apo B-containing lipoprotein subspecies. Identification of preferential cholesteryl ester acceptors in human plasma. **Arterioscler. Thromb.**, v. 14, p. 199-206, 1994.

GUERIN, M.; DOLPHIN, P. J.; TALUSSOT, C.; GARDETTE, J.; BERTHEZENE, F.; CHAPMAN, M. J. Pravastatin modulates cholesteryl ester transfer from HDL to apo B containing lipoproteins and lipoprotein subspecies profile in familial hypercholesterolemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, p.1359-1368, 1995.

GUERIN, M.; LASSEL, T. S.; LE GOFF, W.; FARNIER, M.; CHAPMAN, M. J. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 189-197, 2000a.

HAMMAD, S. M.; SIEGEL, H. S.; MARKS, H. L. Total cholesterol, total triglycerides, and cholesterol distribution among lipoproteins as predictors of atherosclerosis in selected lines of Japanese quail. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Mol. Integr. Physiol.*, v. 119, p. 485-492, 1998.

HANSEL, B.; GIRAL, P.; NOBECOURT, E.; CHANTEPIE, S.; BRUCKERT, E.; CHAPMAN, M. J.; KONTUSH, A. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 4963-971, 2004.

HAVEL, R. J.; KANE, J. P. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; et al. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. McGraw-Hill. New York (NY): 7th ed.(2), 1995. p. 1841-1851.

HEDRICK, C. C.; THORPE, S. R.; FU, M. X.; HARPER, C. M.; YOO, J.; KIM, S. M.; WONG, H.; PETERS, A.L. Glycation impairs high-density lipoprotein function. **Diabetologia.**, v. 43, p. 312-320, 2000.

HIRATA, R.D.; HIRATA, M.H.; MESQUITA, C.H.; CESAR, T.B.; MARANHÃO, R.C. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. **Biochim. Biophys Acta.**, v. 1439, p. 53, 1999.

HSUEH, W. A.; LAW, R. E. Diabetes is a vascular disease. **J. Investig. Med.**, v. 46, p. 387-390, 1998.

HUUSKONEN, J.; OLKKONEN, V. M.; JAUHAINEN, M.; EHNHOLM, C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. **Atherosclerosis**, v. 155, p. 269-281, 2001.

JABER, L. A; NOWAK, S. N; SLAUGHTER, R. R. Insulin-metformin combination therapy in obese patients with type 2 diabetes. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 89-94, 2002.

JIA, L.; LONG, S.; FU, M.; YAN, B.; TIAN, Y.; XU, Y.; GOU, L. Relationship between total cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol ratio, triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio, and high-density lipoprotein subclasses. **Metabolism**, v. 55, p. 1141-1148, 2006.

JONAS, A. Lecithin cholesterol acyltransferase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1529, p. 245-256, 2000.

JONES, R. J.; OWENS, D.; BRENNAN, C.; COLLINS, P. B.; JOHNSON, A. H.; TOMKIN, G. H. Increased esterification of cholesterol and transfer of cholesteryl ester to apo-B-containing lipoproteins in type 2 diabetes : relationship to serum lipoproteins A-I and A-II. **Atherosclerosis**, v.; 119, p. 151-157, 1996.

KANNEL, W. B.; MAGEE, D. I. Diabetes and glucose tolerance as risk factors for cardiovascular disease. The Framingham Study. **Diabetes Care**, v. 2, p. 120-126, 1979.

KARLSSON, H.; LEANDERSON, P.; TANGESSON, C.; LINDAHL, M. Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 5, p.1431-1445, 2005.

KONTUSH, A. Apolipoprotein A β : blank sheep in a goog family. **Brian Pathol.**, v. 14, p. 433-447, 2004.

KONTUSH, A.; CHAPMAN, M. J. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation and atherosclerosis. **Pharmacol. Ver.**, v. 58, p. 342-347, 2006.

KOPPAKA, V. Structural studies of discoidal lipoprotein A-I. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, p. 885-893, 2001.

KREISBERG, R. A; OBERMAN, A. Medical management of Hyperlipidemia/dislipidemia. **JCEM.**, v. 88, p. 2445-2461, 2003.

