

Gilson Soares Feitosa Filho

Transferências de lípidos para HDL em pacientes diabéticos tipo 2: efeito da presença da microalbuminúria e do tratamento com estatina e insulina

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

Área de concentração: Cardiologia Clínica
Orientador: Prof. Dr. José Antônio F. Ramires

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Feitosa Filho, Gilson Soares

Transferências de lípidos para HDL em pacientes diabéticos tipo 2 : efeito da presença da microalbuminúria e do tratamento com estatina e insulina / Gilson Soares Feitosa Filho. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientador: José Antônio Franchini Ramires.

Descritores: 1.Colesterol HDL 2.Lipoproteínas 3.Diabetes mellitus tipo 2
4.Insulina 5.Inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutases 6.Albuminúria
7. Nefropatias diabéticas

USP/FM/SBD-035/08

DEDICATÓRIA

A Deus, que está comigo onde quer que eu esteja.

A minha esposa, Dra. Alina Feitosa, por tornar a minha vida ainda mais feliz.

A meu pai, Prof. Dr. Gilson Feitosa, eterno professor, que me ensina em todos os minutos de sua vida pelo próprio exemplo.

A minha mãe, Sra. Ana Lúcia Feitosa, pela presença e dedicação à família e pelo incentivo a crescer sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Antônio F. Ramires, cujas orientações foram fundamentais ao meu crescimento científico e profissional e à conclusão desta tese.

Ao Prof. Dr. Raul Maranhão, por apresentar-me ao fascinante mundo da pesquisa básica, pelo incentivo e pela amizade.

Aos meus irmãos, Dra. Luciana Feitosa e Dr. Gustavo Feitosa, companheiros de todas as horas, pelo apoio incondicional.

Aos meus cunhados, Dr. Victor Seabra, Fta. Cristiane Feitosa e Dra. Soraia Rodrigues, novos integrantes da minha família.

À amiga Talita Seydell e demais amigos do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, pela paciência com o “Clínico” menos habilidoso com as pipetas.

Aos amigos Dr. João Falcão e Dra. Sandra Falcão, por compartilharem preocupações e alegrias em cada etapa, desde a época da residência.

Ao Sr. Manoel Lima-Neto, meu tio de coração, por saudavelmente tirar-me da minha rotina em São Paulo.

À Profa Maria Eunice Castro, por ser sempre tão solícita e pelas correções sempre tão bem-vindas.

Aos colegas do Hospital Santa Izabel, Hospital Aliança e Instituto Cardiopulmonar, pela colaboração e apoio.

Aos pacientes que gentilmente colaboraram e tornaram possível este estudo.

“A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo”.

Nelson Mandela

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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 Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Resumo

Summary

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. A Composição das Lipoproteínas	13
1.2. A HDL	15
1.3. Tamanho da HDL	16
1.4. Transferência de Lípidos entre Lipoproteínas	17
1.5. Características Lipídicas do Diabetes Mellitus tipo 2	19
1.6. A HDL do Diabetes Mellitus	19
1.7. Microalbuminúria e Aterosclerose	20
1.8. Efeitos do tratamento com Estatina e/ou Insulina	22
1.9. A LDE como Ferramenta de Investigação	23
2. OBJETIVOS	24
3. MÉTODOS	25
3.1. Casuística	25
3.2. Determinações bioquímicas séricas	26
3.3. Tamanho da partícula da HDL	27
3.4. Preparo da LDE	28
3.5. Transferência de colesterol livre, colesterol éster, triglicérides e fosfolípidos da LDE para HDL	29
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5. RESULTADOS	32
6. DISCUSSÃO	34
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	38
8. CONCLUSÕES	39
9. TABELAS E FIGURAS	40
10. REFERÊNCIAS	50

RESUMO

Feitosa-Filho, GS. *Transferências de lipídes para HDL em pacientes diabéticos tipo 2: efeito da presença da microalbuminúria e do tratamento com estatina e insulina*. São Paulo, 2008. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Instituto do Coração – InCor.

INTRODUÇÃO: Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um fator de risco isolado para coronariopatia, principalmente quando associado à microalbuminúria (MA). Alterações estruturais e funcionais das lipoproteínas não são totalmente esclarecidas nesse contexto. **OBJETIVO:** Avaliar, em pacientes DM2, a influência da presença da MA e do tratamento com estatina ou insulina nas transferências para HDL (T) de lipídes e no tamanho desta lipoproteína. **MÉTODOS:** Estudamos 33 pacientes DM2 e 34 controles pareados para idade. Uma nanoemulsão lipídica artificial radiomarcada com ³H-Triglicéride (TG) e ¹⁴C-Colesterol Livre (CL) ou ³H-Colesterol Éster (CE) e ¹⁴C-Fosfolípide (FL) foi incubada com plasma. A nanoemulsão e as lipoproteínas foram precipitadas, exceto a HDL, que teve sua radioatividade contada. O diâmetro da HDL foi mensurado por método de dispersão da luz. **RESULTADOS:** A TFL (%) foi maior no grupo com DM2 que no grupo controle (25,2±3,2 e 19,7±3,2 respectivamente; p<0,001), assim como a TCL (%) : 9,1±2,7 e 6,3±1,5 respectivamente; p<0,001. O diagnóstico de MA não se associou às mudanças da propriedade de transferência. O uso da insulina associou-se à menor TFL(%): 23,5±2,1 contra 26,1±3,3; p=0,018. Já o uso da estatina associou-se à queda de todas: TCE(%): 3,5±0,9; TFL(%):23,8±2,0; TTG(%): 3,9±0,8; TCL(%):7,4±1,3 quando comparado ao grupo que não usava estatina (TCE(%):5,9±2,4; TFL(%):26,9±3,6; TTG(%):6,4±2,2; TCL(%):11,1±2,6). O tamanho de HDL foi semelhante em qualquer condição analisada. **CONCLUSÕES:** DM2 aumenta a transferência de lipídes de superfície para HDL, enquanto o uso de estatina diminuiu todas as transferências. A presença de MA não se associou às alterações das transferências de lipídes.

Descritores: Colesterol HDL, Lipoproteínas, Diabetes mellitus tipo 2, Insulina, Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA redutase, Albuminúria, Nefropatias Diabéticas

SUMMARY

Feitosa-Filho, GS. *Lipids transfer to HDL in type 2 diabetic patients: effect of the presence of microalbuminuria and of treatment with statin and insulin*. São Paulo, 2008. University of São Paulo Medical School. Heart Institute – InCor.

INTRODUCTION: Type 2 diabetes mellitus (DM2) is an isolated risk factor for coronary artery disease, especially when associated to microalbuminuria (MA). Structural and functional alterations of lipoproteins are not well known in this context. **OBJECTIVE:** To evaluate, in DM2 patients, the influence both of MA and the treatment with statins or insulin on the lipids transfer to HDL (T) and on the size of this lipoprotein. **METHODS:** We studied 33 DM2 patients and 34 controls paired for age. An artificial lipidic nanoemulsion radio labeled with ^3H -Triglyceride (TG) and ^{14}C -Free Cholesterol (FC) or ^3H -Cholesterol Ester (CE) and ^{14}C -Phospholipid (PL) was incubated with plasma. The nanoemulsion and the lipoproteins were precipitated, except for HDL, that had its radioactivity measured. The HDL diameter was measured by laser light scattering method. **RESULTS:** The TPL (%) was greater in the DM2 group than in the control group ($25,2\pm 3,2$ and $19,7\pm 3,2$ respectively; $p < 0,001$), as well as TFC (%): $9,1\pm 2,7$ and $6,3\pm 1,5$ respectively; $p < 0,001$. The MA did not affect the transfer. Insulinotherapy was associated with less TPL(%): $23,5\pm 2,1$ against $26,1\pm 3,3$; $p = 0,018$, and the statin therapy with less transfer of all lipids: TCE(%): $3,5\pm 0,9$; TPL(%): $23,8\pm 2,0$; TTG(%): $3,9\pm 0,8$; TFC(%): $7,4\pm 1,3$ when compared to the group that did not use statin: TCE(%): $5,9\pm 2,4$; TPL(%): $26,9\pm 3,6$; TTG(%): $6,4\pm 2,2$; TFC(%): $11,1\pm 2,6$. The HDL size was about the same under all the circumstances analyzed. **CONCLUSIONS:** DM2 is associated with greater transfer of superficial lipids to HDL, while the statin usage was associated with a smaller transfer of all lipids. The MA diagnosis was not associated with any change in lipids transfer.

