PATRÍCIA HELENA GILBERTO RIOS PEREIRA

Lipoproteína de alta densidade (HDL) isolada de portadores de diabetes melito tipo 2 com controle glicêmico inadequado favorece o acúmulo de colesterol em macrófagos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edna Regina Nakandakare

SÃO PAULO

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Patrícia Helena Gilberto Rios

Lipoproteína de alta densidade (HDL), isolada de portadores de diabetes melito tipo 2 com controle glicêmico inadequado, favorece o acúmulo de colesterol em macrófagos / Patrícia Helena Gilberto Rios Pereira. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Edna Regina Nakandakare.

Descritores: 1.*Diabetes mellitus* 2.Aterosclerose 3.Lipoproteínas HDL
4.Colesterol 5.Macrófagos

USP/FM/SBD-435/09

Este estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica (LIM-10) – Laboratório de Lípidos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este projeto foi desenvolvido com Bolsa de Mestrado e Auxílio à Pesquisa provenientes da FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo).

Dedicatória

Ao Deus da minha Salvação.

Dedicatória

À minha família:

À minha mãe Edely e à minha irmã Fátima, pelo amor e paciência com que me apoiaram durante toda a realização deste trabalho.

Às minhas avós Cida e Chlórís, pelo carinho e pela entusiasmada participação.

Aos meus tios Sheila, Vera e Mário, pelo constante incentivo.

Ao Felipinho, por alegrar a minha vida!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho em um centro de excelência e em meio a pessoas tão maravilhosas.

À Dra. Edna Regina Nakandakare, a quem tenho profunda admiração como pessoa, mestre, pesquisadora e profissional. Obrigada pela amizade, paciência e pelo tempo despendido na minha orientação desde a iniciação científica.

À Dra. Marisa Passarelli, pelo suporte intelectual e pelas sugestões fundamentais para a realização deste trabalho.

À Dra. Valéria Sutti Nunes pelo auxílio constante na elaboração do trabalho. Pela amizade, carinho e pelo coração de mãe que nos cativa a todos.

Ao Dr. Éder Carlos Rocha Quintão, Professor Emérito da FMUSP, pela humildade com que compartilha conosco seu enorme conhecimento.

À Dra. Ana Maria Pita Lottenberg, por despertar em mim o interesse pela pesquisa e me trazer para o laboratório. Agradeço também pela amizade e pelo incentivo em minha vida profissional.

À Karina de Souza Oliveira e Felipe Siqueira Bonachi pela ajuda na realização dos experimentos.

À amiga Adriana Machado, por todos os momentos que compartilhamos desde a graduação e pelo apoio emocional e espiritual, que certamente me impulsionou até aqui. Obrigada também pela leitura e por me ajudar a cuidar de todos os detalhes nessa etapa final.

Aos colegas Débora Rocco, Fabiana Ferreira, Gabriela Castilho, Lígia Okuda, Raphael Pinto e Rodrigo Iborra, pela ajuda nos experimentos e pelos ótimos momentos que compartilhamos.

Ao Dr. Sérgio Catanozi, pela revisão minuciosa do texto e pelas importantes sugestões.

Às amigas nutricionistas: Ângela Ilha (especialmente pela elaboração gráfica), Flávia Morilho, Renata Pepe, Roberta Nascimento e Vivian Buonacorso, que me acompanharam em toda a minha jornada.

Aos colegas de laboratório Alessandra Belickas Carreiro, Camila Holanda Sartori, Camila Canteiro, Claudia Cristina de Souza, Diego Juvenal Gomes, Juliana Tironi Machado, Jussara Cordeiro Rocha, Patrícia Cazita, Rosibel Sileide da Silva e Tatiana Martins Venancio, pelo convívio prazeroso e pelos momentos alegres.

Ao Dr. Simão Lottenberg e ao Dr. Isio Schulz, pela ajuda na seleção dos pacientes.

A todos os pacientes e indivíduos controles que participaram do estudo.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de siglas

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1.INTRODUÇÃO.....	1
2.JUSTIFICATIVA.....	23
3.OBJETIVO	24
4.MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.RESULTADOS.....	35
6.DISSCUSSÃO.....	47
7.CONCLUSÃO	56
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

APÊNDICES

LISTA DE SIGLAS

- ABCA-1: *ATP-Binding Cassette Transporter A-1*
- ABCG-1: *ATP-Binding Cassette Transporter G-1*
- ACAT: acil-coenzima A:colesterol aciltransferase
- AGE: produtos avançados de glicação
- CEHA: colesterol éster hidrolase ácida
- CEHN: colesterol éster hidrolase neutra
- CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado (*cholesteryl ester transfer protein*)
- DAC: doença arterial coronariana
- DM 2: diabetes melito tipo 2
- EP: erro padrão
- HbA_{1c}: hemoglobina glicada
- HDL: lipoproteína(s) de alta densidade
- HPLC: cromatografia líquida de alta performance
- ICAM-1: *inter-cellular adhesion molecule-1*
- IDL: lipoproteína(s) de densidade intermediária
- IMC: índice de massa corpórea
- Insig: *insulin-induced gene product*
- IRS-2: substrato do receptor de insulina 2
- LCAT: lecitina colesterol aciltransferase (*lecithin cholesterol acyl transferase*)
- LDL: lipoproteína(s) de baixa densidade

- LHS: lipase hormônio sensível
- LPL: lipoproteína lipase
- LRP: *lipoprotein receptor-related protein*
- LXR: *liver X receptor*
- MTP: proteína microsomal de transferência de lípidos (*microsomal triglyceride transfer protein*)
- PAF-AH: *Platelet-activating factor acetylhydrolase*
- PBS: solução de tampão fosfato (*phosphate buffered solution*)
- PLTP: proteína de transferência de fosfolípidos
- PON-1: paraoxonase-1
- QM: quilomícrons
- SAA: amiloide sérica A
- SCAP: *SREBP cleavage activating protein*
- SR-BI: *scavenger receptor-BI*
- SREBP: proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroide (*sterol regulatory element-binding protein*)
- TRC: Transporte Reverso de Colesterol
- VCAM-1: *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*
- VLDL: lipoproteína(s) de muito baixa densidade

LISTA DE ABREVIATURAS

- Apo A-I: apolipoproteína A-I
- Apo A-II: apolipoproteína A-II
- Apo A-V: apolipoproteína A-V
- Apo B: apolipoproteína B
- Apo B-100: apolipoproteína B-100
- Apo B-48: apolipoproteína B-48
- Apo C-II: apolipoproteína C-II
- Apo C-III: apolipoproteína C-III
- Apo E: apolipoproteína E
- Apo M: apolipoproteína M
- CE: colesterol esterificado
- CL: colesterol livre
- CT: colesterol total
- FL: fosfolípidos
- HDL-c: HDL-colesterol
- LDL-c: LDL-colesterol
- TG: triglicérides

RESUMO

Pereira PHGR. Lipoproteína de alta densidade (HDL) isolada de portadores de diabetes melito tipo 2 com controle glicêmico inadequado favorece o acúmulo de colesterol em macrófagos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

No diabetes melito tipo (DM) 2, a glicoxidação da LDL favorece o acúmulo de colesterol nos macrófagos da parede arterial, enquanto que as modificações da HDL alteram o transporte reverso do colesterol e reduzem sua capacidade ateroprotetora. O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração de colesterol livre (CL) e esterificado (CE) em macrófagos, resultante da incubação conjunta de LDL e HDL isoladas de indivíduos portadores de DM 2 (D) com controle glicêmico inadequado, ou de indivíduos controles não diabéticos (C). LDL e HDL isoladas do plasma por ultracentrifugação por gradiente descontínuo de densidade foram incubadas simultaneamente (100µg proteína/mL de meio) em macrófagos de peritônio de camundongos, durante 48 h, a 37°C, de acordo com os seguintes esquemas: LDL(C); LDL(C)+HDL(C); LDL(C)+HDL(C) *pool*; LDL(D); LDL(D)+HDL(D) ou LDL(D)+ HDL(C) *pool*. O conteúdo celular de CL e CE (linoleato, oleato e palmitato) foi analisado por HPLC (µg/mg de proteína celular). A idade, IMC e triglicérides plasmáticos, assim como a glicemia de jejum e HbA_{1c}, eram maiores no grupo DM, em comparação com o grupo C. Nas incubações com LDL(D) + HDL(D), observou-se maior conteúdo celular de colesterol total (607 ± 99 ; $p = 0,033$) e esterificado (430 ± 86 ; $p = 0,023$) em comparação com LDL(D) (356 ± 73 ; 209 ± 51 , respectivamente), e somente do colesterol esterificado comparado com LDL(D) + HDL(C) *pool* (208 ± 70 ; $p = 0,023$). Os macrófagos com LDL(D) + HDL(D) apresentaram maior conteúdo de colesterol total (607 ± 99 ; $p = 0,01$), CL (177 ± 21 ; $p = 0,03$) e CE (430 ± 86 ; $p = 0,02$) em comparação com LDL(C) + HDL(C) *pool* (266 ± 66 , 89 ± 16 e 176 ± 53 , respectivamente). O acúmulo de colesterol esterificado nos macrófagos foi decorrente da maior formação de colesterol linoleato e oleato. A análise da composição das HDL(D) mostrou menor conteúdo de apo A-I em relação aos lípides, comparada com HDL(C). Em conclusão, a incubação simultânea de LDL(D) + HDL(D) provocou maior acúmulo de colesterol em macrófagos, em comparação à incubação de LDL(D) isoladamente ou de LDL(C) + HDL(C) *pool*. Estes resultados sugerem que a HDL de portadores de DM 2 mal compensados favorece o maior acúmulo de colesterol em macrófagos.

Descritores: 1. *Diabetes mellitus* 2. Aterosclerose 3. Lipoproteínas HDL 4. Colesterol 5. Macrófagos

SUMMARY

Pereira PHGR. High density lipoprotein (HDL) from poorly controlled type 2 diabetes mellitus subjects favours macrophage cholesterol accumulation. [Dissertation] São Paulo: Faculty of Medical Sciences of University of São Paulo; 2009.