KRENTZ, A. J. Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 5, p. 19-27, 2003.

KWITEROVICH JR., P.O.The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides:a current review. **Am. J. Cardiol.**, v.86, p. 452, 2000.

LAGROST, L.; DESRUMAUX, C.; MASSON, D.; DECKERT, V.; GAMBERT, P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 9, p. 203-209, 1998.

LAMARCHE, B.; RASHID, S.; LEWIS, G. F. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. **Clin. Chim. Acta.**, v. 286, p.145-161, 1999.

LE GOFF, W.; GUERIN, M.; CHAPMAN, M. J. Pharmacological modulation of cholesteryl ester transfer protein, a new therapeutic target in atherogenic dyslipidemia.**Pharmacol. Ther.**, v. 101, p.17-38, 2004.

LEWIS, G. F.; RADER, D. J. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. **Circ. Res.**, v. 96, p. 1221-1232, 2005.

LIMA, E. S.; MARANHÃO, R. C. Rapid, Simple Laser-Light-Scattering Method for Particle Sizing in Whole Plasma. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 1086-1088, 2004.

LOTTENBERG, A.S.; LOTTENBERG, A. M. P.; NUNES, V. S.; MCPHERSON, R.; QUINTÃO, E. C. R. Plasma cholesterol ester transfer protein concentration, high-density lipoprotein-cholesterol esterification and transfer a test meal are similar in type II diabetics and normal controls. **Atherosclerosis**, v. 127, p. 81-90, 1996.

LUND-KATZ, S.; LIU, L.; THUAHNAI, S. E.; PHILLIPS, M. C. High density lipoprotein structure. **Front. Biosci.**, v. 8, p. 1044-1054, 2003.

LYRA, R.; OLIVEIRA, M.; LINS, D.; CAVALCANTI, N. Prevenção do diabetes mellitus tipo 2. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 239-249, 2006.

MANSON, J. E.; COLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C.; KROLEWSKI, A. S.; ROSNER, B.; ARKY, R. A.; SPEIZER, F. E.; HENNEKENS, C. H. A prospective study of maturity onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. **Arch. Intern. Med.**, v.151, P.1141-1147, 1991.

MARANHÃO, R. C.; CESAR, T. B.; PEDROSO-MARIANI, S. R.; HIRATA, M. H.; MESQUITA, C. H. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion: resembling low density lipoprotein. **Lipids**, v. 28, p. 691-696, 1993.

MARANHÃO, R. C.; ROLAND, I. A.; TOFFOLETTO, O.; RAMIRES, J. A.; GONÇALVES, R. P.; MESQUITA, C. H.; PILEGGI, F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. **Lipids**, v. 32, p. 627-633, 1997.

MARCEL, Y.L.; VEZINA, C.; TENG, B.; SNIDERMAN, A.- Transfer of cholesterol esters between human high density lipoproteins and triglyceride-rich lipoproteins controlled by a plasma protein factor. **Atherosclerosis.**, v. 35, p.127, 1980.

MARON, D. J. The epidemiology of low levels of high density lipoprotein cholesterol in patients with and without coronary artery disease. **Am. J. Cardiol.**, v. 86, p. 11L-14L, 2000.

McENENY, J.; O'KANE, M. J.; MOLES, K. W.; MCMASTER, D.; MERCER, C.; TRIMBLE, E. R.; YOUNG, I. S. Very low density lipoprotein subfractions in type 2 diabetes mellitus: alterations in composition and susceptibility to oxidation. **Diabetologia**, v. 43, p. 485-493, 2000.

NAVAB, M.; ANANTHARAMAIAH, G. M.; READDY, S. T.; HAMA, S.; HOUGH, G.; GRIJALVA, V. R.; WAGNER, A. C.; FRANK, J. S.; DATTA, G.; GARBER, D.; FOGELMAN, A.M. Oral D-4F causes formation of pre- β high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. **Circulation**, V. 109, p. 3215-3220, 2004a.