Keywords: HDL Cholesterol, Lipoproteins, Type 2 Diabetes mellitus, Insulin, Hidroximetilglutaril-CoA reductase inhibitors, Albuminuria, Diabetic nephropathies

LISTA DE SIGLAS

Apo	Apolipoproteína
CETP	Proteína de Transferência de Colesterol Éster
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermediária
LCAT	Lecitina-colesterol Aciltransferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
Lpa	Lipoproteína a
MA	Microalbuminúria
PLTP	Proteína de Transferência de Fosfolípidos
TCE	Transferência de Colesterol Éster para HDL
TCL	Transferência de Colesterol Livre para HDL
TFL	Transferência de Fosfolípide para HDL
TG	Triglicérides
TTG	Transferência de Triglicérides para HDL
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL em DM	40
Tabela 2 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL em DM	41
Tabela 3 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL em DM	42
Tabela 4 - Associações da microalbuminúria com idade, perfil lipídico, controle glicêmico, dados antropométricos e transferências de lipídios da LDE para HDL	43
Tabela 5 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL entre diabéticos quanto ao uso de insulina	44
Tabela 6 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL entre diabéticos quanto ao uso de estatina	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de uma lipoproteína	14
Figura 2 - Comparação das transferências de lípidos entre diabéticos e não-diabéticos	46
Figura 3 - Comparação de transferências de lípidos entre diabéticos com e sem microalbuminúria	47
Figura 4 - Comparação de transferências de lípidos entre diabéticos usuários e não usuários de insulino-terapia	48
Figura 5 - Comparação de transferências de lípidos entre diabéticos usuários e não usuários de estatina	49

1. INTRODUÇÃO

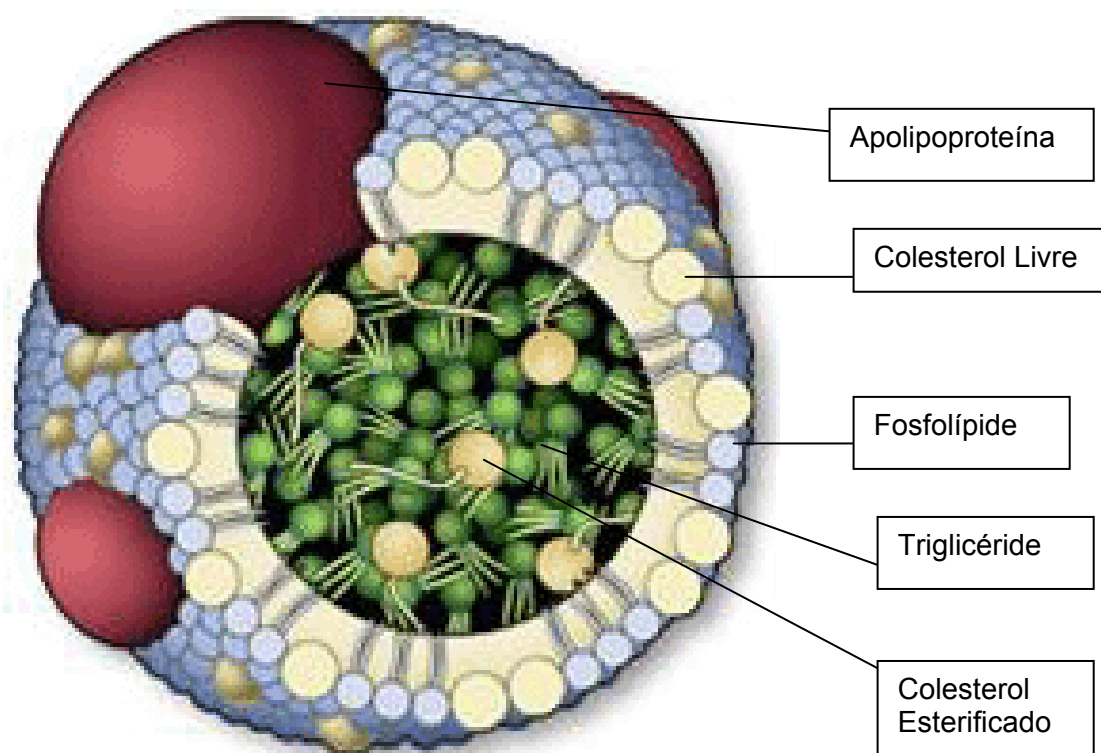
1.1. A composição das Lipoproteínas

Os lípides do corpo humano, representados principalmente por triglicérides, fosfolípidos e colesterol, são insolúveis em meio aquoso. Seu transporte, através da circulação, só é possível por intermédio de lipoproteínas, como as VLDL, IDL, LDL e HDL.

Por sua vez, as lipoproteínas são classificadas, geralmente, de acordo com a sua densidade, que é determinada, principalmente, pela quantidade de triglicérides (que torna as partículas menos densas) e apolipoproteínas (que as torna mais densas). Os quilomícrons, as lipoproteínas menos densas, são encontradas normalmente no sangue de indivíduos apenas em período pós-prandial.

Em diferentes proporções, a depender da classe e subclasse, as lipoproteínas são constituídas por: A) triglicérides e colesterol esterificado em seu interior, formando um núcleo hidrofóbico; B) fosfolípidos e colesterol livre em sua superfície anfipática; e C) apolipoproteínas que desempenham distintas funções.

Figura 1 - Estrutura básica de uma Lipoproteína



O perfil lipídico de um indivíduo costuma ser determinado a partir de quanto colesterol cada lipoproteína (HDL, LDL e VLDL) está transportando. Para tanto, mensura-se o colesterol total da amostra sanguínea, que após adequado jejum de 12 a 14 horas, é o resultado da soma do colesterol presente na VLDL, LDL e HDL.

A partir da medida total de triglicérides pode-se estimar a quantidade de colesterol transportado pela VLDL: $Colesterol\ de\ VLDL = Triglicérides / 5$ (em mg/dL). Esta medida é válida desde que a concentração de triglicérides seja menor que 400mg/dL. Ao mesmo tempo, também é possível precipitar-se a fração de HDL e, com isso, saber-se quanto do colesterol total é transportado pela HDL.

Desse modo, de posse do colesterol total, do colesterol presente na VLDL, do colesterol presente na HDL, com boa acurácia, estima-se o valor de colesterol presente na LDL, utilizando-se para isso a fórmula de Friedewald¹: *Colesterol de LDL = Colesterol total – (colesterol de HDL + triglicérides/5) (em mg/dL).*

Existe uma importante relação direta entre colesterol total e doenças cardiovasculares, que é considerada mais significativa em se tratando do LDL-colesterol. Por outro lado, entre HDL-colesterol e aterosclerose o que se observa é uma relação inversa.

1.2. A HDL

A apo A-I é responsável por 70% do conteúdo protéico da HDL². As outras apolipoproteínas incluem apo A-II, apo A-IV, apo C-I, apo C-III e apo E. A composição lipídica da HDL é comum a todas as lipoproteínas. A quantidade de triglicérides, no entanto, é pequena, e a proporção de colesterol pode ser tanto maior quanto formas mais maduras de HDL estejam representadas.

Somente a HDL apresenta atividade anti-aterosclerótica, e o mecanismo pelo qual exerce este papel ainda não é bem compreendido. O transporte reverso, que desempenha relevante função na homeostasia do colesterol, é o principal mecanismo aventado^{3, 4}. No entanto, outros

mecanismos como ações anti-inflamatórias, anti-trombóticas e anti-oxidativas^{5,6}, também lhe são atribuídos.

A atividade de transporte reverso de colesterol ocorre quando este é carregado dos tecidos, ou de outras lipoproteínas aterogênicas, em direção ao fígado, órgão no qual pode ser reaproveitado ou excretado pela bile.

A HDL é secretada pelo fígado e intestino na forma de partículas discóides nascentes que, progressivamente, tornam-se globóides à medida que recebem lípidos das células e de outras lipoproteínas. Apresenta como importante característica a atividade de esterificação de colesterol, o que permite a internalização do mesmo para o núcleo hidrofóbico da lipoproteína.

Essa esterificação acontece graças à sua constituição, com a lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), que usa como cofator a apo A-I presente na HDL. A LCAT catalisa a esterificação do colesterol acrescentando um ácido graxo de cadeia longa, usualmente o ácido oléico. Assim, o colesterol perde sua propriedade anfipática e torna-se hidrofóbico. Isso estabiliza o “pool” de colesterol, protegendo as artérias da eluição de colesterol livre da superfície das lipoproteínas.

1.3. Tamanho da HDL

A classe de lipoproteínas HDL divide-se, tendo com base o seu tamanho, em 3 subclasses distintas: HDL nascente (pré-B-HDL); HDL₃; e

HDL₂ (esta última a maior e menos densa). Vários estudos mostram que o tamanho médio da HDL de pessoas saudáveis varia de 8,4 a 9,6 nm⁷⁻⁹.

A primeira delas, a HDL nascente, dará origem às subclasses seguintes. Sintetizada no fígado e no intestino, inicialmente como uma apo A-I que adquire uma camada de fosfolípidos de maneira não bem compreendida, esta partícula discóide recebe, avidamente, colesterol livre das membranas celulares e de outras lipoproteínas. As diferenças no tamanho da HDL dependem, basicamente, do número de moléculas de apoproteínas presentes na superfície da partícula, bem como da quantidade de ésteres de colesterol em seu núcleo^{10, 11}.

A proteína de transferência de colesterol éster (CETP) e a lipase lipoprotéica estimulam a formação de HDL pequenas, enquanto a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) favorece a formação de HDL maiores¹². Existem evidências de que o maior efeito cardioprotetor está ligado às partículas maiores de HDL^{13, 14, 15}.

1.4. Transferência de Lípidos entre Lipoproteínas

As lipoproteínas plasmáticas trocam lípidos e apoproteínas constantemente, processo que é facilitado pelas proteínas de transferência, particularmente a PLTP e a CETP.

Além de mediar a troca de moléculas de colesterol éster e triglicérides entre as lipoproteínas, a CETP também auxilia na transferência de

fosfolípidos para a HDL¹⁶, estando sua atividade correlacionada diretamente com os níveis de LDL-colesterol, e inversamente com os níveis de HDL-colesterol.

A hipertrigliceridemia é outra situação clara onde a transferência lipídica pode afetar o metabolismo das lipoproteínas. Com o aumento de partículas de VLDL, por mecanismo de ação de massa na atividade da CETP, uma quantidade maior de colesterol éster é transferida da HDL para a VLDL, resultando numa instabilidade das partículas da HDL, que apresentam, assim, importante redução na sua concentração plasmática.

Já a PLTP auxilia na transferência de fosfolípidos e colesterol de lipoproteínas ricas em triglicérides, como quilomícrons e VLDL, para a HDL^{17, 18}.

Apesar da ação das proteínas de transferência, as atividades aceptora e doadora de lípidos também dependem de vários outros fatores. É possível que a concentração de cada classe e subclasse de lipoproteína influencie nessas trocas, uma vez que as mesmas podem ser dependentes das colisões entre lipoproteínas e, por isso, o efeito de massa venha a ter relevante participação. A própria estrutura, juntamente com as composições lipídica e protéica da partícula podem influenciar na sua fluibilidade, e assim, agir neste complexo mecanismo de trocas. De igual modo, também a concentração de diversas outras proteínas plasmáticas pode interferir nas transferências lipídicas.