The development of atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus (DM2) is associated with lipoprotein (LP) modifications. Glycoxidized LDL increases macrophage cholesterol accumulation whereas HDL modifications impair the reverse cholesterol transport and atheroprotective properties. The objective of this study was to evaluate the cholesterol content of mouse peritoneal macrophage (MPM) after their simultaneous incubation with LDL+HDL or LDL alone from poorly controlled DM2 (D, n=11), and from non-diabetic control individuals (C, n=11). LP were isolated by discontinuous density gradient ultracentrifugation and incubated (100µg protein/mL) with MPM (48h), according to the following protocol: LDL(C); LDL(C)+HDL(C); LDL(C)+HDL(C) pool; LDL(D); LDL(D)+HDL(D) or LDL(D)+ HDL(C) pool. The cellular contents of free (FC) and of esterified cholesterol (EC: linoleate, oleate and palmitate) were measured by HPLC (µg/mg of cell protein). Age, BMI, fasting plasma glucose, HbA_{1c} and triglycerides were higher in D as compared to C. The incubation with LDL(D)+HDL(D) increased MPM TC (mean ± SEM) (607 ± 99; p = 0,033) and EC (430 ± 86; p = 0,023) contents compared to LDL(D) alone (356 ± 73; 209 ± 51, respectively). Also, MPM EC content was higher compared to LDL(D)+HDL(C)pool (208 ± 70; p = 0,023). MPM incubated with LDL(D)+HDL(D) presented greater contents of TC (607 ± 99; p = 0,01), FC (177 ± 21; p = 0,03) and of EC (430 ± 86; p = 0,02) compared to the LDL(C)+HDL(C)pool (266 ± 66, 89 ± 16 e 176 ± 53, respectively). The cellular EC content was ascribed to accumulations of linoleate and oleate. Analysis of the HDL composition showed higher lipid/apo A-I ratio in HDL(D) compared to HDL(C). In conclusion, the simultaneous incubation of LDL(D)+HDL(D) induces greater cholesterol

accumulation in macrophage compared to LDL(D) and LDL(C)+HDL(C)pool. These results suggest that uncontrolled DM2 HDL favours the cellular cholesterol accumulation.

Key words: 1.*Diabetes mellitus* 2. Atherosclerosis 3. Lipoproteins HDL 4. Cholesterol 5. Macrophages

APÊNDICES

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é a principal causa de morbidade e mortalidade cardiovascular em portadores de diabetes melito tipo 2 (DM 2). Estes pacientes apresentam risco para a doença arterial coronariana duas ou três vezes maior quando comparados a indivíduos não diabéticos, sendo essa prevalência semelhante à de indivíduos não diabéticos com coronariopatia (Stamler et al., 1993; Haffner et al., 1998).

Diversas alterações do DM contribuem para o maior desenvolvimento da placa aterosclerótica, entre elas a hiperglicemia, hiperinsulinemia, disfunção endotelial e dislipidemia (Marks & Raskin, 2000; Mazzone et al., 2008).

Dentre os fatores preditores clássicos de infarto agudo do miocárdio estão a elevação do colesterol total (CT) e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Gordon et al., 1977; Neaton & Wentworth, 1992). Dados mais recentes demonstram que a razão entre a apolipoproteína B (apo B), principal apolipoproteína das LDL, e a apolipoproteína A-I (apo A-I), principal apolipoproteína das HDL, é o fator que melhor prediz a chance de evento cardiovascular (McQueen et al., 2008; Holme et al., 2008).

1.1. Metabolismo das lipoproteínas

O colesterol é transportado no plasma por complexos moleculares denominados lipoproteínas. A estrutura básica das lipoproteínas é formada por um núcleo contendo lípides apolares, como o colesterol esterificado (CE) e os triglicérides (TG), e uma camada externa composta por colesterol livre (CL), fosfolípidos (FL) e apolipoproteínas. Essas últimas são moduladoras do metabolismo das lipoproteínas, uma vez que estabilizam essas partículas, conferem solubilidade e afinidade a diversos receptores e são capazes de inibir ou ativar enzimas importantes a esse metabolismo (Franceschini, 1996; Chahil & Ginsberg, 2006).

Em relação à densidade, as lipoproteínas podem ser classificadas nas seguintes frações: quilomícrons (QM; $d < 0,95$ g/mL); lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL; $d < 1,006$ g/mL); lipoproteínas de densidade intermediária (IDL; $1,006 < d < 1,019$ g/mL); lipoproteínas de baixa densidade (LDL; $1,019 < d < 1,063$ g/mL); lipoproteínas de alta densidade (HDL; $1,063 < d < 1,210$ g/mL) (Havel et al., 1955).

Os QM são sintetizados pelos enterócitos e responsáveis pelo transporte de TG e colesterol provenientes da dieta. A principal proteína dos QM é a apolipoproteína B-48 (apo B-48), que mantém a estrutura dessas partículas e não interage com receptores B/E por ser uma forma truncada da apo B-100. Os QM são secretados na linfa e entram na circulação sanguínea pelo ducto torácico, onde incorporam outras apolipoproteínas, incluindo apo C-II, apo C-III, apo E e apo A-V (Ginsberg et al., 2005; Chahil & Ginsberg, 2006). A apo C-II atua como cofator para a ativação da lipoproteína lipase

(LPL), enzima que hidrolisa TG dos QM. Por outro lado, a apo C-III inibe a lipólise mediada pela LPL (Chahil & Ginsberg, 2006). Na circulação periférica, os TG de QM são hidrolisados pela LPL, o que resulta na liberação de ácidos graxos livres e apolipoproteínas na circulação. Após a hidrólise dos TG, são formadas partículas denominadas QM remanescentes, que menos apo C e são mais enriquecidos em apo E (Ginsberg et al., 2005; Chahil & Ginsberg, 2006). Os QM remanescentes são removidos da circulação por meio dos receptores hepáticos denominados LRP (*lipoprotein receptor-related protein*) (Herz et al., 1988).

A biossíntese da VLDL inicia-se no retículo endoplasmático, onde a apo B-100 é secretada e simultaneamente se liga aos TG e FL pela ação da proteína microssomal de transferência de lípidos (MTP - *microsomal triglyceride transfer protein*) (Adiels et al., 2006; Blasiolo et al., 2007). As VLDL₂ formadas são transferidas para o complexo de Golgi, onde sofrem maior incorporação de lípidos, originando as VLDL₁, partículas maduras e ricas em TG (Adiels et al., 2006; Adiels et al., 2008).

Os TG incorporados nas VLDL advêm de diversas fontes: ácidos graxos captados diretamente da circulação, ácidos graxos liberados de QM ou VLDL remanescentes e, em menor escala, ácidos graxos derivados da lipogênese hepática (Ginsberg et al., 2005; Adiels et al., 2006).

À medida que as VLDL são secretadas na circulação, adquirem apo C-II, apo C-III, apo E e apo-V. Essas lipoproteínas sofrem ação da LPL, liberando ácidos graxos e originando as VLDL remanescentes. A apo C-II,

apo C-III e apo-V possuem atividade reguladora sobre o catabolismo das VLDL (Ginsberg et al., 2005).

As partículas de VLDL remanescentes, também denominadas IDL, podem ser captadas pelos receptores LRP ou receptores B/E hepáticos ou, ainda, originar partículas de LDL, por meio da hidrólise de TG sob a ação da lipase hepática (Chahil & Ginsberg, 2006).

Estruturalmente, a camada externa das LDL é composta por CL, FL e uma única molécula de apo B-100, enquanto seu núcleo contém predominantemente CE. Essas lipoproteínas são as principais carreadoras de colesterol plasmático, sendo sua concentração plasmática considerada fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Goldstein & Brown, 1984).

As LDL são removidas da circulação pelos receptores B/E presentes no fígado e nos tecidos periféricos. Estes receptores localizam-se na membrana plasmática em regiões denominadas vesículas revestidas. Quando as LDL ligam-se aos receptores, o complexo formado é internalizado em vesículas, onde os receptores dissociam-se das LDL, retornando à superfície celular (Goldstein & Brown, 2009). Nos endossomos, o CE das LDL é hidrolisado a CL por ação da enzima colesterol éster hidrolase ácida (CEHA), podendo ser utilizado como constituinte das membranas celulares ou ser transportado ao citosol, onde sofre reesterificação pela acil-coenzima A:colesterol aciltransferase (ACAT) para armazenamento. No sentido inverso, os ésteres de colesterol são hidrolisados a colesterol livre pela ação da enzima colesterol éster hidrolase

neutra (CEHN), podendo ser, então transferidos para aceptores extracelulares (Soccio & Breslow, 2004).

A captação de colesterol pelas células sofre intensa regulação por meio dos fatores de transcrição *sterol regulatory element-binding protein* (SREBP; proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroide), que regulam a síntese dos receptores de LDL e outros genes que participam da síntese do colesterol, ácidos graxos e triglicérides (Soccio & Breslow, 2004). Quando o colesterol celular é abundante, a SREBP é mantida no retículo endoplasmático, ligada às proteínas SCAP (*SREBP cleavage activating protein*) e Insig (*insulin-induced gene product*). Concentrações diminuídas de esteroides nas células permitem a dissociação da Insig e da SCAP. Esta última migra, em associação à SREBP, para o complexo de Golgi, onde duas clivagens proteolíticas subsequentes liberam o fragmento ativo da SREBP. No núcleo, a SREBP ativa a transcrição da enzima HMG-CoA redutase, envolvida na síntese de colesterol e dos receptores de LDL. Quando o conteúdo intracelular de colesterol aumenta, a expressão celular de receptores B/E diminui. Este fino mecanismo de regulação do colesterol celular protege as células do efeito deletério causado quando há concentração excessiva de colesterol (Soccio & Breslow, 2004; Goldstein & Brown, 2009).

As HDL são as menores e mais densas lipoproteínas plasmáticas, consistindo em diferentes subpopulações de partículas que variam em tamanho, forma, densidade, carga de superfície e composição (Barter, 2002; Rye et al., 2009). As principais apolipoproteínas da HDL são a apo A-I e apo

A-II, cujas concentrações variam de acordo com as subpopulações dessas lipoproteínas (Barter, 2002; Rye et al., 2009). As HDL também transportam proteínas envolvidas em processos imunológicos, coagulação e inflamação (Vaisar et al., 2007).

As partículas nascentes de HDL, também denominadas pré-beta HDL, originam-se como partículas discoidais, formadas por componentes de superfície (apo A-I, FL e CL) liberados durante o remodelamento intravascular de lipoproteínas ricas em TG, que é mediado pela LPL (Tall, 1990). A apo A-I secretada pelo intestino e pelo fígado, ou dissociada das lipoproteínas, também origina a partícula de HDL, por meio da captação celular de colesterol e FL (Jessup et al., 2006; Singh et al., 2007; Tall, 2008).

O colesterol livre na pré-beta HDL é esterificado pela enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), que transfere o ácido graxo do FL (fosfatidilcolina) para o CL. O CE formado, por ser hidrofóbico, é transportado no interior da partícula, gerando partículas esféricas de HDL, denominadas HDL₃. A conversão de CL a CE pela LCAT reduz o colesterol da superfície da HDL, estabelecendo um gradiente de concentração que leva à maior remoção de colesterol de membranas celulares (Wang & Rader, 2007; Rye et al., 2009).

A HDL é reconhecidamente um fator de proteção contra o desenvolvimento de doença aterosclerótica. Seu efeito antiaterogênico deve-se ao Transporte Reverso de Colesterol (TRC), processo por meio do qual o CL é removido das células periféricas, transportado aos órgãos

esteroidogênicos ou ao fígado e excretado nas fezes (Ansell et al., 2005; Tall, 2008).