NAVAB, M.; ANANTHARAMAIAH, G. M.; READDY, S. T.; VAN LETEN, B. J.; ANSELL, B. J.; FONAROW, G. C.; VAHABZADEH, K.; HAMA, S.; HOUGH, G.; KAMRANPOUR, N.; BERLINER, J. A.; LUSIS, A. J.; FOGELMAN, A. M. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidation phospholipids and HDL. **J. Lipid. Res.**, v. 45, p. 993-1007, 2004b.

NOBECOURT, E.; JACQUEMINET, S.; HANSEL, B.; CHANTEPIE, S.; GRIMALDI, A.; CHAPMAN, M. J.; KONTUSH, A. Defective antioxidative activity of small, dense HDL particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycemia. **Diabetologia**, v. 48, p.529-538, 2005.

NORATA, G. D.; PIRILLO, A.; CATAPANO, A. L. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 16, p. 371-386, 2006.

ORAM, J. F. The cholesterol mobilizing transporter ABCA1 as a new therapeutic target for cardiovascular disease. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 12, p. 170-175, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The atlas of heart disease and stroke. Geneva, Switzerland. 2004.

PASSARELLI, M.; SHIMABUKURO, A. F. M.; CATANOZI, S.; NAKANDAKARE, E. R.; ROCHA, J. C.; CARRILHO, A. J.; QUINTÃO, E. C. Diminished rate of mouse peritoneal macrophage cholesterol efflux is not related to the degree of glycation in diabetes mellitus. **Clin. Chim. Acta.**, v. 301, p. 119-134, 2000

PATSCH, J. Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels. **Eur. Heart J.**, v. 19, p.2-6, 1998.

RADER, D. J. High-density lipoproteins and atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 17, p. 62-70, 2002.

RAINS, S. G.; WILSON, G. A.; RICHMOND, W.; ELKELES, R. S. The effect of glibenclamide and metformin on serum lipoproteins in type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 5, p. 653-658, 1988.

RASHID, S.; WATANABE, T.; SAKAUE, T.; LEWIS, G. F. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. **Clin. Biochemistry**, v. 36, p. 421-429, 2003.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1988.

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**, v. 140, p. 71-79, 1998.

ROBERT, A. K. Diabetic dyslipidemia. **Am. J. Cardiol.**, v. 82, p. 67-73, 1998.

ROBINSON, A. C.; BURKE, J.; ROBINSON, S.; JOHNSTON, D. G.; ELKELES, R. S. The effects of metformin on glycemic control and serum lipids in insulin-treated NIDDM patients with suboptimal metabolic control. **Diabetes Care**, v. 21, p. 701-705, 1998.

ROMAN, S. H; HARRIS. M. Management of diabetes mellitus from a public health perspective. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v.26, p. 443-74,1997.

RUBINS, H. B., ROBINS, S. J., COLLINS, D. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. **N. Engl. Med.**, v. 341, p. 410-418, 1999.

SANTAMARINA-FOJO, S.; GONZALEZ-NAVARRO, H.; FREEMAN, L.; WAGNER, E.; NONG, Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism and atherogenesis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, p. 1750-1754, 2004.

SCHLITT, A.; BICKEL, C.; THUMMA, P.; BLANKENBERG, S.; RUPPRECHT, H. J.; MEYER, J.; JIANG, X. C. High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. 1857-1862, 2003.

SEGREST, J. P.; JONES, M. K.; KLON, A. E.; SHELDAHL, C. J.; HELLINGER, M.; DE LOOF, H.; HARVEY, S. C. A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoprotein. **J. Biol Chem.**, v. 274, p. 31755-31758, 1999.

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 Cardiovasc. Méd.**, v. 10, p.843-848, 2000.

SETALA, L. N.; HOLOPAINEN, J. M.; METSO, J.; WIEDMER, S.; YOHANNES, G.; KINNUNEN, P. K. J.; EHNHOLM, C.; JAUHAINEN, M. Interfacial and Lipid Transfer Properties of Human Phospholipid Transfer Protein: Implications for the Transfer Mechanism of Phospholipids. **Biochemistry**, v. 46, p. 1312-1319, 2007.