Essa complexa relação entre transferência de lípidos e aterogênese ainda não se encontra totalmente esclarecida. Diante disso, a função da

HDL pode ser importantemente dependente da sua propriedade de transferência de lípidos.

1.5. Características Lipídicas do Diabetes Mellitus tipo 2

O diabetes mellitus é um dos mais importantes fatores de risco cardiovascular, sendo a aterosclerose responsável pela grande maioria das mortes nesta população.

No caso específico do diabetes mellitus tipo 2, observa-se uma típica associação às alterações de perfil lipídico caracterizadas por hipertrigliceridemia, HDL colesterol reduzido, e aumento da subfração pequena e densa da LDL de composição alterada¹⁹⁻²¹. A resistência à insulina resulta em diminuição do catabolismo dos quilomícrons e VLDL, assim como em excessiva produção hepática de triglicérides e VLDL²².

E como afirmam Reaven²³ e Niskanen²⁴, alterações da densidade, oxidabilidade e glicação tornam a LDL do diabético muito mais aterogênica.

1.6. A HDL do Diabetes Mellitus

Níveis diminuídos de HDL no diabetes mellitus resultam da diminuição da produção e do aumento do catabolismo da HDL, estando intimamente relacionados ao metabolismo anormal das lipoproteínas ricas em

triglicérides^{25, 26}. A síntese de HDL diminuída está relacionada à atividade diminuída da lipase lipoprotéica. Quando o metabolismo das VLDL mediado pela lipase lipoprotéica é insuficiente, menos fosfolípidos são transferidos para a HDL, prejudicando a formação de novas partículas.

No diabetes mellitus também pode ocorrer o catabolismo aumentado das HDL's, devido à aumentada concentração de VLDL no plasma, promovendo uma maior troca de triglicérides destas lipoproteínas em troca de colesterol éster. A HDL, uma vez enriquecida com triglicérides, torna-se mais susceptível à ação da lipase hepática, aumentando conseqüentemente seu catabolismo^{26, 27}.

1.7. Microalbuminúria e Aterosclerose

A presença de microalbuminúria em pacientes diabéticos os tornam com maior risco de desenvolverem doença arterial coronária²⁸⁻³⁰. Além disso, tem sido apontada como preditor independente de morbi-mortalidade cardiovascular tanto em diabéticos tipo 1 como tipo 2^{28, 29, 31-33}. Ela pode ser encontrada entre 20 a 30% dos diabéticos não insulino-dependentes³⁴⁻⁴⁰, em 5 a 25% dos hipertensos⁴¹⁻⁴⁴, e em 5 a 10% dos indivíduos não-hipertensos não-diabéticos⁴²⁻⁴⁴. A microalbuminúria está associada a níveis significativamente mais altos de LDL, VLDL⁴⁵ e Lpa⁴⁶, além de níveis menores de HDL⁴⁷.

O rastreamento de microalbuminúria pode ser feito por três métodos:

1) Mensuração da relação albumina/creatinina em uma amostra urinária (método de preferência)⁴⁸⁻⁵⁰; 2) Coleta de 24 horas; e 3) Coleta com tempo marcado (por exemplo: coleta durante 4h ou durante a noite). Fatores como exercício, febre, infecção, menstruação, insuficiência cardíaca, importante hipertensão e importante hiperglicemia podem elevar transitoriamente a excreção urinária de albumina.

O uso da razão da albuminúria (em mg) pela creatininúria (em g), em amostra isolada, é tido como o método de mensuração menos sujeito a erros de coleta. Correlaciona-se importantemente com a coleta de 24h, sobretudo quando utilizada a primeira amostra da manhã. Tem sido considerado método ideal para investigação diagnóstica. Pacientes com uma razão inferior a 30mg/g são considerados normais, enquanto define-se microalbuminúria com valores entre 30 e 300mg/g.

Quadro 1: Definição de micro e macroalbuminúria (ADA)

<i>Categoria</i>	<i>Relação Albumina/Creatinina Urinárias</i>
Normal	< 30 mcg/mg
Microalbuminúria	30 a 299 mcg/mg
Macroalbuminúria	≥ 300mcg/mg

1.8. Efeitos do tratamento com Estatina e/ou Insulina

As estatinas agem inibindo a hidroximetilglutaril coenzima A redutase, inibindo a síntese de colesterol pelo fígado, com um aumento compensatório da expressão dos receptores hepáticos de LDL. Seu efeito final é uma redução de 27 a 55% do LDL-colesterol, redução em 7 a 28% de triglicérides e aumento discreto (2 a 10%) de HDL-colesterol⁵¹.

Os ensaios clínicos comparando terapia com estatina contra placebo em pacientes diabéticos tipo 2 mostram que, independentemente da presença de doença cardiovascular, o uso intensivo de estatinas é capaz de reduzir importante o risco de eventos cardiovasculares⁵²⁻⁵⁷.

No diabetes mellitus tipo 2, a insulina é usada quando um controle glicêmico adequado não é possível de ser atingido com antidiabéticos orais, ou ainda, devido à falência pancreática secundária. A insulina habitualmente usada é a recombinante humana e tem ação nos receptores específicos celulares, permitindo a entrada de glicose para o interior celular e, conseqüentemente, melhorando o controle glicêmico. Pacientes que se mantêm por períodos mais prolongados com glicemias controladas, o que pode ser atestado pela hemoglobina glicada, tendem a apresentar um controle lipídico mais próximo ao ideal, com efeito principalmente na redução de triglicérides.

Assim como a hiperglicemia desempenha papel importante na promoção de anormalidades qualitativas nas lipoproteínas dos diabéticos (glicando as lipoproteínas, por exemplo), a forma subcutânea de

administração da insulina, causando hiperinsulinemia periférica, também interfere com a qualidade das lipoproteínas. Administração intraperitoneal, mimetizando secreção fisiológica de insulina é capaz de restaurar atividade de CETP, da lipase lipoprotéica, diminuir conteúdo de triglicérides das LDL e HDL, e normalizar razão HDL_2/HDL_3 ^{58, 59}.

1.9. A LDE como Ferramenta de Investigação

Em estudos prévios, o Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração (InCor-HCFMUSP) tem reproduzido o metabolismo da LDL através de uma emulsão feita artificialmente, com composição lipídica parecida com a da LDL natural (LDE)⁶⁰. O objetivo principal desses estudos tem sido o uso da LDE na investigação das dislipidemias. A LDE não tem proteína, mas ao ser administrada na circulação, em contato com as lipoproteínas naturais, adquire apo E, que pode ser reconhecida pelo receptor da LDL, sendo assim captada pela célula⁶⁰. É importante ressaltar que a LDL natural não possui apo E, ligando-se ao receptor através da sua única proteína, a apo B-100. 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 específico⁶¹. No entanto, por surpreendente que isto possa parecer, a partícula artificial LDE tem mais afinidade pelos receptores da LDL do que a própria LDL natural⁶².

2. OBJETIVOS

Avaliar em pacientes diabéticos tipo 2, a influência da presença da microalbuminúria e do tratamento com estatina ou insulina nas transferências de lípidos para HDL e no tamanho desta lipoproteína.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Trinta e três pacientes voluntários portadores de diabetes mellitus tipo 2 foram selecionados do Ambulatório do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC-FMUSP) e do Ambulatório de Diabetes do Serviço de Diabetes da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Foram excluídos indivíduos em uso de inibidores de proteases, drogas imunossupressoras, corticóides, transplantados, cirróticos, portadores de neoplasias, tireoidopatas e portadores de creatinina sérica $> 1,5$ mg/dL. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento pós-informado. As coletas de sangue e de urina foram feitas no Laboratório de Metabolismo de Lípides no InCor. Os ensaios funcionais da HDL (transferência de lípidos e tamanho) foram realizados nesse mesmo laboratório. As amostras urinárias foram analisadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP) e as amostras de sangue tiveram as determinações bioquímicas realizadas no Laboratório do InCor.

Como grupo controle foram selecionados 34 indivíduos que fazem parte de um banco de dados do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, pareados para idade. Estes indivíduos não apresentam comorbidades e não

fazem uso de medicações. Deste grupo foram excluídos todos os indivíduos que tivessem glicemia de jejum maior ou igual a 100mg/dL.

A avaliação dos participantes foi feita através de história clínica, enfatizando-se a busca de antecedentes patológicos e medicações em uso. A avaliação laboratorial foi feita através de coleta de sangue em apenas um dia e duas ou três coletas de amostra urinária em dias diferentes para mensuração da relação de microalbuminúria/creatininúria.

3.2. Determinações bioquímicas séricas

Foram realizadas as determinações bioquímicas dos pacientes diabéticos e indivíduos controle do colesterol total (CT), frações (VLDL, LDL e HDL), triglicérides (TG) e glicemia de jejum em amostras de soro, obtidas após 12 horas de jejum pelo método colorimétrico-enzimático, COD-PAD (Labtest).

O colesterol de LDL foi determinado pela fórmula de Friedewald – $LDLc = CT - (VLDLc + HDLc)$ –, em mg/dL, onde o VLDLc é obtido pela divisão da concentração dos triglicérides dividido por 5.

Para a determinação da hemoglobina glicada foi utilizado sangue total, pelo método imunoturbimétrico no laboratório de análises clínicas do InCor-HC-FMUSP.

A determinação da microalbuminúria foi feita na primeira amostra isolada de urina da manhã, através do método de nefelometria, no

Laboratório Central do Hospital das Clínicas. Na mesma amostra era mensurada a creatinina urinária. Assim, o valor da relação albumina/creatinina urinária era expresso em mcg/mg de creatinina. Pacientes com relação albuminúria/creatininúria inferior a 30mcg/mg eram considerados normais, enquanto microalbuminúria foi definida como valores entre 30 e 300mcg/mg, conforme descrição da literatura. Em dias diferentes eram coletadas duas amostras urinárias, fora de período menstrual nas mulheres e em pacientes sem sintomas de infecção urinária. Caso os resultados das duas coletas não fossem concordantes, uma terceira coleta era solicitada.