O TRC inicia-se com a remoção do excesso de CL das células, pela HDL, por meio de quatro vias: (1) transporte ativo mediado pelo transportador ABCA-1 (*ATP-Binding Cassette Transporter A-1*) para apo A-I pobres em lípidos; (2) transporte ativo mediado pelo transportador ABCG-1 (*ATP-Binding Cassette Transporter G-1*) para HDL grandes e esféricas; (3) transporte passivo mediado pelo receptor SR-BI (*scavenger receptor-BI*) para HDL esféricas; e (4) difusão passiva pela membrana celular (Tall, 2008; Rader et al., 2009; Rye et al., 2009).

O ABCA-1 medeia o transporte de CL e FL celulares para apo A-I. É provável que esse transportador forme um canal na membrana celular capaz de promover a transferência do excesso de CL da membrana por um processo dependente de ATP (Neufeld et al., 2001). Mutações no gene do ABCA-1 são responsáveis pela doença de Tangier, caracterizada por deficiência severa de HDL plasmática, acúmulo de colesterol em macrófagos e aumento de aterosclerose (Serfaty-Lacroisniere et al., 1994; Rust et al., 1999). Por outro lado, macrófagos que superexpressam ABCA-1 apresentam aumento do efluxo de colesterol para apo A-I (Van Eck et al., 2006).

A transcrição gênica de ABCA-1 é regulada pelo receptor nuclear LXR (*Liver X receptor*). Assim como outros membros da família de fatores de transcrição (RXR, FXR e PXR), o LXR apresenta domínios funcionais específicos de ativação transcricional e de translocação e dimerização nuclear (Edwards et al., 2002). Os principais ligantes deste receptor são os

óxidos de colesterol, dentre eles 22, 24 e 25-hidroxicolesterol (Tontonoz & Mangelsdorf, 2003). Além disso, o tratamento de macrófagos com sobrecarga de colesterol, por meio da incubação com LDL acetilada ou oxidada, induz a transcrição de ABCA-1 (Schwartz et al., 2000).

O receptor ABCG-1 é um transportador de colesterol específico para as partículas de HDL. Para a exportação do colesterol celular, o ABCG-1 requer aceptores que contenham FL, não sendo capaz de promover o efluxo para apo A-I pobre em lípidos (Wang et al., 2004). Macrófagos que não expressam ABCG-1 apresentam efluxo de colesterol reduzido para HDL maduras (Kennedy et al., 2005). Paradoxalmente, em macrófagos com deficiência de ABCG-1 observou-se redução na aterosclerose, possivelmente devido ao aumento compensatório da síntese de ABCA-1 em macrófagos (Wang & Rader, 2007). A regulação da expressão de ABCG-1 também ocorre via LXR (Wang et al., 2006). Demonstrou-se aumento significativo no efluxo de colesterol celular para HDL₂ em macrófagos de camundongos incubados com ativadores de LXR. No mesmo estudo, o efluxo de colesterol foi reduzido em macrófagos *knockout* para ABCG-1. Entretanto, observou-se um componente residual do efluxo de colesterol basal, o qual não pode ser atribuído a este transportador (Wang et al., 2006).

Na partícula de HDL, o colesterol esterificado é transportado para o fígado por duas vias diferentes (Sviridov & Nestel, 2002; Wang & Rader, 2007). Na via direta, o colesterol esterificado é captado seletivamente pelo receptor hepático SR-BI, enquanto na via indireta ocorre troca de colesterol esterificado das HDL por TG de lipoproteínas que contêm apo B (QM, VLDL,

LDL), mediada pela proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), sendo estas lipoproteínas captadas por receptores hepáticos específicos: receptor B/E e LRP (Sviridov & Nestel, 2002; Singh et al., 2007). O enriquecimento das partículas de HDL em TG leva ao aumento de seu tamanho, e elas passam a ser denominadas HDL₂.

Figura 1. Transporte Reverso de Colesterol.

CE: colesterol esterificado CL: colesterol livre

Além da participação no TRC, a HDL possui outras atividades ateroprotetoras, como a inibição da oxidação da LDL, a inibição da quimiotaxia de monócitos e a prevenção da disfunção endotelial e da apoptose. Essas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiagregante, anticoagulante e pró-fibrinolítica são exercidas por diferentes componentes da HDL, como apolipoproteínas e enzimas (Norata et al., 2006; Kontush & Chapman, 2006; Feng & Li, 2009).

Até o momento, foram identificadas 75 proteínas ligadas a HDL isoladas de indivíduos controles saudáveis ou portadores de doença arterial coronariana. Neste estudo, observou-se a presença de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, como apo A-I, apo A-II, apo E, apo M, CETP, LCAT, PLTP (proteína de transferência de fosfolípidos), PON-1 (paraoxonase-1), SAA (amiloide sérica A); proteínas de fase aguda, proteínas ativadoras do complemento e inibidores de protease. A presença destas proteínas nas partículas de HDL confirma a importância dessas lipoproteínas na modulação dos processos de oxidação e inflamação (Vaisar et al., 2007; Davidson et al., 2009).

O efeito antioxidante da HDL pode ser atribuído à sua habilidade no processo de quelação de metais de transição e na remoção de produtos de oxidação lipídica de lipoproteínas oxidadas ou membranas celulares (Assmann & Gotto, 2004; Nègre-Salvayre et al., 2006). A capacidade de acumular altas concentrações de hidroperóxidos lipídicos permite que a HDL atue como carreadora desses compostos, removendo das LDL os produtos

de sua oxidação e transportando-os ao fígado, onde são destoxificados (Barter et al., 2004; Nègre-Salvayre et al., 2006).

A inibição da oxidação da LDL pela HDL pode ser atribuída à capacidade antioxidante de proteínas e enzimas associadas a ela, como a apo A-I, PON-1, PAF-acetil-hidrolase (PAF-AH), LCAT e glutathione peroxidase (Barter et al., 2004; Ansell et al., 2005; Sviridov et al., 2008).

A apo A-I previne a LDL da oxidação pela remoção de hidroperóxidos dessas partículas LDL (Assmann & Gotto, 2004; Nègre-Salvayre et al., 2006; Sviridov et al., 2008).

A PON-1 é uma enzima cálcio-depentente associada à HDL que atua na inibição da oxidação de lipoproteínas (Norata et al., 2006; Noto, 2009). Ela é capaz de hidrolisar ácidos graxos oxidados de fosfolípidos e de reduzir o acúmulo de lípidos oxidados na LDL (Aviram & Rosenblat et al., 2004).

A PAF-AH é uma enzima que se encontra ligada à HDL, capaz de degradar PAF, um fosfolípido bioativo mediador de processos alérgicos e inflamatórios, em um composto biologicamente inativo (Caslake et al., 2000).

A capacidade anti-inflamatória da HDL deve-se à inibição da expressão de moléculas de adesão (VCAM-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*; ICAM-1, *inter-cellular adhesion molecule-1* e E-selectina) mediada por citocinas (Cockerill et al., 1995) e à redução da infiltração de neutrófilos na parede arterial (Nicholls et al., 2005).

A HDL também é capaz de antagonizar a atividade plaquetária e inibir a cascata de coagulação, além de promover a geração de óxido nítrico endotelial *in vivo* e aumentar a vasorreatividade arterial (Mineo et al., 2006).

1.2. Metabolismo das lipoproteínas no diabetes melito tipo 2

A dislipidemia é reconhecidamente uma importante causa de doença arterial coronariana em portadores de DM 2 (Shepherd, 2007; Adiels et al., 2008), caracterizada por hipertrigliceridemia, hiperlipidemia pós-prandial, baixa concentração de HDL e predomínio de LDL pequenas e densas. Todas essas alterações iniciam-se pela maior produção de lipoproteínas ricas em triglicérides, ou seja, VLDL e QM (Shepherd, 2007; Adiels et al., 2008; Mooradian, 2009).

A insulina regula a síntese e o catabolismo das VLDL. No tecido adiposo, a lipase hormônio sensível (LHS) é inibida pela insulina, reduzindo o fluxo de ácidos graxos para o fígado. Por outro lado, no fígado, a insulina estimula o fator de transcrição SREBP- 1c, que aumenta a síntese de ácidos graxos e conseqüentemente de TG e FL (Horton et al., 2002). A ação da insulina sobre o SREBP-1c é independente do substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2) (Shimomura et al., 2000). A síntese de apo B-100 é um processo contínuo, porém a sua integridade depende da ligação aos TG e FL por ação da MTP, e sua degradação em proteassomas é controlada pela insulina (Chahil & Ginsberg, 2006).

O catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides também é influenciado pela ação da insulina que atua sobre a produção e a atividade da LPL, além de controlar a síntese da apo C-II e da apo C-III, que estimulam e inibem a atividade da LPL, respectivamente (Chahil & Ginsberg, 2006).

Na resistência à insulina, a ação da LHS no tecido adiposo não é suprimida, havendo maior lipólise tecidual e fluxo de ácidos graxos para o fígado, condição que, aliada ao aumento da lipogênese, é responsável pelo aumento das concentrações plasmáticas de VLDL. Essas condições favorecem a formação de partículas de lipoproteínas maiores, com conteúdo aumentado de triglicérides, que, associadas à redução na atividade da LPL, resultam na diminuição do seu catabolismo e consequente hipertrigliceridemia (Ginsberg et al., 2005; Adiels et al., 2008).

Da mesma forma que ocorre no fígado, a síntese de QM no enterócito aumenta na resistência à insulina, traduzindo-se em maior produção intestinal de partículas ricas em apo B-48, e contribuindo também para a elevação da trigliceridemia (Duez et al., 2006). No intestino, a insulina regula a secreção de QM por controlar a degradação da apo B-48 (Levy et al., 1996). Há aumento da secreção intestinal de lipoproteínas contendo apo B-48 na resistência à insulina (Guo et al., 2005) e no DM 2 (Curtin et al., 1996), que contribui com a hiperlipidemia pós-prandial, evidenciados em modelos animais (Haidari et al., 2002) e humanos (Duez et al., 2006).

O intestino é um importante sítio de produção de TG. Em modelos animais de resistência à insulina, como *hamsters* alimentados com frutose,

demonstrou-se aumento da lipogênese intestinal por ativação do fator de transcrição SREBP-1c (Federico et al., 2006).

A maior concentração plasmática de VLDL, QM e seus remanescentes provoca o aumento da troca de TG dessas partículas por colesterol esterificado das HDL mediada CETP. Além disso, o maior conteúdo de triglicérides das HDL estimula a atividade da lipase hepática, convertendo as HDL em partículas pequenas e densas (Ginsberg et al., 2005; Adiels et al., 2008). Nessas partículas, quanto menor a ligação de lípides à apo A-I, maior a sua degradação pelos rins, levando à redução das concentrações plasmáticas de HDL observada em pacientes diabéticos (Chapman, 2007).