SHARRETT, A. R.; BALLANTYNE, C. M.; COADY, S. A.; HEISS, G.; SORLIE, P. D.; CATELLIER, D.; PATSCH, W. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoprotein A-I and B, and HDL density subfractions: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **Circulation**, v. 104, p. 1108-1113, 2001.

SMITH, J. D.; LEGOFF, W.; SETTLE, M.; BRUBAKER, G.; WAELDE, C.; HORWITZ, A.; ODA, M. N. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. **Lipid. Res.**, v. 45, p. 635-44, 2004.

SPARKS, D. L.; DAVIDSON, W. S.; LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M. C. Effects of the neutral lipid content of high density lipoprotein on apolipoprotein A-I structure and particle stability. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 26910–26917, 1995.

STEIN, O.; STEIN, Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 178, p. 217-230, 2005.

STROWIG, S. M; VILES-SANTA, M. L; RASKIN, P. Comparison of insulin monotherapy and combination therapy with insulin and metformin or insulin and troglitazone in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, p. 1691-1698, 2002.

SYVANNE, M.; AHOLA, M.; LAHDENPERA, S.; KAHRI, J.; VIRTANEN, K. S.; TASKINEN, M. R. High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. **J. Lipid. Res.**, v. 36, p. 573-582, 1995.

TASKINEN, M. R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. **Diabetologia**, v. 46, p.733-749, 2003.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ECDCDM): Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.20, p.1183–1197, 1997.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ECDCDM): Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.26, p.3160–3167, 2003.

THOMAS P. BERSOT., GUY M. PÉPIN., ROBERT W. MAHLEY. Risk determination of dyslipidemia in populations characterized by low levels of high-density lipoprotein cholesterol. **American Heart Journal**, v.146, p. 1053, 2003.

THOMPSON, G.; DEAN, J., WILSON, P. W. F. Pathophysiology of plasma lipids. In: *Dislipidemia in Clinical Practice*. 2nd ed. Martin Duniz. V. 1, p. 1-25, 2002.

VAN TOL, A. Phospholipid transfer protein. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 13, p. 135–139, 2002.

VON ECKARDSTEIN, A.; NOFER, Jr.; ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis: role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, p. 13-27, 2001.

YKI-JARVINEN, H.; RYYSY, L.; NIKKILA, K.; TULOKAS, T.; VANAMO, R.; HEIKKILA, M. Comparison of bedtime insulin regimens in patients with type 2 diabetes mellitus. A randomized, controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 130, p. 389-396, 1999.

YOUNG, C. E.; KARAS, R. H.; KUVIN, J. T. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease. **Cardiol. Ver.**, v. 12, p. 107-119, 2004.

YUSUF, S.; HAWKEN, S.; OUNPUU, S.; DANS, T.; AVEZUM, A.; LANAS, F.; MCQUEEN, M.; BUDAJ, A.; PAIS, P.; VARIGOS, J.; LISHENG, L.; INTERHEART STUDY INVESTIGATORS. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): casa-control study. **Lancet**, v. 364, p. 934-952, 2004.

WANG, N.; TALL, A. R. Regulation and mechanisms of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular cholesterol efflux. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. 1178-1184, 2003.

WANG, M.; BRIGGS, M. R. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. **Chem. Rev.**, v. 104, p. 119-137, 2004.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p.1047-1053, 2004.

WULFFELE, M. G.; KOOY, A.; LEHERT, P.; BETS, D.; OGTEROP, J. C.; BORGER VAN DER BURG, B.; DONKER, A. J.; STEHOUWER, C. D. Combination of insulin and metformin in the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, p. 2133-2140, 2002.

WULFFELE, M. G.; KOOY, A.; DE ZEEUW, D.; STEHOUWER, C. D.; NSEVOORT, R. T. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. **Journal of Internal Medicine**, v. 256, p. 1-14, 2004.

ZHENG, L.; NUKUNA, B.; BRENNAN, M. L.; SUN, M.; GOORMASTIC, M.; SETTLE, M.; SCHMITT, D.; FU, X.; THOMSON, L.; FOX, P. L.; ISCHIROPOULOS, H.; SMITH, J. D.; KINTER, M.; HAZEN, S. L. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. **J. Clin. Investig.**, v. 114, p. 529-541, 2004.