3.3. Tamanho da partícula da HDL

O tamanho da partícula da HDL foi medido segundo a técnica descrita por Lima e Maranhão⁹. Após jejum de 12 horas, amostras do soro dos pacientes foram coletadas em tubo contendo EDTA, sendo o plasma obtido após 10 minutos de centrifugação, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. A fração HDL foi separada do plasma por precipitação química das frações contendo apo B (VLDL, LDL), utilizando-se uma solução de polietilenoglicol (PEG) 8000 (400 g/L), na proporção, plasma/precipitante, 1:1 (v/v). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em uma solução de NaCl 10mmol/L e filtrado através de um filtro millipore[®] 0,22 μ . O diâmetro da HDL (nm) foi obtido por espalhamento de luz, coletada em um ângulo de 90°, utilizando o

equipamento Laser Light Scattering (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp., USA) e o software Big Particle Sizing, versão 2.34 (Brookhaven Instr. Corp., Holtsville, NY, USA). O resultado foi expresso em média \pm desvio padrão obtido após 5 leituras de 2 minutos cada.

3.4. Preparo da LDE

A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg⁶³ e modificada por Maranhão e col.⁶⁰. Em um frasco foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de éster de colesterol, 1,0 mg de trioléina e 0,5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio/metanol (2:1). Posteriormente, foram adicionados 70 kBq de ³H-colesterol éster e 70kBq de ¹⁴C-fosfatidilcolina, ou 70 kBq de ³H-triglicérides e 70kBq de ¹⁴C-colesterol. Em seguida, a mistura foi secada sob fluxo de nitrogênio, em banho-maria 37°C, e mantida em dessecador a vácuo por 16 horas, a 4°C, para remoção dos solventes residuais. A mistura de lipídios ressuspensa com tampão-tris HCl foi emulsificada por irradiação ultra-sônica de 125 watts de potência durante 3 horas, sob uma atmosfera de nitrogênio com temperatura variando de 51 a 55°C. Por fim, a nanoemulsão, purificada por duas etapas de ultracentrifugação, foi esterilizada através de passagem em filtro Millipore® 0,22 μ m de diâmetro.

O procedimento de preparo das nanoemulsões foi realizado em capela de fluxo laminar. Todo o material utilizado foi esterilizado em autoclave 120°C, e despirogenizado em estufa 180°C durante 90 minutos.

3.5. Transferência de colesterol livre, colesterol éster, triglicérides e fosfolípides da LDE para HDL

Amostras dos pacientes foram coletadas, após jejum de 12 horas, em EDTA (1,5g/L) e o plasma foi obtido após 10 minutos de centrifugação, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. Foram incubados 50 µL da LDE marcada radiativamente com ³H-colesterol éster (³H-CE) e ¹⁴C-fosfatidilcolina (¹⁴C-PL), ou ³H-triglicérides (³H-TG) e ¹⁴C-colesterol livre (¹⁴C-CL) com 200 µL de plasma por 60 minutos, a 37°C, em agitador orbital Gyromax 706R, sob agitação de 40 rpm. Após incubação foram adicionados à mistura 250 µL de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2%/ MgCl₂ 3M, v/v). A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. A fração HDL foi obtida após precipitação da nanoemulsão, juntamente com as lipoproteínas contendo apo B, com 250 µL dextran/MgCl₂ (0,2% Dextran e 0,3mol/L MgCl₂). Alíquotas de 250 µL do sobrenadante, contendo a HDL, foram pipetadas em frascos de cintilação. Foram acrescentados a esses frascos, 5,0 mL de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA) e, finalmente, a radioatividade presente nas amostras foi quantificada

em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA) com a utilização do software Plus Vers. 5.01 da Diamond Computers, para determinação das contagens de ^{14}C e ^3H das amostras. O branco para este experimento consiste da mistura de 200 μL de solução tampão TRIS-HCl e 50 μL de LDE, incubada e precipitada nas mesmas condições descritas acima. O valor de radioatividade total presente na amostra foi determinado pela incubação de 200 μL de plasma com 50 μL de LDE, seguida de incubação, porém sem adição de reagente de precipitação. A quantificação dos lipídeos transferidos da LDE para HDL plasmática foi expressa como percentagem (%) em relação à radioatividade total incubada.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows* versão 13.0. As variáveis contínuas foram expressas em médias e desvios-padrão. As variáveis categóricas foram expressas em valores percentuais e absolutos.

Para testar a normalidade da distribuição das variáveis, foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Como as variáveis apresentavam distribuição não normal, foram utilizados testes não paramétricos.

Para avaliar a diferença entre as variáveis categóricas foram utilizados o teste exato de Fisher ou teste do qui-quadrado.

Foram comparados os diabéticos e seus controles subdividindo-se o grupo de diabéticos conforme a presença de microalbuminúria, o uso de estatina e o uso de insulina. As comparações de variáveis contínuas independentes foram realizadas através do teste de Mann-Whitney. Comparações entre variáveis categóricas foram feitas através do teste do qui-quadrado.

Para testar associações utilizou-se o teste não-paramétrico de Spearman. Foram considerados como estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, bicaudal.

5. RESULTADOS

Foram estudados 33 pacientes diabéticos tipo 2, com idade média de 55 anos, e comparados a 34 indivíduos controles com faixa etária semelhante. As características de ambos os grupos estão representadas na tabela 1. As transferências de fosfolípides e colesterol livre foram significativamente maiores no grupo com DM2 (tabela 1 e figura 2).

Entre os pacientes diabéticos, foram analisadas as características antropométricas e lipídicas quanto à presença ou não de MA (tabela 2 e figura 2). Os dois grupos tinham uma diferença significativa quanto à idade. O grupo com MA tinha uma média de idade significativamente maior que o grupo sem esta característica. Nenhuma outra característica era diferente.

Comparando o mesmo grupo com MA com os pacientes sem MA com idade superior a 55 anos, permitiu-se uma comparação entre grupos com idade semelhante. Mais uma vez não houve qualquer diferença no tamanho da HDL ou em sua atividade aceptora de lípidos (tabela 3).

Utilizando a razão microalbuminúria/creatininúria como variável contínua, foi possível estabelecer a Correlação de Spearman com todas as variáveis contínuas analisadas. Desse modo, uma maior razão MA/Creatininúria se correlacionou positivamente com idade e hemoglobina glicada, e negativamente com transferência de colesterol livre (tabela 4).

Quanto ao uso ou não de insulino terapia, os 2 grupos apresentavam características semelhantes de dados antropométricos e perfil bioquímico

laboratorial. O fato de usar insulina relacionou-se apenas com uma menor transferência de fosfolípide para HDL (tabela 5 e figura 3).

Tratando-se do uso ou não de estatina, percebeu-se que o grupo tratado com estatina apresentou uma transferência de todos os lípidos para HDL menor que o grupo que não usava estatina (tabela 6 e figura 4).

Não foi notada qualquer diferença no tamanho médio das partículas de HDL quanto à presença de microalbuminúria, uso de insulina ou estatina.

6. DISCUSSÃO

Historicamente tem sido difícil o estudo do transporte reverso de colesterol e o seu real impacto anti-aterogênico. Não tem sido possível, de forma acurada, mensurar o quanto de lípidos extraídos dos macrófagos é efetivamente eliminado nas fezes após passagem pelo fígado. O estudo do transporte reverso tem sido feito em etapas, com a avaliação da atividade ou massa de cada enzima ou proteína conhecida, ou transporte de um determinado lípido radiomarcado in vitro ou in vivo. Apesar das limitações, muitas tentativas têm sido feitas para estudar o transporte reverso em humanos². Novos métodos incluem o uso de isótopo estável para mensurar o fluxo de colesterol entre HDL e lipoproteínas com apoB⁶⁴.

A contribuição das enzimas e proteínas associadas à HDL ao processo de geração, maturação e transporte reverso de colesterol tem sido extensivamente estudada⁶⁵.

A CETP modula os níveis de HDL e sua composição ao mediar a troca de lípidos neutros (colesterol esterificado e triglicérides) entre HDL e lipoproteínas ricas em triglicérides, além de auxiliar na transferência de fosfolípidos para a HDL. A CETP é capaz também de liberar apolipoproteínas a partir da HDL na presença de ácidos graxos⁶⁶⁻⁶⁸. O próprio PLTP também pode liberar apolipoproteínas da HDL⁶⁹. O colesterol éster presente na HDL pode ter duas fontes: 1) Através da esterificação de

colesterol livre da HDL e 2) A partir de colesterol éster de outra lipoproteína⁷⁰⁻⁷²

A PLTP age transferindo fosfolípidos de superfície para HDL e eventualmente deslocando apo AI das superfícies das partículas^{73, 74}. Um importante produto da HDL mediado pelo PLTP são as pré-B-HDL pequenas e pobres em lípidos, que agem como aceptores iniciais de colesterol livre^{75, 76}. A apo E (e não a apo AI) é capaz de converter PLTP inativa em sua forma ativa⁷⁷. Esta é importante uma característica a ser lembrada, visto que, a LDE é desprovida de apo, e adquire a apo E quando em contato com o sangue.

O presente estudo traz a possibilidade de estimar, através de uma única metodologia, a atividade aceptora da HDL de todos os lípidos de forma simples e ágil. Com isso, foi possível demonstrar que há maior captação de fosfolípidos e colesterol livre pela HDL nos pacientes diabéticos em comparação com indivíduos controles.

O achado de maior transferência de lípidos de superfície nos pacientes diabéticos sugere maior atividade de PLTP, o que está de acordo com alguns resultados da literatura⁷⁸⁻⁸⁰. Estudos prévios mostram também aumento das taxas de transferência de colesterol éster plasmático^{81, 82}.