Existe preponderância de LDL pequenas e densas em pacientes diabéticos (Stewart et al., 1993; Guérin et al., 2001; Garvey et al., 2003). A geração dessas partículas deve-se também ao aumento da concentração plasmática de partículas ricas em triglicérides, ou seja, QM e VLDL, notadamente as VLDL por permanecerem na circulação por longos períodos, permitindo a transferência de triglicérides para as LDL, as quais são substrato para a lipase hepática (Ginsberg et al., 2005; Adiels et al., 2008). O produto final deste processo é a formação de partículas pequenas e densas, que penetram facilmente na parede arterial, onde são suscetíveis à oxidação e glicação e possuem maior afinidade de ligação aos proteoglicanos, sendo captadas pelo macrófagos e, por isso, mais aterogênicas (Chapman, 2007; Mazzone et al., 2008; Younis et al., 2009).

Modificações químicas e na composição das LDL desempenham um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose no DM. Os processos de oxidação, glicação, agregação ou incorporação em imunocomplexos (Tabas, 1999; Gleissner et al., 2007) tornam essas partículas reconhecíveis pelos receptores *scavenger* dos macrófagos, os quais as internalizam, levando à formação de células espumosas (Pennings et al., 2006; Daugherty et al., 2008).

O aumento da concentração de glicose, presente no diabetes melito, acelera a formação de produtos avançados de glicação (AGE) (Lapolla et al., 2003; Thornalley, 2005; Younis et al., 2008). A glicação da LDL envolve a ligação covalente não-enzimática entre açúcares redutores e grupos aminorreativos (como os resíduos de lisina e arginina) da apo B-100, (Lyons & Jenkins, 1997; Baynes & Thorpe, 2000; Younis et al., 2008). O produto intermediário dessa reação é uma base de Schiff, a qual sofre rearranjos moleculares, resultando na formação de produtos Amadori, mais estáveis (Baynes & Thorpe, 2000). A autooxidação da glicose e a degradação da base de Schiff e do produto Amadori geram compostos dicarbonila, como metilglioxal, glioxal e glicolaldeído. Estes produtos são altamente reativos e possuem habilidade de se ligar com o grupo amino de proteínas e lípidos (Frye et al., 1998; Thornalley, 2005). A perpetuação da reação ao longo do tempo leva à geração de AGE, os quais são capazes de alterar a estrutura e a função de diversas macromoléculas de maneira irreversível (Baynes & Thorpe, 2000).

As LDL glicadas não são removidas pelo receptor de LDL, mas pelos receptores *scavenger* e por receptores específicos para AGE dos macrófagos e das células endoteliais, levando ao acúmulo celular de colesterol e à formação de células espumosas (Younis et al., 2008). Brown et al. (2007) observaram acúmulo tempo-dependente de colesterol esterificado em macrófagos derivados de monócitos humanos quando estes foram incubados com LDL modificadas por metilglioxal e glicolaldeído em relação à incubação com LDL nativa. Além disso, estudos também demonstraram o aumento das concentrações de açúcares dicarbonila em lesões ateroscleróticas (Schleicher et al., 1997; Nagai et al., 2002).

Os AGE interagem com receptores RAGE, ativando vias de sinalização celulares, principalmente fator nuclear κ B (NF- κ B) (Yeh et al., 2001), que aumenta a transcrição de várias proteínas, incluindo ICAM-1, E-selectina, endotelina-1 e citocinas pró-inflamatórias (Schmidt et al., 1994; Haslbeck et al., 2004).

A formação dos AGE está associada ao aumento da geração de radicais livres de oxigênio, os quais levam a processos oxidativos das lipoproteínas (Eckel et al., 2002; Girona et al., 2008; Younis et al., 2008). Durante a oxidação da partícula de LDL, diversos produtos são formados a partir da peroxidação lipídica e da modificação da proteína. A oxidação de ácidos graxos poli-insaturados resulta na geração de dienos conjugados, seguida da decomposição em aldeídos, como o malonildialdeído. A fosfatidilcolina é degradada a lisofosfatidilcolina e o colesterol é convertido a diversos óxidos de colesterol (Scheffer et al., 2003). A formação de

hidroperóxidos a partir dos ácidos graxos linoleico e araquidônico leva à geração dos ácidos hidroperoxieicosatetranoico (HPETE) e hidroperoxioctadecadienoico (HPODE), respectivamente, os quais induzem a geração de fosfolípidos oxidados de LDL, com ação pró-inflamatória (Navab et al., 2004).

A oxidação das partículas de LDL ocorre principalmente na parede vascular e, em menor proporção, na circulação. Embora as LDL oxidadas representem uma pequena fração do total de LDL plasmática, observa-se forte relação entre LDL oxidadas circulantes e doença cardiovascular. Essas partículas induzem o estresse oxidativo em células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos, resultando na progressão da aterosclerose (Ishigaki et al., 2009).

Diversos efeitos das LDL oxidadas sobre a função dos macrófagos têm sido descritos, dentre eles o aumento da expressão e da liberação de citocinas, a quimiotaxia para monócitos e células T, a formação de auto-anticorpos, a agregação plaquetária e a toxicidade (Jessup & Kritharides, 2000; Stocker & Keaney, 2004).

Há aumento da suscetibilidade oxidativa das LDL no DM (Liguori et al., 2001; MacDonald-Wicks et al., 2004) e correlação inversa entre a concentração de LDL oxidada e o tamanho das partículas de LDL em indivíduos portadores de DM 2 (Scheffer et al., 2003). Mironova et al. (2000) constataram que a média do tamanho das LDL isoladas de indivíduos diabéticos foi significativamente menor do que a de indivíduos controles, além de apresentarem maior suscetibilidade à oxidação *in vitro* induzida por

cobre. Entretanto, não foi observada diferença quanto à extensão da glicação *in vivo* das LDL isoladas destes indivíduos. Por outro lado, em indivíduos não diabéticos demonstrou-se que partículas de LDL pequenas e densas são mais suscetíveis à glicação (Younis et al., 2009).

Lipoproteínas modificadas são removidas pelos receptores *scavenger*. Diversas classes de receptores *scavenger* reconhecem de maneira específica essas partículas, dentre elas SR-A, CD-36, SR-BI, LOX-1 e FEEL-1 (Greaves & Gordon, 2005; Moore & Freeman, 2006; Greaves & Gordon, 2009).

O receptor *scavenger* CD-36 apresenta grande distribuição celular, incluindo monócitos, macrófagos, endotélio microvascular, adipócitos, músculo esquelético e células dendríticas. Esse receptor apresenta diversos ligantes, dentre eles LDL modificadas, FL aniônicos, ácidos graxos de cadeia longa e eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum* (Greaves & Gordon, 2005; Moore & Freeman, 2006). O CD-36 apresenta alta afinidade com FL oxidados encontrados em partículas de LDL oxidadas, além de também reconhecer fosfatidilserina oxidada da superfície de células apoptóticas (Silverstein, 2009).

A exposição a LDL oxidadas leva ao aumento da expressão de CD-36 em macrófagos, promovendo, desse modo, a captação dessas partículas. Esse ciclo acelera a formação de células espumosas na íntima arterial (Silverstein, 2009).

A hiperglicemia também aumenta a expressão de CD-36 por meio de mecanismo não transcricional, podendo contribuir para o estado pró-aterosclerótico observado no DM (Silverstein, 2009).

Outro receptor implicado na remoção de proteínas modificadas é o receptor SR-A. Ele é altamente expresso em células espumosas derivadas de macrófagos em placas ateroscleróticas, possuindo afinidade por LDL acetiladas, LDL oxidadas, FL aniônicos, células apoptóticas e AGE (Moore & Freeman, 2006; Greaves & Gordon, 2009). Além disso, o SR-A também atua na resposta imune, uma vez que reconhece diversos patógenos e moléculas associadas a patógenos (Moore & Freeman, 2006; Greaves & Gordon, 2009).

Juntos, os receptores SR-A e CD-36 são responsáveis pela preponderância na captação de lipoproteínas modificadas (Greaves & Gordon, 2005; Pennings et al., 2006).

O receptor SR-BI, um receptor de HDL que medeia a captação seletiva de colesterol esterificado da HDL pelo fígado, é também expresso por macrófagos em lesões ateroscleróticas. Este receptor é capaz de se ligar a lipoproteínas modificadas, FL aniônicos, células apoptóticas e AGE (Moore & Freeman, 2006; Pennings et al., 2006).

Diferentemente do receptor específico para LDL (LDL-R), cuja expressão é reduzida pela elevada concentração de colesterol celular, os receptores *scavenger* não sofrem esse tipo de regulação (Brown & Goldstein, 1983; Choy et al., 2004). Desse modo, o acúmulo progressivo de

colesterol nos macrófagos leva à formação de células espumosas, que são precursoras da lesão aterosclerótica (Jessup & Kritharides, 2000; Soccio & Breslow, 2004; Daugherty et al., 2008).

Nos portadores de DM 2, as modificações nas LDL predispõem ao acúmulo de colesterol em macrófagos. Além disso, são observadas alterações na capacidade de efluxo de colesterol celular. Duell et al. (1991) demonstraram redução do efluxo de colesterol de fibroblastos humanos mediado por HDL₃ glicadas *in vitro*. Entretanto, Rashduni et al. (1999) e Passarelli et al. (2000) não observaram diferença no efluxo de colesterol de macrófagos de peritônio de camundongos mediado por HDL glicadas *in vitro* e HDL controles. A redução no efluxo de colesterol mediado por HDL₃ isoladas de portadores de DM, não foi, portanto, atribuída à modificação química desta lipoproteína por glicação precoce (Passarelli et al., 2000). Porém, outro estudo demonstrou que o efluxo de colesterol pode ser afetado pela glicação avançada da apo A-I (Hoang et al., 2007).

A influência do processo de glicação celular foi avaliada por Passarelli et al. (2005), que demonstraram inibição do efluxo para apo A-I em fibroblastos humanos e macrófagos J-774 expostos aos compostos dicarbonila, glicolaldeído e glioxal. Essa alteração foi decorrente da redução da proteína de ABCA-1, embora não tenha ocorrido alteração no seu RNA mensageiro. Estudo realizado recentemente por Mauldin et al. (2008) demonstrou redução na expressão de ABCG-1 em macrófagos isolados de indivíduos portadores de DM 2, com consequente redução do efluxo de

colesterol celular e aumento do acúmulo de colesterol celular em relação a indivíduos controles.

Alterações na capacidade antioxidante da HDL no DM 2 também foram demonstradas. Perségol et al. (2006) observaram que as HDL de indivíduos diabéticos apresentam menor capacidade de proteger contra o efeito da LDL oxidada sobre o vasorrelaxamento endotélio-dependente. Nesse estudo, o relaxamento máximo de aortas de coelhos foi maior após incubação de HDL de indivíduos controles na presença de LDL oxidada em relação à incubação com LDL oxidada somente. Porém, a adição de HDL de indivíduos diabéticos à LDL oxidada não alterou o relaxamento máximo em comparação à LDL oxidada. Não foi observada alteração na atividade da PON-1 de indivíduos diabéticos em relação a controles. A habilidade da HDL em inibir o efeito da LDL oxidada foi inversamente correlacionada ao conteúdo de triglicérides da HDL. Nobécourt et al. (2005) demonstraram que partículas de HDL₃ isoladas de indivíduos portadores de DM 2 apresentam redução em sua capacidade de proteger a LDL da oxidação por hidrocloreto de azo-amidinopropano em relação a indivíduos controles. No entanto, em nosso laboratório foi mostrado que a capacidade antioxidante da HDL₃ de indivíduos diabéticos foi semelhante a dos controles quando incubadas com um *pool* controle de LDL e sulfato de cobre. Porém, a capacidade antioxidante de HDL₂ de indivíduos portadores de DM 2 foi menor em relação à de indivíduos controles (Iborra et al., 2008).