A relação entre microalbuminúria e dislipidemia em pacientes com diabetes mellitus tem sido bem estudada. Nesses pacientes, a microalbuminúria está associada a níveis significativamente mais elevados de LDL, VLDL⁴⁵ e Lpa⁴⁶, além de níveis menores de HDL⁸³ do que pacientes com as mesmas características porém sem microalbuminúria. Neste estudo,

no entanto, em diabéticos com MA não houve qualquer diferença de transferências de lípidos ou tamanho de partícula de HDL quando comparados aos diabéticos sem MA. Na literatura, há demonstração de aumento da atividade de CETP em pacientes com macroalbuminúria em relação aos pacientes com micro ou normoalbuminúria⁸⁴.

Entre os pacientes usuários de insulina, a transferência de fosfolípidos para HDL foi menor. Entre os outros lípidos, apenas a redução da transferência de colesterol livre se aproximou bastante da relevância estatística. Tanto o colesterol livre como o fosfolípido são lípidos de superfície das lipoproteínas, e sofrem ação da PLTP. Esta proteína é a principal responsável pela transferência de fosfolípidos para a HDL e auxilia apenas modestamente na transferência de colesterol livre para a HDL. O presente estudo sugere, assim, uma possível correlação entre insulina e atividade de PLTP. Na literatura, embora não haja unanimidade, a maioria dos estudos que se propuseram a investigar a relação entre insulina e atividade de PLTP mostram uma inibição desta última⁸⁵⁻⁸⁹.

A estatina reduziu a captação de todos os lípidos pela HDL. A diminuição da atividade de CETP com uso de estatina tem sido observado em outros estudos. Ela pode fazer isso por três mecanismos distintos: 1) Redução da massa de CETP⁹⁰; 2) Redução das lipoproteínas com as quais a HDL interage⁹¹; e 3) Possivelmente por redução na expressão do gene CETP⁹². Um subestudo do estudo DALI mostrou que o tratamento com estatina é capaz de reduzir a atividade de PLTP, embora aumente a massa de PLTP⁹³.

O tamanho da partícula de HDL não foi diferente em função de ter diagnóstico de DM2, MA ou usar estatina ou insulina. Embora os tamanhos encontrados tenham sido compatíveis com os tamanhos preconizados para a HDL na literatura, alguns trabalhos mostram que propriedades cardioprotetoras da HDL estão mais associadas às partículas maiores¹³⁻¹⁵.

Neste estudo, a atividade aceptora de lípidos da HDL foi avaliada. O outro sentido da troca de lípidos entre as lipoproteínas não está sendo mensurada: não se sabe qual percentual de lípidos da HDL está sendo doado para as outras lipoproteínas. Paradoxalmente, a atividade aceptora da HDL foi associada diretamente com fatores de risco de aterosclerose e o uso de estatinas reduziu a transferência de todos os lípidos para HDL. Uma hipótese para justificar tal fato seria que, a HDL com características de transferências mais compatíveis com bons marcadores associar-se-ia à menor aquisição e perda de lípidos e, portanto, seria uma HDL mais estável.

Esse estudo acrescenta dados ao complexo e ainda não totalmente esclarecido mecanismo de troca de lípidos entre lipoproteínas. Ao mesmo tempo permite a identificação da associação de microalbuminúria, uso de insulina e estatinas com aspectos estruturais da HDL, e funcionais da própria HDL, bem como suas proteínas de transferência.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Diabetes mellitus é uma patologia que pode apresentar um espectro clínico bastante amplo. Tentou-se uniformizar a população estudada, excluindo pacientes diabéticos sob tratamento exclusivamente não-farmacológico, assim como os que apresentassem evidências de insuficiência renal ou macroalbuminúria.

A despeito disso, reconhece-se como limitação ao estudo um certo grau de heterogeneidade da população dos diabéticos estudados, onde alguns apresentam doença mais avançada ou mais associada à comorbidades, que outros. Além disso, o uso de insulina, estatina ou antihipertensivos é observado em parte da população estudada.

Idealmente dever-se-ia ter realizado a suspensão de medicações que interferissem no metabolismo lipídico ou na microalbuminúria. O fato de não serem realizadas as análises lipídicas após um período de descontinuação da estatina, deveu-se ao entendimento de que ocorreria um descontrole transitório do perfil lipídico numa população com fatores de risco cardiovascular, sem que nenhum benefício pudesse advir desta suspensão. O mesmo racional explica a não suspensão de antihipertensivos ou hipoglicemiantes dos pacientes.

8. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados permitem concluir que:

- As transferências de lípidos de superfície das lipoproteínas para a HDL ocorrem mais em pacientes diabéticos do que em pessoas saudáveis.
- A presença do diagnóstico de microalbuminúria não parece influenciar na taxa de transferência de lípidos. Entretanto, há uma correlação inversa entre a relação de microalbuminúria/creatininúria e a transferência de colesterol livre para a HDL.
- O tratamento com estatina reduz a transferência de lípidos para HDL, especialmente os que compõem a superfície das lipoproteínas (colesterol livre e fosfolípidos). A insulino terapia exerce um efeito discreto na transferência de lípidos.
- O tamanho das partículas de HDL aparentemente não se altera com qualquer tratamento analisado ou condição de controle metabólico.

9. TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL em DM-2 e controles:

<i>Variáveis</i>	<i>Diabéticos (n=33)</i>	<i>Controles (n=34)</i>	<i>p</i>
Idade (anos)	55±9	54±9	0,327
Sexo Masculino – n (%)	18 (54,5%)	16 (47,1%)	0,540
CT (mg/dl)	183±40	174±21	0,455
LDLc (mg/dl)	103±37	108±22	0,547
HDLc (mg/dl)	50±13	49±13	0,890
TG (mg/dl)	149±71	92±36	<0,001
GJ (mg/dl)	155±66	87±8	<0,001
IMC (kg/m ²)	31±7	25±3	<0,001
Tempo de DM (anos)	11±7	-	-
Hipertensos – n (%)	22 (66,7%)	0	<0,001
Em uso de Estatina – n (%)	18 (54,5%)	0	<0,001
Em uso de Insulina – n (%)	10 (30,3%)	0	<0,001
Diagnóstico de MA – n (%)	9 (27,3%)	-	-
Tamanho de HDL (nm)	8,8±1,0	8,9±0,9	0,064
TCE (%)	4,6±2,1	3,8±1,5	0,074
TFL (%)	25,2±3,2	19,7±3,2	<0,001
TTG (%)	5,1±2,1	4,5±1,5	0,314
TCL (%)	9,1±2,7	6,3±1,5	<0,001

CT=colesterol total, LDLc=colesterol de lipoproteína de baixa densidade, HDLc=colesterol de lipoproteína de alta densidade, TG=triglicerídios, GJ=glicemia de jejum, IMC=índice de massa corpórea, TCE=percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para a HDL, TFL=percentual de transferência de fosfolipídios da LDE para a HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para a HDL, TCL=percentual de transferência de colesterol livre da LDE para a HDL

Tabela 2 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL em DM-2 quanto ao diagnóstico de microalbuminúria:

	<i>DM com microalbuminúria (n=9)</i>	<i>DM sem microalbuminúria (n=24)</i>	<i>p</i>
Idade (anos)	61±7	53±8	0,008
Sexo Masculino n(%)	4(44,4%)	14(58,3%)	0,697
HAS presente n(%)	6(66,7%)	16(66,7%)	1,000
Em uso de estatinas n(%)	6(66,7%)	12(50%)	0,458
Em uso de insulina n(%)	4(44,4%)	6(25%)	0,400
CT (mg/dl)	171±40	188±40	0,328
LDLc (mg/dl)	81±37	112±34	0,072
HDLc (mg/dl)	56±18	48±11	0,131
TG (mg/dl)	169±93	141±61	0,564
Glc (mg/dl)	152±60	156±69	0,984
IMC (kg/m ²)	35±13	29±2	0,392
HbA1c (%)	8,3±1,8	7,2±1,5	0,121
Tamanho de HDL (nm)	9,2±1,4	9,3±0,9	0,414
TCE (%)	4,5±1,6	4,7±2,3	0,869
TFL (%)	25,2±3,3	25,3±3,3	1,000
TTG (%)	4,7±1,8	5,2±2,2	0,681
TCL (%)	8,4±2,6	9,4±2,8	0,386

CT=colesterol total, LDLc=colesterol de lipoproteína de baixa densidade, HDLc=colesterol de lipoproteína de alta densidade, TG=triglicerídios, Glc=glicemia de jejum, IMC=índice de massa corpórea, HbA1c=hemoglobina glicada, TCE=percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para a HDL, TFL=percentual de transferência de fosfolipídios da LDE para a HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para a HDL, TCL=percentual de transferência de colesterol livre da LDE para a HDL

Tabela 3 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL em DM-2 quanto ao diagnóstico de microalbuminúria, após ajuste para idade:

	<i>DM com microalbuminúria (n=9)</i>	<i>DM sem microalbuminúria (n=13)</i>	<i>p</i>
Idade (anos)	61±7	58±3	0,188
CT (mg/dl)	171±40	187±44	0,404
LDLc (mg/dl)	81±37	108±36	0,192
HDLc (mg/dl)	56±18	48±10	0,124
TG (mg/dl)	169±93	158±62	0,947
Glc (mg/dl)	152±60	170±81	0,664
IMC (kg/m ²)	34±10	29±3	0,301
HbA1c (%)	8,3±1,8	7,4±1,7	0,256
Tamanho de HDL (nm)	9,2±1,4	9,5±1,0	0,348
TCE (%)	4,5±1,6	4,4±2,5	0,521
TFL (%)	25,2±3,3	25,8±4,1	0,887
TTG (%)	4,7±1,7	5,0±2,5	0,887
TCL (%)	8,4±2,6	9,1±2,9	0,594