Com base nesses dados, considera-se que o conteúdo de colesterol celular depende do influxo pela LDL e do efluxo pela HDL. Ambos os

processos são influenciados pela concentração, pela composição (lípidos, proteínas e enzimas) e pelas modificações químicas dessas lipoproteínas, além da interação entre essas partículas (LDL e HDL) no meio.

O conteúdo de colesterol na parede arterial, que determina a gênese e a progressão da aterosclerose, é resultante da relação entre a entrada e a remoção deste esteroide por diferentes classes de lipoproteínas. A modificação de LDL é determinante para o influxo de colesterol nos macrófagos, por meio dos receptores *scavenger*. Por outro lado, o efluxo de colesterol celular para as HDL, por intermédio dos receptores ABC e SR-BI, representa mecanismo ímpar de exportação do excesso de colesterol, garantindo seu transporte ao fígado e sua excreção fecal.

2. JUSTIFICATIVA

Evidências oriundas de estudos populacionais e experimentais comprovam que, no DM, o desenvolvimento de aterosclerose está relacionado à maior oferta de LDL modificada e à captação por macrófagos, aliado ao prejuízo no transporte reverso de colesterol e na capacidade antioxidante e anti-inflamatória da HDL.

Alterações na HDL podem não apenas reduzir sua capacidade antiaterogênica, mas torná-la pró-aterogênica, independentemente de sua concentração plasmática. Isto é evidenciado em diversas condições metabólicas, como inflamação, estresse pós-cirúrgico e doença arterial coronariana (DAC), nas quais a HDL passa a transportar proteínas de fase aguda e marcadores inflamatórios, em detrimento de suas apolipoproteínas (Van Lenten et al. 1995; Ansell et al., 2003).

A maior parte das pesquisas acerca do fluxo de lípidos celulares foi realizada com incubações com LDL ou HDL isoladamente. Esses estudos não levaram em conta interações potenciais entre as propriedades aterogênicas e antiaterogênicas dessas lipoproteínas, as quais podem ser alteradas no diabetes melito mal compensado.

3. OBJETIVO

Avaliar a concentração de colesterol livre e esterificado em macrófagos resultante da incubação conjunta de LDL e HDL isoladas de indivíduos portadores de DM 2 com controle glicêmico inadequado ou de controles saudáveis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Casuística

Pacientes portadores de DM 2 de ambos os sexos ($n = 11$) foram selecionados no Ambulatório de Diabetes e na Liga de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Foram incluídos neste grupo os pacientes com hemoglobina glicada (HbA_{1c}) superior a 8,5% (valor de referência $< 6,0\%$) e concentração plasmática de triglicérides abaixo de 400 mg/dL.

Indivíduos controles não diabéticos ($n = 11$) foram selecionados na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e foram incluídos os que apresentavam HbA_{1c} inferior a 6,0%, concentração plasmática de triglicérides abaixo de 400 mg/dL e estavam em uso de medicamentos.

Não foram incluídos os indivíduos com hipotireoidismo descompensado, insuficiência renal ou hepática, macroalbuminúria e etilistas.

Todos os participantes assinaram termo de consentimento informado, aprovado pela Comissão de Ética do HCFMUSP (CAPPesq n° 846/06).

4.2. Coleta de sangue e processamento

Amostra de sangue dos indivíduos foi colhida após 12 h em jejum, em tubos contendo EDTA 0,1% (10 $\mu\text{L/mL}$ de sangue). Ao plasma, obtido após centrifugação do sangue a 3000 rpm, durante 20 min, a 4°C, foram adicionadas as seguintes soluções conservantes: 2mM benzamidina (SIGMA B-6506) (5 $\mu\text{L/mL}$); 0,5% gentamicina/0,25% cloranfenicol (20 $\mu\text{L/mL}$); 0,5mM fluoreto de fenilmetil sulfonila (0,5 $\mu\text{L/mL}$) e aprotinina (SIGMA A-6270) (5 $\mu\text{L/mL}$). As dosagens bioquímicas e o isolamento das lipoproteínas por ultracentrifugação foram realizadas imediatamente após a separação do plasma.

4.3. Dosagens bioquímicas

As dosagens bioquímicas foram realizadas no aparelho automatizado COBAS MIRA (Roche Diagnostics, Basileia, Suíça). As concentrações plasmáticas glicose foram dosadas com reagente enzimático da Labtest (Minas Gerais, Brasil) e as concentrações de colesterol, HDL-colesterol (HDL-c) e TG foram determinadas com reagente Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha). O HDL-c foi obtido por método de precipitação com solução de sulfato de dextrana e cloreto de magnésio 2M (1:1) (50 μL /500 μL de plasma) (Bachorik & Albers, 1986) e o LDL-colesterol (LDL-c) foi calculado pela fórmula de Friedewald (Friedewald et al., 1972). A concentração de proteínas das lipoproteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

4.4. Separação de lipoproteínas

4.4.1. Separação de LDL e HDL dos indivíduos portadores de diabetes melito e controles

As frações de LDL ($1,019 < d < 1,063$ g/mL) e HDL ($1,063 < d < 1,21$ g/mL) foram obtidas por ultracentrifugação do plasma por gradiente descontínuo de densidade (Redgrave et al., 1975), em rotor SW 40Ti, 40.000 rpm, 4°C, por 24h, em ultracentrífuga L8 (Beckman Intr., Palo Alto, CA, EUA).

Após o isolamento, as lipoproteínas foram dialisadas contra solução de tampão fosfato (PBS), pH 7,4, contendo NaCl 150 mmol/L, Na_2HPO_4 20 mmol/L, NaH_2PO_4 14 mmol/L, NaOH 1mmol/L e EDTA 0,2 mmol/L.

As lipoproteínas foram esterilizadas em filtros 0,22 μm e estocadas a 4°C. Alíquotas de HDL foram congeladas a -70°C para posterior análise de sua composição.

4.4.2. Obtenção de *pool* de LDL e *pool* de HDL de indivíduos controles

As lipoproteínas *pools* foram obtidas do plasma de sete indivíduos saudáveis por meio de ultracentrifugação sequencial, em rotor 50 Ti, $100.000 \times g$, 4°C, segundo descrito por Havel et al. (1955). Primeiramente, o plasma foi ultracentrifugado por 20 horas para o isolamento das VLDL e IDL ($d < 1,019$ g/mL). Em seguida, a densidade do plasma foi ajustada para

1,063 g/mL com brometo de potássio, e ultracentrifugada por mais 20 horas, obtendo-se a fração de LDL. Finalmente, a densidade do plasma foi ajustada para 1,21 g/mL com brometo de potássio, e ultracentrifugada por 40 horas, para a obtenção da fração de HDL.

Depois de isoladas, as lipoproteínas *pools* foram dialisadas contra solução de tampão fosfato (PBS), contendo NaCl 150 mmol/L, Na_2HPO_4 20 mmol/L, NaH_2PO_4 14 mmol/L, NaOH 1mmol/L e EDTA 0,2 mmol/L (pH 7,4). Essas lipoproteínas foram esterilizadas em filtros 0,22 μm e estocadas a 4°C.

4.5. Composição da HDL

O conteúdo de colesterol total, triglicérides, fosfolípidos e apo A-I das HDL isoladas de indivíduos controles (n = 9) ou portadores de DM 2 (n = 9) foi determinado por método enzimático colorimétrico em aparelho automatizado COBAS MIRA (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), por kits da Roche Diagnostics (Mannheim, Alemanha) para colesterol total e triglicérides, da WAKO Chemicals GmbH (Richmond, EUA) para fosfolípidos e da RANDOX (Crumlin, Inglaterra) para apo A-I.

4.6. Cultura de células

4.6.1. Obtenção de macrófagos de peritônio de camundongos

Macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem suíça, provenientes da Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP. Infundiu-se 6 mL de solução estéril de PBS (pH 7,4), acrescido de penicilina e estreptomicina na cavidade peritoneal de cada animal. Após aspiração, a solução foi centrifugada a 1500 rpm, durante 2 minutos, a 4°C. O botão celular foi ressuspenso em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), 100 U/mL de penicilina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) e 2 mM glutamina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA).

As células foram colocadas em placas de cultura de seis poços (30 mm/poço), com a concentração de $3,0 \times 10^6$ células por placa, e mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, por 24 h. Após esse período, as células foram lavadas, por duas vezes, com PBS contendo 1% de albumina, e mantidas em DMEM (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 1 mg/mL de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), por mais 24h.

4.6.2. Incubações

As células foram incubadas, em no mínimo triplicatas, durante 48 h, em DMEM acrescido de 100 µg/mL de proteína de LDL isoladamente ou simultaneamente com HDL de acordo com o seguinte protocolo:

- ✓ LDL de indivíduos controles: LDL(C)
- ✓ LDL + HDL de indivíduos controles: LDL(C) + HDL(C)
- ✓ LDL de indivíduos controles + HDL *pool*: LDL(C) + HDL(C) *pool*
- ✓ LDL de pacientes diabéticos: LDL(D)
- ✓ LDL + HDL de pacientes diabéticos: LDL(D) + HDL(D)
- ✓ LDL de pacientes diabéticos + HDL *pool*: LDL(D) + HDL(C) *pool*

Para cada ensaio, foram mantidas células sem incubações com lipoproteínas, a fim de se determinar o conteúdo de colesterol celular na ausência destas.

4.7. Medida do conteúdo celular de lípidos

Após 48 h de incubação, o meio de cultura foi removido e os lípidos celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os extratos foram secos sob nitrogênio e, em seguida, ressuspensos em clorofórmio dissolvidos na solução acetonitrila:isopropanol (1:1) (Merck, Darmstadt, Alemanha). O conteúdo celular de colesterol livre e colesterol esterificado foi determinado por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) no cromatógrafo Agilent

1100. Foram injetados 20µL de amostra da extração, pelo injetor automático, e eluída isocraticamente em fluxo de 1mL/min, por 30 minutos, com acetonitrila-isopropanol (50:50 v/v) em coluna Hypersil ODS (C18, 4.6x 250mm, 5 micron - Ag-7992618-585) (Agilent, Alemanha) com protegida pré coluna Agilent Eclisep XDB-C8 (4,6 x 12,5 mm, 5micron - AG 820950-926). Os picos foram detectados por absorção UV em 210 nm, integrados por meio do software CHEMSTATION (Agilent, Alemanha), e a concentração do colesterol livre e esterificado foi determinada por uma curva padrão de colesterol livre, linoleato, oleato e palmitato.

Após a extração do colesterol celular, as células foram lisadas pela adição de NaOH 0,2 N. A concentração de proteína do lisado celular foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

As concentrações de colesterol livre e de colesterol esterificado foram corrigidas pela concentração de proteína celular. Os valores obtidos das células incubadas com as lipoproteínas foram subtraídos do valor da medida de colesterol das células incubadas sem lipoproteínas. Os resultados são apresentados em microgramas de colesterol por miligrama de proteína celular.

4.8 Marcação de HDL com ^3H colesterol oleoil éter

HDL *pools* isoladas de indivíduos controles ou de portadores de DM 2 foram marcadas radioativamente com $[1\alpha, 2\alpha (n)\text{-}^3\text{H}]$ colesterol oleoil éter (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, Inglaterra), de acordo com o protocolo modificado de Terpstra et al. (1989). Para cada 1 mL de HDL foram adicionados 0,5 mL de plasma isento de lipoproteínas (como fonte de proteínas de transferência de colesterol) e 40 μCi de ^3H colesterol oleoil éter. Após agitação lenta, durante 5 minutos, à temperatura ambiente, as amostras foram colocadas em banho a 37°C , sob agitação lenta, durante 24 horas.

Em seguida, as HDL *pools* foram reisoladas por ultracentrifugação sequencial, em rotor 50 Ti, $100.000 \times g$, 4°C , por 40h, segundo descrito por Havel et al. (1955).

As HDL *pools* foram dialisadas contra solução de tampão fosfato (PBS), esterilizadas em filtro $0,22 \mu\text{m}$ e armazenadas a 4°C .

Foram realizadas dosagens de colesterol para cálculo da atividade específica, e de proteínas para a realização das incubações.

4.9. Incubação das HDL marcadas radioativamente

Macrófagos de peritônio de camundongos foram incubados, em sextuplicatas, durante 48 h, em DMEM (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) acrescido de $100 \mu\text{g/mL}$ de proteína de LDL isolada ou simultaneamente com HDL, de acordo com o seguinte protocolo:

✓ HDL *pool* de indivíduos controles marcado com ^3H colesterol oleoil éter: ^3H -C-éter-HDL(C) *pool*

✓ LDL *pool* de indivíduos controles + HDL *pool* de indivíduos controles marcado com ^3H colesterol oleoil éter: LDL(C) *pool* + ^3H -C-éter-HDL(C) *pool*

✓ HDL *pool* de pacientes diabéticos marcado com ^3H colesterol oleoil éter: ^3H -C-éter-HDL(D) *pool*

✓ LDL *pool* de indivíduos diabéticos + HDL *pool* de pacientes diabéticos marcado com ^3H colesterol oleoil éter: LDL(D) *pool* + ^3H -C-éter-HDL(D) *pool*

Após 48 h de incubação, o meio de cultura foi removido, os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e transferidos para frascos de cintilação. Após a evaporação do solvente, adicionou-se solução cintiladora Opti Phase Hi Safe 3 (Fisher Chemicals, Inglaterra) e a radioatividade beta foi determinada em contador LS 6000 TA (Beckmann Instruments, Inc., EUA). A concentração de proteína celular foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) após lise celular com 0,2 N de NaOH.

4.10. Análise Estatística

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP). A comparação dos resultados entre os indivíduos controles e portadores de diabetes melito foi analisada por teste t de Student não pareado. As comparações dos parâmetros no mesmo grupo (controle ou DM 2) foram realizadas por Análise de Variância (ANOVA) de um fator com pós-teste de Newman-Keuls. As médias de todos os parâmetros foram consideradas diferentes para o nível descritivo de significância inferior a 5 %.

5. RESULTADOS

5.1. Casuística

Foram analisadas as lipoproteínas de 11 pacientes portadores de DM 2 mal compensados e comparadas com as de 11 indivíduos controles saudáveis (C). A casuística e os dados antropométricos dos indivíduos C e DM 2 são apresentados na **Tabela 1**. Os medicamentos utilizados pelos portadores DM 2 foram: metformina (8); sulfonilureias (8); glitazona (4); acarbose (3); insulina NPH (5); insulina lispro (3); ácido acetilsalicílico (8); inibidores da ECA (8); bloqueadores do receptor AT1 (2); beta-bloqueadores (5); diuréticos (8); estatinas (7); ezetimibe (1) e vasodilatador coronariano (1).

Os indivíduos DM 2 apresentaram maior média de idade e de índice de massa corpórea (IMC) em relação aos indivíduos C. Não houve diferença na média de peso entre os dois grupos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Casuística e dados antropométricos dos indivíduos controles e portadores de DM 2; média $\pm$ EP.

	C (n = 11)	DM 2 (n = 11)
Sexo (F/M)	8/3	7/4
Idade (anos)	32 $\pm$ 3	60 $\pm$ 3 ^a
Peso (Kg)	73,8 $\pm$ 5,4	79,1 $\pm$ 4,7
IMC (Kg/m²)	25,2 $\pm$ 1,1	31,5 $\pm$ 1,6 ^b

IMC = Índice de Massa Corpórea.

Teste t de *Student*: ^a p < 0,0001; ^b p < 0,005

5.2. Dados bioquímicos

No grupo DM 2, os valores da HbA_{1c} estavam de acordo com o estabelecido no critério de inclusão, com média de $10,8 \pm 0,5\%$ comparado a $5,4 \pm 0,2\%$ do grupo C. Em decorrência do DM mal compensado, os valores de glicemia e trigliceridemia também foram mais elevados no grupo DM 2. As concentrações de CT, HDL-c e LDL-c não diferiram entre os grupos DM 2 e C (**Tabela 2**).

Tabela 2. Valores de HbA_{1c} e concentrações plasmáticas de glicose, CT, LDL-c, HDL-c e TG dos indivíduos C e portadores de DM 2; média $\pm$ EP.

	C (n = 11)	DM 2 (n = 11)
HbA_{1c} (%)	$5,4 \pm 0,2$	$10,8 \pm 0,5^a$
Glicose (mg/dL)	91 ± 2	227 ± 26^a
CT (mg/dL)	163 ± 5	177 ± 10
LDL-c (mg/dL)	96 ± 5	99 ± 9
HDL-c (mg/dL)	50 ± 4	47 ± 5
TG (mg/dL)	89 ± 15	150 ± 24^b

Teste t de *Student*: ^a $p < 0,0001$; ^b $p < 0,05$

5.3. Composição da HDL

O conteúdo de CT, TG e FL das HDL isoladas de indivíduos C (n = 9) não diferiu das HDL isoladas de indivíduos DM 2 (n = 9). Entretanto, o grupo DM 2 apresentou maior relação entre lípides e apo A-I (CT + TG/ Apo A-I e CT + TG + FL/ Apo A-I), decorrente da menor concentração de apo A-I, cuja significância foi limítrofe (p = 0,054).

Tabela 3. Composição das HDL de indivíduos C e DM 2; média $\pm$ EP.

	C (n = 9)	DM 2 (n = 9)	p
CT (mg/dL)	55,1 $\pm$ 5,8	48,0 $\pm$ 7,1	0,448
TG (mg/dL)	15,9 $\pm$ 2,4	16,0 $\pm$ 1,3	0,961
FL (mg/dL)	146,1 $\pm$ 11,4	122,8 $\pm$ 10,4	0,151
Apo A-I (mg/dL)	155,9 $\pm$ 12,2	109,0 $\pm$ 19,0	0,054
CT/ Apo A-I	0,35 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,10	0,113
TG/ Apo A-I	0,10 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,05	0,050
CT + TG/ Apo A-I	0,45 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,14	0,024
CT + TG + FL/ Apo A-I	1,39 $\pm$ 0,03	2,19 $\pm$ 0,44	0,024

Teste t de *Student*

5.4. Medida do conteúdo celular de lípides

Em todos os ensaios foi realizada a quantificação do conteúdo de colesterol nas células na ausência de lipoproteínas, que identificou apenas a presença de colesterol livre. Estes valores foram subtraídos das medidas realizadas após a adição das lipoproteínas.

A **Tabela 4** mostra os valores médios de colesterol total após as incubações das lipoproteínas isoladas de indivíduos C com macrófagos de peritônio de camundongos, durante 48 horas. Observa-se que o conteúdo celular de colesterol total não apresentou diferença entre as incubações com LDL(C) vs LDL(C) + HDL(C). Entretanto, o conteúdo celular de colesterol total foi menor na incubação com LDL(C) + HDL(C) *pool* em relação a LDL(C) + HDL(C) ($p = 0,035$). Essa diferença deve-se à redução do conteúdo celular de colesterol livre ($p = 0,027$). Não se observou alteração no conteúdo celular de colesterol esterificado entre as incubações com as lipoproteínas do grupo C: LDL(C) vs LDL(C) + HDL(C) vs LDL(C) + HDL(C) *pool*, porém a significância foi limítrofe ($p = 0,051$).

Tabela 4. Conteúdo celular de colesterol total, livre e esterificado em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com lipoproteínas isoladas de indivíduos controles ($n = 11$); média $\pm$ EP.

Incubações	Colesterol total	Colesterol livre	Colesterol esterificado
(µg/mg de proteína celular)			
LDL(C)	351 $\pm$ 69	112 $\pm$ 14	240 $\pm$ 58
LDL(C) + HDL(C)	457 $\pm$ 95	131 $\pm$ 24	326 $\pm$ 73
LDL(C) + HDL(C) <i>pool</i>	266 $\pm$ 66 ^a	89 $\pm$ 16 ^b	176 $\pm$ 53

ANOVA de um fator com pós-teste de Newman-Keuls:

^a $p = 0,035$ LDL(C) + HDL(C) *pool* vs LDL(C) + HDL(C)

^b $p = 0,027$ LDL(C) + HDL(C) *pool* vs LDL(C) + HDL(C)

A medida do conteúdo celular de colesterol linoleato foi maior na incubação LDL(C) + HDL(C) vs LDL(C) + HDL(C) *pool* ($p = 0,038$). As concentrações de colesterol oleato e de colesterol palmitato não diferiram entre as incubações das lipoproteínas do grupo C (**Tabela 5**).

Tabela 5. Conteúdo celular de colesterol linoleato, oleato e palmitato em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com lipoproteínas isoladas de indivíduos C ($n = 11$); média $\pm$ EP.