CT=colesterol total, LDL=colesterol de lipoproteína de baixa densidade, HDLc=colesterol de lipoproteína de alta densidade, TG=triglicerídios, Glc=glicemia de jejum, IMC=índice de massa corpórea, HbA1c=hemoglobina glicada, TCE=percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para a HDL, TFL= percentual de transferência de fosfolipídios da LDE para a HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para a HDL, TCL=percentual de transferência de colesterol livre da LDE para a HDL

Tabela 4 - Associações (coeficientes de correlação de Spearman) da microalbuminúria com idade, perfil lipídico, controle glicêmico, dados antropométricos e transferências de lipídios da LDE para HDL:

<i>Variáveis</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
Idade (anos)	0,45	0,040
CT (mg/dl)	-0,02	0,918
LDLc (mg/dl)	-0,08	0,716
HDLc (mg/dl)	-0,19	0,413
TG (mg/dl)	0,26	0,260
Glc (mg/dl)	0,20	0,388
HbA1c (%)	0,53	0,013
Tamanho de HDL (nm)	0,12	0,618
TCE (%)	-0,005	0,982
TFL (%)	-0,08	0,710
TTG (%)	-0,12	0,609
TCL (%)	-0,50	0,024
IMC (kg/m ²)	0,29	0,204
CA (cm)	0,15	0,582
Tempo de diabetes (anos)	0,32	0,160

CT=colesterol total, LDL=colesterol de lipoproteína de baixa densidade, HDLc=colesterol de lipoproteína de alta densidade, TG=triglicerídios, Glc=glicemia de jejum, IMC=índice de massa corpórea, HbA1c=hemoglobina glicada, TCE= percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL, TFL=percentual de transferência de fosfolipídios da LDE para HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para HDL, TCL=percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL, CA=circunferência abdominal

Tabela 5 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL entre diabéticos quanto ao uso de insulina:

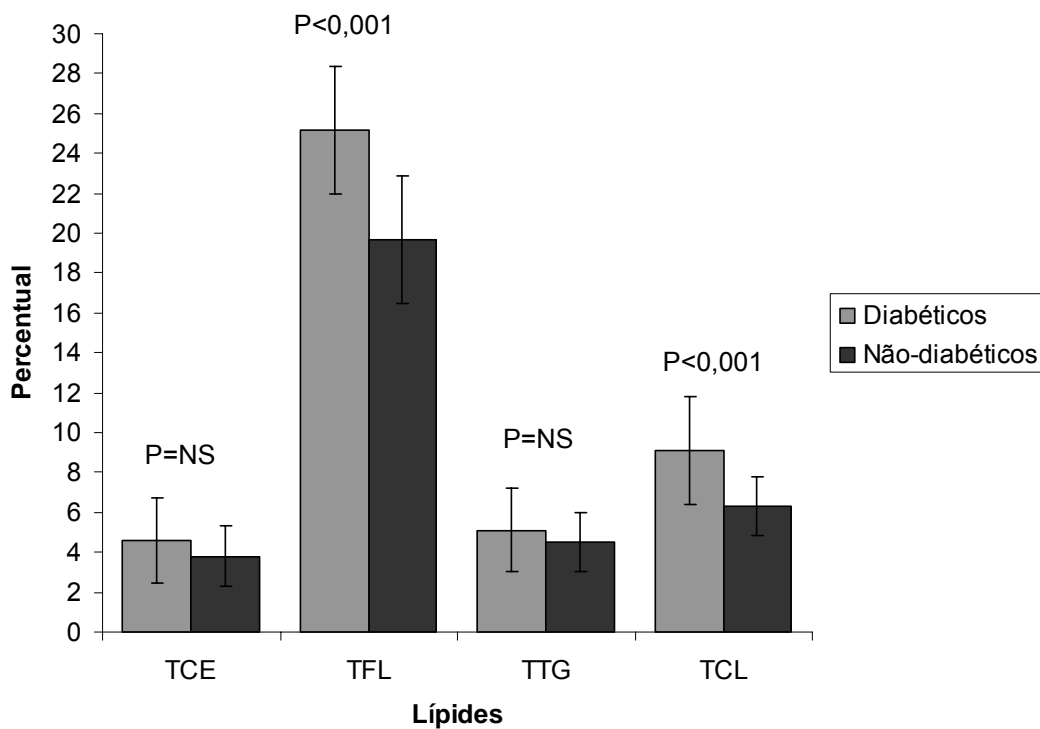
	<i>DM em uso de insulina</i>	<i>DM sem usar insulina</i>	<i>p</i>
	<i>(n= 10)</i>	<i>(n= 23)</i>	
Idade (anos)	57±5	54±10	0,324
Sexo masculino n(%)	4(40%)	14(60,9%)	0,448
Em uso de estatina	7(70%)	11(47,8%)	0,283
HAS presente n(%)	9(90%)	13(56,5%)	0,109
Tempo de DM (anos)	15,1±5,4	9,7±6,7	0,013
CT (mg/dl)	163±33	192±41	0,051
LDLc (mg/dl)	88±38	110±35	0,105
HDLc (mg/dl)	45±9	52±14	0,133
TG (mg/dl)	151±80	148±68	0,802
Glc (mg/dl)	177±93	145±48	0,658
IMC (kg/m ²)	35,1±11,4	28,9±3,1	0,237
HbA1c (%)	8,1±1,8	7,2±1,5	0,207
Tamanho de HDL (nm)	9,6±1,0	9,2±1,0	0,193
TCE (%)	3,5±1,1	5,2±2,2	0,140
TFL (%)	23,5±2,1	26,1±3,3	0,018
TTG (%)	4,1±0,7	5,5±2,3	0,140
TCL (%)	7,7±1,2	9,7±3,0	0,058

CT=colesterol total, LDLc=colesterol de lipoproteína de baixa densidade, HDLc=colesterol de lipoproteína de alta densidade, TG=triglicerídios, Glc=glicemia de jejum, IMC=índice de massa corpórea, HbA1c=hemoglobina glicada, TCE= percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL, TFL=percentual de transferência de fosfolipídios da LDE para HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para HDL, TCL= percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL

Tabela 6 - Dados antropométricos, perfil lipídico, controle glicêmico, tamanho da HDL e transferência de lipídios da LDE para HDL entre diabéticos quanto ao uso de estatina:

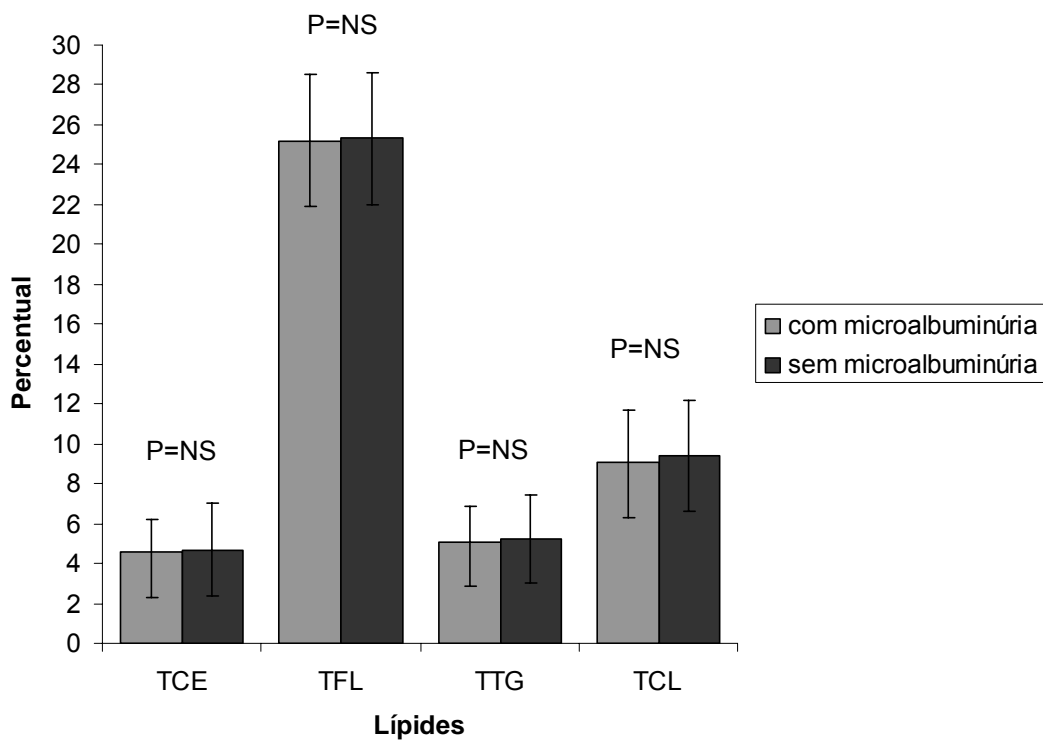
	<i>DM em uso de estatina (n=18)</i>	<i>DM sem uso de estatina (n=15)</i>	<i>p</i>
Idade (anos)	58±6	51±10	0,082
Sexo masculino n(%)	9(50%)	9(60%)	0,729
Em uso de insulina n(%)	7(38,9%)	3(20%)	0,283
HAS presente n(%)	12(66,7%)	10(66,7%)	1,000
Tempo de DM (anos)	13,8±7,1	8,2±5,2	0,018
CT (mg/dl)	168±30	202±43	0,014
LDLc (mg/dl)	89±29	121±38	0,009
HDLc (mg/dl)	48±15	52 ± 11	0,225
TG (mg/dl)	154±84	142±52	0,885
Glc (mg/dl)	162±73	147±56	0,772
IMC (kg/m ²)	31,1±7,0	30,5±7,7	0,613
HbA1c (%)	7,9±1,9	7,0±1,1	0,096
Tamanho de HDL (nm)	9,4±1,1	9,1 ±0,9	0,355
TCE (%)	3,5±0,9	5,9±2,4	0,001
TFL (%)	23,8±2,0	26,9±3,6	0,004
TTG (%)	3,9±0,8	6,4±2,2	<0,001
TCL (%)	7,4±1,3	11,1±2,6	<0,001