Incubações	Colesterol linoleato	Colesterol oleato	Colesterol palmitato
	(µg/mg de proteína celular)		
LDL(C)	170 $\pm$ 39	37 $\pm$ 10	33 $\pm$ 11
LDL(C) + HDL(C)	234 $\pm$ 52 ^a	48 $\pm$ 11	44 $\pm$ 12
LDL(C) + HDL(C) <i>pool</i>	120 $\pm$ 38	25 $\pm$ 9	31 $\pm$ 10

ANOVA de um fator com pós-teste de Newman-Keuls:

^a $p = 0,038$ LDL(C) + HDL(C) vs LDL(C) + HDL(C) *pool*

Nas incubações com as lipoproteínas dos pacientes portadores de DM 2, observou-se maior conteúdo celular de colesterol total com LDL(D) + HDL(D) em comparação com LDL(D) ($p = 0,033$) (**Tabela 6**). Não houve diferença no conteúdo celular de colesterol livre, porém se observou que o conteúdo celular de colesterol esterificado foi maior na incubação com LDL(D) + HDL(D) em comparação com as incubações com LDL(D) isoladamente ou LDL(D) + HDL(C) *pool* ($p = 0,023$). O conteúdo celular de colesterol total, livre ou esterificado não diferiu entre LDL(D) e LDL(D) + HDL(C) *pool*.

Tabela 6. Conteúdo celular de colesterol total, livre e esterificado em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com lipoproteínas isoladas de indivíduos DM 2 ($n = 11$); média $\pm$ EP.

Incubações	Colesterol total	Colesterol livre	Colesterol esterificado
(µg/mg de proteína celular)			
LDL(D)	356 $\pm$ 73	148 $\pm$ 32	209 $\pm$ 51
LDL(D) + HDL(D)	607 $\pm$ 99 ^a	177 $\pm$ 21	430 $\pm$ 86 ^b
LDL(D) + HDL(C) <i>pool</i>	363 $\pm$ 90	154 $\pm$ 33	208 $\pm$ 70

ANOVA de um fator com pós-teste de Newman-Keuls:

^a $p = 0,033$ LDL(D) + HDL(D) vs LDL(D)

^b $p = 0,023$ LDL(D) + HDL(D) vs LDL(D) e LDL(D) + HDL(D) vs LDL(D) + HDL(C) *pool*

O maior acúmulo de colesterol esterificado na incubação de LDL(D) + HDL(D) comparado com LDL(D) isoladamente ou LDL(D) + HDL(C) *pool* ocorreu devido ao aumento no conteúdo de colesterol linoleato ($p = 0,025$) e colesterol oleato ($p = 0,014$). Não se observou diferença no conteúdo celular de colesterol palmitato (**Tabela 7**).

Tabela 7. Conteúdo celular de colesterol linoleato, oleato e palmitato em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com lipoproteínas isoladas de indivíduos DM 2 ($n = 11$); média $\pm$ EP.

Incubações	Colesterol linoleato	Colesterol oleato	Colesterol palmitato
	(µg/mg de proteína celular)		
LDL(D)	129 $\pm$ 35	23 $\pm$ 8	57 $\pm$ 23
LDL(D) + HDL(D)	292 $\pm$ 68 ^a	47 $\pm$ 9 ^b	92 $\pm$ 28
LDL(D) + HDL(C) <i>pool</i>	136 $\pm$ 48	24 $\pm$ 10	49 $\pm$ 29

ANOVA de um fator com pós-teste de Newman-Keuls:

^a $p = 0,025$ LDL(D) + HDL(D) vs LDL(D) e LDL(D) + HDL(D) vs LDL(D) + HDL(C) *pool*

^b $p = 0,014$ LDL(D) + HDL(D) vs LDL(D) e LDL(D) + HDL(D) vs LDL(D) + HDL(C) *pool*

As comparações entre C e DM 2 não mostraram diferença nos conteúdos de colesterol total, colesterol esterificado e colesterol livre entre as incubações: LDL(C) vs LDL(D); LDL(C) + HDL(C) vs LDL(D) + HDL(D); LDL(C) + HDL(C) *pool* vs LDL(D) + HDL(C) *pool* (**Figuras 2, 3 e 4**). Da mesma forma, o conteúdo de colesterol linoleato, colesterol oleato e colesterol palmitato também não foi diferente (**Tabelas 5 e 7**).

Os macrófagos incubados com LDL(D) + HDL(D) em comparação com LDL(C) + HDL(C) *pool* apresentaram maior conteúdo de colesterol total ($p = 0,01$), colesterol livre ($p = 0,003$) e colesterol esterificado ($p = 0,02$) (**Figuras 2, 3 e 4**). A maior concentração de colesterol esterificado foi consequente do aumento do colesterol linoleato ($p = 0,038$), sem modificação no conteúdo celular de colesterol oleato e colesterol palmitato (**Tabelas 5 e 7**).

Figura 2. Conteúdo celular de colesterol total. Macrófagos de peritônio de camundongos foram incubados com LDL de indivíduos controles ($n = 11$) ou DM 2 ($n = 11$), isoladamente ou na presença da HDL do mesmo indivíduo ou de HDL(C) *pool*, durante 48 horas. Os lípidos celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) e ressuspensos em clorofórmio e solução de acetonitrila:isopropanol (1:1). O conteúdo celular de colesterol foi determinado por HPLC (média $\pm$ EP). ^a $p = 0,035$, ANOVA de um fator; ^b $p = 0,033$, ANOVA de um fator; ^c $p = 0,01$, teste t de *Student*.

Figura 3. Conteúdo celular de colesterol livre. Macrófagos de peritônio de camundongos foram incubados com LDL de indivíduos controles ($n = 11$) ou DM 2 ($n = 11$), isoladamente ou na presença da HDL do mesmo indivíduo ou de HDL(C) *pool*, durante 48 horas. Os lípidos celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) e ressuspensos em clorofórmio e solução de acetonitrila:isopropanol (1:1). O conteúdo celular de colesterol foi determinado por HPLC (média $\pm$ EP). ^a $p = 0,027$, ANOVA de um fator; ^b $p = 0,003$, teste t de *Student*.

Figura 4. Conteúdo celular de colesterol esterificado. Macrófagos de peritônio de camundongos foram incubados com LDL de indivíduos controles (n = 11) ou DM 2 (n = 11), isoladamente ou na presença da HDL do mesmo indivíduo ou de HDL(C) *pool*, durante 48 horas. Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) e ressuspensos em clorofórmio e solução de acetonitrila:isopropanol (1:1). O conteúdo celular de colesterol foi determinado por HPLC (média ± EP). ^a p = 0,023, ANOVA de um fator; ^b p = 0,02, teste t de *Student*.

5.5. Captação de ^3H colesteril oleoil éter de HDL(C) *pool* e HDL(D) *pool* por macrófagos

A partir das medidas de radioatividade presentes nos macrófagos incubados com ^3H colesteril oleoil éter (^3H -C-éter-HDL(C) *pool* ou ^3H -C-éter-HDL(D) *pool*) na presença ou ausência de LDL(C) *pool* ou LDL(D) *pool* e da atividade específica do colesterol da HDL, determinou-se a massa de colesterol celular proveniente da HDL. Observou-se que a quantidade de colesterol celular proveniente das HDL corresponde a cerca de 10% da massa total de colesterol celular, independentemente da presença de LDL. Os resultados foram semelhantes entre controles e DM 2 (**Tabela 8**).

Tabela 8. Conteúdo celular de colesterol em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com ^3H -C-éter-HDL(C) *pool* ou com ^3H -C-éter-HDL(D) *pool*, isoladamente ou na presença de LDL *pool* (C) ou (D) respectivamente.

	Colesterol total (μg colesterol/mg proteína celular)
	C
^3H -C-éter-HDL(C) <i>pool</i>	31,9
LDL(C) <i>pool</i> + ^3H -C-éter-HDL(C) <i>pool</i>	29,8
	DM 2
^3H -C-éter-HDL(D) <i>pool</i>	27,5
LDL(D) <i>pool</i> + ^3H -C-éter-HDL(D) <i>pool</i>	26,7

6. DISCUSSÃO

No DM, modificações glicoxidativas nas LDL provocam maior captação destas partículas pelos macrófagos. No entanto, nestas células, o conteúdo de colesterol é determinado pelo balanço entre a captação de LDL e a remoção pelas HDL. Além disso, as HDL limitam o acesso das LDL aos macrófagos, por minimizarem sua modificação oxidativa (Barter et al., 2004; Ansell et al., 2005; Sviridov et al., 2008).

O presente estudo avaliou o conteúdo de colesterol em macrófagos resultante da incubação conjunta de LDL e HDL provenientes de pacientes com DM 2 mal compensados ou de indivíduos controles saudáveis.

As lipoproteínas foram isoladas dos pacientes diabéticos e de indivíduos controles que não foram agrupados quanto a idade e características físicas, visto que o pareamento ocorreu com as concentrações das lipoproteínas *in vitro*. Os valores plasmáticos de colesterol e triglicérides estão de acordo com os critérios de inclusão, apesar do grupo DM 2 apresentar valores mais elevados de TG, o que é característico da dislipidemia do diabetes mal controlado.

O controle glicêmico inadequado no grupo DM 2 é evidenciado pela concentração média da HbA_{1c}. Tames et al. (1992) demonstraram correlação positiva entre a concentração plasmática de LDL glicada e os valores de hemoglobina glicada, assim como de glicemia em jejum. A glicação da LDL condiciona meia-vida mais longa a estas partículas, devido à menor

afinidade pelos receptores B/E. Em consequência, as LDL glicadas são removidas pelos diversos tipos de receptores *scavenger* de macrófagos, células mesangiais e endoteliais (Younis et al., 2008).

Ao contrário da maioria dos estudos, nos quais ocorreu maior captação de LDL de indivíduos diabéticos pelos macrófagos, não observamos diferenças no conteúdo de colesterol esterificado e livre nos macrófagos incubados com LDL de controles ou diabéticos, apesar da alta concentração de HbA_{1c} no grupo DM 2.

Lyons et al. (1987) demonstraram maior taxa de esterificação de colesterol em macrófagos derivados de monócitos humanos, utilizando ¹⁴C-oleato, além de maior conteúdo celular de colesterol total e esterificado, medido por cromatografia gás-líquido (GLC), quando incubados com LDL de indivíduos diabéticos tipo 1 (HbA_{1c} 8,2 ± 0,6%) comparados com LDL controles. Da mesma forma, foi observada maior formação de colesterol esterificado em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com ¹⁴C-oleato e LDL de pacientes com DM 2 ou LDL glicadas *in vitro* (Makita et al., 1999). Em ambos os casos, a maior atividade da ACAT é secundária à maior captação de LDL colesterol.

Maior acúmulo de colesterol em macrófagos foi induzido por LDL modificadas *in vitro* por metilglioxal e glicolaldeído em comparação à LDL nativa (Brown et al., 2007). Os resultados discordantes aos do presente estudo podem ter sido decorrentes do intenso grau de modificação das LDL obtido pela incubação com aldeídos reativos. Em nosso estudo, os pacientes portadores DM 2 mal compensados estavam utilizando medicamentos que

não foram suspensos para as análises. Isto pode ter minimizado os processos glicoxidativos nas LDL, de modo a limitar a captação pelos macrófagos.