CT=colesterol total, LDLc=colesterol de lipoproteína de baixa densidade, HDLc=colesterol de lipoproteína de alta densidade, TG=triglicerídios, Glc=glicemia de jejum, IMC=índice de massa corpórea, HbA1c=hemoglobina glicada, TCE= percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL, TFL=percentual de transferência de fosfolipídios da LDE para HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para HDL, TCL=percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL

Figura 2 - Comparação das transferências de lípidos entre diabéticos e não-diabéticos

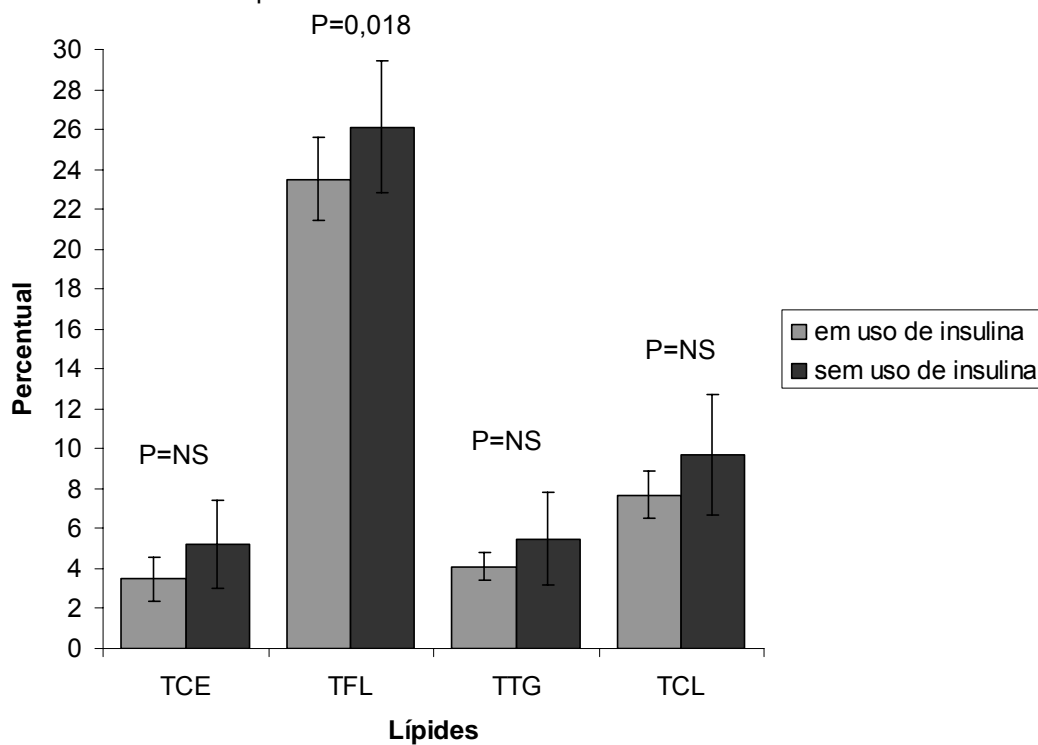
TCE= percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL, TFL=percentual de transferência de fosfolípidios da LDE para HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para HDL, TCL=percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL, NS:Não significativo

Figura 3 - Comparação de transferências de lípidos entre diabéticos com e sem microalbuminúria



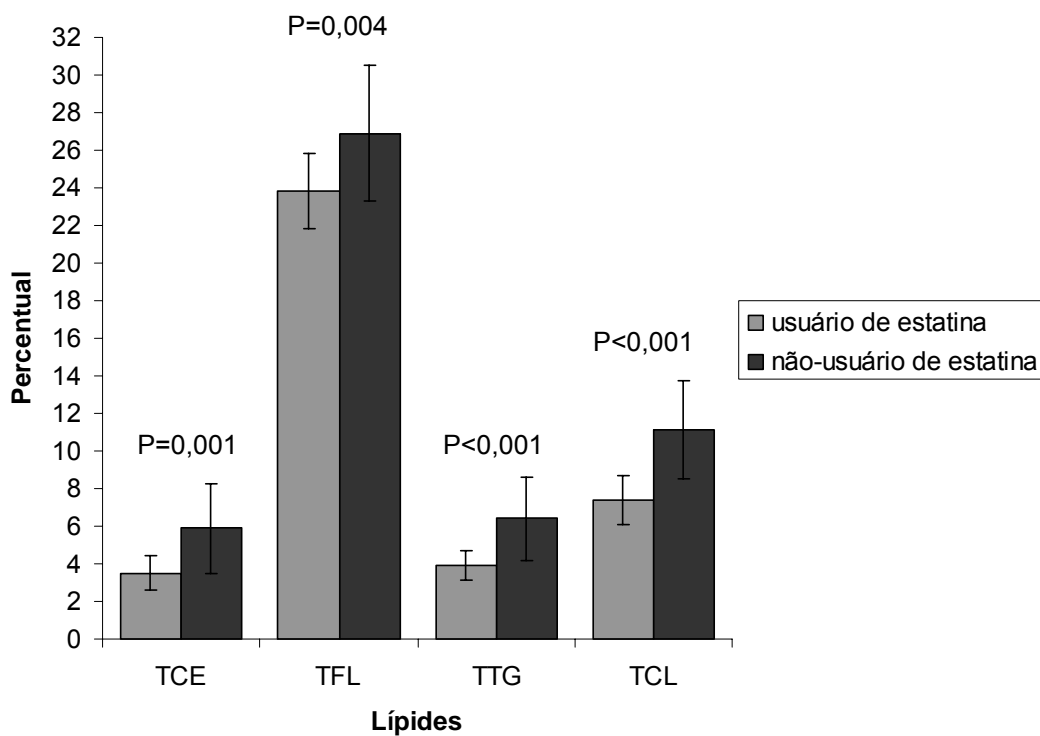
TCE= percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL, TFL=percentual de transferência de fosfolípidios da LDE para HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para HDL, TCL=percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL, NS:Não significativo

Figura 4 - Comparação de transferências de lípidos entre diabéticos usuários e não-usuários de insulino terapia



TCE= percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL, TFL=percentual de transferência de fosfolípidios da LDE para HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para HDL, TCL=percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL, NS:Não significativo

Figura 5 - Comparação de transferências de lípidos entre diabéticos usuários e não-usuários de estatina.



TCE= percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL, TFL=percentual de transferência de fosfolípidios da LDE para HDL, TTG=percentual de transferência de triglicerídios da LDE para HDL, TCL=percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL

10. REFERÊNCIAS

1. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
2. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96:1221-32.
3. Glomset JA. The plasma lecithins: cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968; 9:155-67.
4. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180:1332-9.
5. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95:764-72.
6. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 98:1352-64.
7. Pérusse M PA, Després JP, Couillard C, Lamarche B. A new method for HDL particle sizing by polyacrylamide gradient gel electrophoresis using whole plasma. *J Lipid Res* 2001; 42:1331-1334.
8. Pascot A, Lemieux I, Bergeron J, et al. HDL particle size: a marker of the gender difference in the metabolic risk profile. *Atherosclerosis* 2002; 160:399-406.
9. Lima ES, Maranhao RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem* 2004; 50:1086-8.
10. Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis* 2003; 168:195-211.

11. Skinner ER. High-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5:241-7.
12. Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gambert P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9:203-9.
13. Lamarche B, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Associations of HDL2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1098-105.
14. Johansson J, Carlson LA, Landou C, Hamsten A. High density lipoproteins and coronary atherosclerosis. A strong inverse relation with the largest particles is confined to normotriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb* 1991; 11:174-82.
15. Syvanne M, Ahola M, Lahdenpera S, et al. High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Lipid Res* 1995; 36:573-82.
16. Lagrost L, Athias A, Gambert P, Lallemant C. Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 1994; 35:825-35.
17. Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001; 155:269-81.
18. O'Brien KD, Vuletic S, McDonald TO, et al. Cell-associated and extracellular phospholipid transfer protein in human coronary atherosclerosis. *Circulation* 2003; 108:270-4.
19. Reaven GM. Abnormal lipoprotein metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Pathogenesis and treatment. *Am J Med* 1987; 83:31-40.
20. Barrett-Connor E, Grundy SM, Holdbrook MJ. Plasma lipids and diabetes mellitus in an adult community. *Am J Epidemiol* 1982; 115:657-63.

21. Wilson PW, Anderson KM. Lipids, glucose intolerance and vascular disease: the Framingham Study. *Monogr Atheroscler* 1985; 13:1-11.
22. Taskinen MR. Insulin resistance and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1995; 6:153-60.
23. Reaven GM. Non-insulin-dependent diabetes mellitus, abnormal lipoprotein metabolism, and atherosclerosis. *Metabolism* 1987; 36:1-8.
24. Niskanen L, Turpeinen A, Penttila I, Uusitupa MI. Hyperglycemia and compositional lipoprotein abnormalities as predictors of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: a 15-year follow-up from the time of diagnosis. *Diabetes Care* 1998; 21:1861-9.
25. Syvanne M, Taskinen MR. Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1997; 350 Suppl 1:S120-3.
26. Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia: basic mechanisms underlying the common hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol levels. *Diabetes* 1996; 45 Suppl 3:S27-30.
27. Patsch JR, Patsch W. Exercise, high density lipoproteins, and fat tolerance. *Compr Ther* 1984; 10:29-37.
28. Mattock MB, Morrish NJ, Viberti G, Keen H, Fitzgerald AP, Jackson G. Prospective study of microalbuminuria as predictor of mortality in NIDDM. *Diabetes* 1992; 41:736-41.
29. Mogensen CE. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med* 1984; 310:356-60.
30. Mattock MB, Barnes DJ, Viberti G, et al. Microalbuminuria and coronary heart disease in NIDDM: an incidence study. *Diabetes* 1998; 47:1786-92.
31. Jarrett RJ, Viberti GC, Argyropoulos A, Hill RD, Mahmud U, Murrells TJ. Microalbuminuria predicts mortality in non-insulin-dependent diabetics. *Diabet Med* 1984; 1:17-9.

32. Schmitz A, Vaeth M. Microalbuminuria: a major risk factor in non-insulin-dependent diabetes. A 10-year follow-up study of 503 patients. *Diabet Med* 1988; 5:126-34.
33. Messent JW, Elliott TG, Hill RD, Jarrett RJ, Keen H, Viberti GC. Prognostic significance of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus: a twenty-three year follow-up study. *Kidney Int* 1992; 41:836-9.
34. Gall MA, Rossing P, Skott P, et al. Prevalence of micro- and macroalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and large vessel disease in European type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1991; 34:655-61.
35. De Pablos PL, Martinez J, Martinez MP, Doreste JA. Prevalence of micro- and macroalbuminuria in a Canarian population of type 2 diabetic patients. Relationship with blood pressure, lipid profile, obesity and metabolic control. *Diabetes Metab* 1998; 24:337-43.
36. Lee KU, Park JY, Kim SW, et al. Prevalence and associated features of albuminuria in Koreans with NIDDM. *Diabetes Care* 1995; 18:793-9.
37. Suraniti S, Daligaud L, Chameau AM, Marre M, Fressinaud P. [Effect of pre-existing hypertension on the prevalence and incidence of microalbuminuria in non insulin-dependent diabetic patients]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1991; 84:1097-100.
38. Descamps O, Buysschaert M, Ketelslegers JM, Hermans M, Lambert AE. [Microalbuminuria in a population of 653 patients with type 1 and 2 diabetes]. *Diabete Metab* 1991; 17:469-75.
39. Bruno G, Cavallo-Perin P, Bargero G, et al. Prevalence and risk factors for micro- and macroalbuminuria in an Italian population-based cohort of NIDDM subjects. *Diabetes Care* 1996; 19:43-7.
40. Esmatjes E, Castell C, Gonzalez T, Tresserras R, Lloveras G. Epidemiology of renal involvement in type II diabetics (NIDDM) in Catalonia. The Catalan Diabetic Nephropathy Study Group. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 32:157-63.

41. Parving HH, Tarnow L, Rossing P. Renal protection in diabetes: an emerging role for calcium antagonists. *J Hypertens Suppl* 1996; 14:S21-5.
42. Janssen WM, de Jong PE, de Zeeuw D. Hypertension and renal disease: role of microalbuminuria. *J Hypertens Suppl* 1996; 14:S173-7.
43. Redon J. Renal protection by antihypertensive drugs: insights from microalbuminuria studies. *J Hypertens* 1998; 16:2091-100.
44. Mimran A, Ribstein J, Du Cailar G. Microalbuminuria in essential hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8:359-63.
45. Jones SL, Close CF, Mattock MB, Jarrett RJ, Keen H, Viberti GC. Plasma lipid and coagulation factor concentrations in insulin dependent diabetics with microalbuminuria. *Bmj* 1989; 298:487-90.
46. Kapelrud H, Bangstad HJ, Dahl-Jorgensen K, Berg K, Hanssen KF. Serum Lp(a) lipoprotein concentrations in insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Bmj* 1991; 303:675-8.
47. Watts GF, Powrie JK, O'Brien SF, Shaw KM. Apolipoprotein B independently predicts progression of very-low-level albuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1996; 45:1101-7.
48. Standards of medical care in diabetes--2007. *Diabetes Care* 2007; 30 Suppl 1:S4-S41.
49. Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). *Am J Kidney Dis* 2003; 42:617-22.
50. Meigs JB, Larson MG, D'Agostino RB, et al. Coronary artery calcification in type 2 diabetes and insulin resistance: the framingham offspring study. *Diabetes Care* 2002; 25:1313-9.
51. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88:2-19.

52. Pyorala K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care* 1997; 20:614-20.
53. Goldberg RB, Mellies MJ, Sacks FM, et al. Cardiovascular events and their reduction with pravastatin in diabetic and glucose-intolerant myocardial infarction survivors with average cholesterol levels: subgroup analyses in the cholesterol and recurrent events (CARE) trial. The Care Investigators. *Circulation* 1998; 98:2513-9.
54. Keech A, Colquhoun D, Best J, et al. Secondary prevention of cardiovascular events with long-term pravastatin in patients with diabetes or impaired fasting glucose: results from the LIPID trial. *Diabetes Care* 2003; 26:2713-21.
55. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361:2005-16.
56. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361:1149-58.
57. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364:685-96.
58. Ruotolo G, Parlavecchia M, Taskinen MR, et al. Normalization of lipoprotein composition by intraperitoneal insulin in IDDM. Role of increased hepatic lipase activity. *Diabetes Care* 1994; 17:6-12.
59. Bagdade JD, Dunn FL, Eckel RH, Ritter MC. Intraperitoneal insulin therapy corrects abnormalities in cholesteryl ester transfer and lipoprotein

lipase activities in insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1933-9.

60. 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; 28:691-6.

61. Maranhao RC, Roland IA, Toffoletto O, et al. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids* 1997; 32:627-33.

62. Hirata RD, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhao RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1437:53-62.

63. Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1982; 257:8216-27.

64. Ouguerram K, Krempf M, Maugeais C, Maugeire P, Darmaun D, Magot T. A new labeling approach using stable isotopes to study in vivo plasma cholesterol metabolism in humans. *Metabolism* 2002; 51:5-11.

65. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* 1995; 36:211-28.

66. Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res* 1994; 35:1187-99.

67. Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Cycling of apolipoprotein A-I between lipid-associated and lipid-free pools. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1257:31-7.

68. Clay MA, Newnham HH, Forte TM, Barter PJ. Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apo A-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1124:52-8.

69. Pussinen P, Jauhianinen M, Metso J, Tynnela J, Ehnholm C. Pig plasma phospholipid transfer protein facilitates HDL interconversion. *J Lipid Res* 1995; 36:975-85.

70. Barter PJ, Lally JI. In vitro exchanges of esterified cholesterol between serum lipoprotein fractions: studies of humans and rabbits. *Metabolism* 1979; 28:230-6.

71. Barter PJ, Jones ME. Kinetic studies of the transfer of esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins. *J Lipid Res* 1980; 21:238-49.

72. Barter PJ, Lally JI. The metabolism of esterified cholesterol in rabbit plasma low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1979; 572:510-8.

73. Albers JJ, Wolfbauer G, Cheung MC, et al. Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1258:27-34.

74. Lusa S, Jauhianinen M, Metso J, Somerharju P, Ehnholm C. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem J* 1996; 313 (Pt 1):275-82.

75. von Eckardstein A, Jauhianinen M, Huang Y, et al. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1301:255-62.

76. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 1988; 27:25-9.

77. Janis MT, Metso J, Lankinen H, et al. Apolipoprotein E activates the low-activity form of human phospholipid transfer protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331:333-40.

78. Desrumaux C, Athias A, Bessede G, et al. Mass concentration of plasma phospholipid transfer protein in normolipidemic, type IIa hyperlipidemic, type

IIb hyperlipidemic, and non-insulin-dependent diabetic subjects as measured by a specific ELISA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:266-75.

79. 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; 140:71-9.

80. Schneider M, Verges B, Klein A, et al. Alterations in plasma vitamin E distribution in type 2 diabetic patients with elevated plasma phospholipid transfer protein activity. *Diabetes* 2004; 53:2633-9.

81. Bagdade JD, Lane JT, Subbaiah PV, Otto ME, Ritter MC. Accelerated cholesteryl ester transfer in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1993; 104:69-77.

82. 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; 123:93-101.

83. Watts GF, Naumova R, Slavin BM, et al. Serum lipids and lipoproteins in insulin-dependent diabetic patients with persistent microalbuminuria. *Diabet Med* 1989; 6:25-30.

84. Kahri J, Groop PH, Elliott T, Viberti G, Taskinen MR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and its relationship to plasma lipoproteins and apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in IDDM patients with microalbuminuria and clinical nephropathy. *Diabetes Care* 1994; 17:412-9.

85. Kaser S, Foger B, Ebenbichler CF, et al. Influence of leptin and insulin on lipid transfer proteins in human hepatoma cell line, HepG2. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:1633-9.

86. Arai K, Suehiro T, Yamamoto M, Ito H, Hashimoto K. Suppression of plasma cholesteryl ester transfer protein activity in acute hyperinsulinemia and effect of plasma nonesterified fatty acid. *Metabolism* 1997; 46:1166-70.

87. Sutherland WH, Walker RJ, Lewis-Barned NJ, Pratt H, Tillmann HC, Tillman HC. The effect of acute hyperinsulinemia on plasma cholesteryl ester transfer protein activity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and healthy subjects. *Metabolism* 1994; 43:1362-6.
88. Riemens SC, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP. Plasma phospholipid transfer protein activity is lowered by 24-h insulin and acipimox administration: blunted response to insulin in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 1999; 48:1631-7.
89. Riemens SC, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP. Plasma phospholipid transfer protein activity is related to insulin resistance: impaired acute lowering by insulin in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 1998; 41:929-34.
90. Ahnadi CE, Berthezene F, Ponsin G. Simvastatin-induced decrease in the transfer of cholesterol esters from high density lipoproteins to very low and low density lipoproteins in normolipidemic subjects. *Atherosclerosis* 1993; 99:219-28.
91. Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, Farnier M, Chapman MJ. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:189-97.
92. Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall A. Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *J Clin Invest* 1992; 90:1290-5.
93. Dallinga-Thie GM, van Tol A, Hattori H, Rensen PC, Sijbrands EJ. Plasma phospholipid transfer protein activity is decreased in type 2 diabetes during treatment with atorvastatin: a role for apolipoprotein E? *Diabetes* 2006; 55:1491-6.