A HDL apresenta importante papel no controle do conteúdo de colesterol celular, graças à remoção deste esteroide e a seu direcionamento ao fígado e órgãos esteroideogênicos. Desse modo, seria esperado observar menor concentração de colesterol nos macrófagos mediante incubação com LDL(C) + HDL(C) ou LDL(C) + HDL(C) *pool* comparados com LDL(C) isoladamente. Entretanto, não observamos diferenças, exceto na presença de HDL(C) *pool* em comparação as HDL(C) individuais. Esse fato pode ter sido decorrente da variabilidade interindividual das HDL na remoção do colesterol celular, o que pode ter sido atenuado pela utilização do *pool* de HDL.

De maneira geral, os estudos que avaliaram a remoção celular de colesterol foram realizados com prévia sobrecarga de colesterol por meio de LDL modificadas. Nessas condições, sabe-se que o excesso de colesterol nas células estimula a síntese dos transportadores ABCA-1 e ABCG-1, favorecendo a remoção do colesterol pelas apo A-I e HDL, respectivamente (Wang et al., 2006; Schwartz et al., 2000). No presente estudo, a utilização de macrófagos sem sobrecarga de colesterol demonstrou que as incubações com LDL em conjunto com HDL não modificaram o conteúdo celular de colesterol, comparadas com LDL isoladamente. A presença de HDL(C) *pool* no meio reduziu a concentração celular do colesterol livre, o que sugere a

sua mobilização para HDL por difusão. Contudo, este processo não parece ter sido suficiente para alterar o conteúdo de colesterol esterificado.

Surpreendentemente, no DM 2 observou-se aumento do conteúdo celular de colesterol após incubação com LDL(D) + HDL(D) em comparação com LDL(D) apenas, ou na presença de HDL(C) *pool*. Da mesma forma, a incubação com HDL(D) provocou maior acúmulo de colesterol em comparação com LDL(C) + HDL(C) *pool*. Estes achados demonstram que a HDL(D) não foi capaz de remover o colesterol, e, pelo contrário, favoreceu o acúmulo nos macrófagos.

As incubações dos macrófagos com ^3H -C-éter-HDL(C) *pool* ou ^3H -C-éter-HDL(D) *pool* demonstraram baixa captação de colesterol proveniente de HDL, sem apresentar diferença quando incubadas simultaneamente com LDL. Adicionalmente, em incubações de HDL(D) ou HDL(C) isoladamente com macrófagos, não foi observada alteração no conteúdo de colesterol livre e não foi detectado colesterol esterificado, determinado por HPLC. Portanto, a contribuição da captação de HDL para o *pool* de colesterol celular foi mínima, sendo este determinado principalmente pela captação de LDL.

Os estudos referentes à remoção de colesterol celular nos indivíduos diabéticos são controversos. Passarelli et al. (2000) demonstraram redução da capacidade de efluxo de ^{14}C -colesterol celular por *pool* de HDL₃ isolados de indivíduos portadores de DM 2 mal compensados em relação ao de indivíduos controles saudáveis. Resultado semelhante foi observado por Attia et al. (2007), que avaliaram o efluxo de ^3H -colesterol em células Fu5AH, para soro de indivíduos portadores de DM 2 com ou sem DAC e

indivíduos controles saudáveis. Neste último estudo, o grupo DM 2 com DAC apresentou 20% de redução no efluxo em relação ao grupo controle, enquanto que o grupo DM 2 sem DAC apresentou 13,5% de redução no efluxo em relação ao grupo controle. Todavia, em outra investigação em pacientes com DM 2 com hemoglobina glicada < 7,0%, comparados com indivíduos não diabéticos pareados por idade, gênero e IMC, não houve diferença no efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos de peritônio de camundongos para HDL₃ (Ribeiro et al., 2008). Por outro lado, de Vries et al. (2008) demonstraram aumento no efluxo de ^3H -colesterol celular para o plasma de indivíduos diabéticos hipertrigliceridêmicos em relação a indivíduos diabéticos normotrigliceridêmicos e controles saudáveis. A maior taxa de efluxo de colesterol celular foi aí associada à maior concentração plasmática de pré-beta HDL nos hipertrigliceridêmicos e, provavelmente, pode ter sido devida à interferência de outros componentes do plasma que não foram avaliados.

Assim como as LDL, as partículas de HDL também podem sofrer modificações químicas e estruturais que afetam sua funcionalidade e sua capacidade ateroprotetora (Ferretti et al., 2006; Ansell et al., 2007; Feng & Li, 2009). De forma semelhante à oxidação da LDL, a HDL pode ser oxidada devido à presença de radicais livres na placa aterosclerótica (Feng & Li, 2009). Nesse caso, a formação de produtos de peroxidação, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, dienos conjugados e hidróxidos lipídicos está associada a alterações nas propriedades físicas da HDL e na

conformação de apolipoproteínas (Ferretti et al., 2006; Ansell et al., 2007; Feng & Li, 2009).

Outros processos, como glicação e modificações enzimáticas por mieloperoxidase, metaloproteinases de matriz e lipase endotelial também alteram a funcionalidade da HDL (Ferretti et al., 2006; Feng & Li, 2009). Todas essas modificações da HDL são acompanhadas por alteração de suas atividades biológicas e de suas enzimas, ocasionando a perda de sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória e ateroprotetora (Ferretti et al., 2006; Feng & Li, 2009).

Alterações na composição lipídica e proteica das HDL de indivíduos portadores de DM 2 têm sido demonstradas, podendo estar relacionadas à redução da capacidade antiaterogênica dessas partículas. Syväne et al. (1995) observaram concentração aumentada de TG e reduzida de CL nas HDL₂ de pacientes diabéticos portadores de doença arterial coronariana em comparação com indivíduos controles saudáveis.

A maior relação CT+TG+FL/apo A-I na HDL do grupo DM 2 comparada com o controle está de acordo com os dados já demonstrados na literatura. Gowri et al. (1999) demonstraram que as HDL₂ de pacientes diabéticos eram enriquecidas em TG e apresentavam conteúdo reduzido de CL e apo A-I. Essas alterações foram relacionadas à menor capacidade das HDL₂ de pacientes diabéticos em inibirem a oxidação da LDL. No presente estudo, observamos menor concentração relativa de apo A-I na fração de HDL(D) comparada com HDL(C), o que pode contribuir para a alteração da sua funcionalidade.

No DM 2 a redução da capacidade antiaterogênica da HDL deve-se também à menor concentração e à atividade antioxidante da apo A-I e de outras moléculas ligadas à HDL, como PON-1, PAF-AH e glutathione peroxidase (Mackness et al., 1998; Letellier et al., 2002; Mastorikou et al., 2006). Isso confere menor capacidade em remover ou inibir hidroperóxidos das LDL (Assmann & Gotto, 2004; Nègre-Salvayre et al., 2006; Sviridov et al., 2008).

Rosenblat et al. (2006) demonstraram que, em indivíduos diabéticos, a maior parte da PON-1 apresenta-se dissociada da HDL, tendo sido encontrada numa fração do soro isenta de lipoproteínas. Esta fração exerce menor proteção contra a peroxidação lipídica das LDL. Mastorikou et al. (2006) observaram que a HDL de indivíduos DM 2 apresentou menor capacidade em metabolizar fosfolípidos oxidados das LDL, em relação às HDL dos indivíduos controles. Em estudo *in vitro*, demonstrou-se que a PON-1 glicada apresenta capacidade reduzida de hidrolisar hidroperóxidos de membrana (Mastorikou et al., 2008).

Estudo do proteoma da HDL demonstrou que esta partícula é capaz de transportar diversas proteínas que estão envolvidas não apenas no metabolismo lipídico, mas também em várias funções, como ativação do complemento (C3, C4A, C4B, C9 e vitronectina), inibição de proteases (haptoglobina, e proteínas de fase aguda (Vaisar et al., 2007). As HDL são consideradas protetoras pela inibição da inflamação e remoção de proteínas e lípidos da parede arterial, mas também podem apresentar efeitos

deletérios, favorecendo o acúmulo de colesterol e a inibição das vias cardioprotetoras (Heinecke, 2009).

Navab et al. (2001) demonstraram que HDL isoladas de pacientes portadores de DAC estimularam a atividade quimiotática de monócitos induzida por LDL controle e não preveniram a formação de fosfolípidos oxidados, ao contrário das HDL de indivíduos controles, que inibiram essas atividades.

Ansell et al. (2003) determinaram um índice de inflamação da HDL por meio da análise da capacidade da HDL em inibir a atividade quimiotática de monócitos induzida por LDL. Esses autores demonstraram que as HDL de portadores de DAC, mesmo com concentrações elevadas de HDL-c, sem uso de medicamentos hipolipemísantes, apresentaram maior índice de inflamação da HDL em comparação com indivíduos controles. Após seis semanas de terapia com sinvastatina, houve uma redução significativa nas propriedades inflamatórias da HDL dos pacientes portadores de DAC; entretanto, essas lipoproteínas permaneceram significativamente mais inflamatórias do que as dos controles. O índice de inflamação da HDL é resultado das alterações de um conjunto de fatores na HDL, que incluem fosfolípidos oxidados, hidroperóxido lipídico, apo A-I, SAA, ceruloplasmina, antioxidantes, atividade da PON-1, PAF-AH e LCAT (Navab et al., 2004).

Os resultados de nosso estudo demonstraram que as HDL dos portadores de DM 2 apresentam modificações que provocaram maior acúmulo de colesterol nos macrófagos, sugerindo que a interação entre HDL

e LDL do DM 2 no meio pode ter repercussão que vai além da redução na capacidade antiaterogênica da HDL.

7. CONCLUSÃO

A HDL de indivíduos portadores de DM 2 com controle glicêmico inadequado apresentou maior relação lípides/apo A-I e favoreceu o acúmulo de colesterol em macrófagos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17:238-46.

Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28:1225-36

Ansell BJ, Fonarow GC, Fogelman AM. The paradox of dysfunctional high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol*. 2007; 18:427-34.

Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, Rahmani S, Mottahedeh R, Dave R, Reddy ST, Fogelman AM. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation*. 2003; 108:2751-6.

Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46:1792-8.

Assmann G, Gotto AM Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109(23 Suppl 1):III8-14.

Attia N, Nakbi A, Smaoui M, Chaaba R, Moulin P, Hammami S, Hamda KB, Chanussot F, Hammami M. Increased phospholipid transfer protein activity associated with the impaired cellular cholesterol efflux in type 2 diabetic subjects with coronary artery disease. *Tohoku J Exp Med*. 2007; 213:129-37.

Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37:1304-16.

Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol*. 1986; 129:78-100.

Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004; 95:764-72.

Barter PJ. Hugh sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors. *Atheroscler Suppl*. 2002; 3:39-47.

Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(12):1708-16.

Blasiole DA, Davis RA, Attie AD. The physiological and molecular regulation of lipoprotein assembly and secretion. *Mol Biosyst*. 2007; 3:608-19.

Brown BE, Rashid I, van Reyk DM, Davies MJ. Glycation of low-density lipoprotein results in the time-dependent accumulation of cholesteryl esters and apolipoprotein B-100 protein in primary human monocyte-derived macrophages. *FEBS J*. 2007; 274:1530-41.

Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:223-261.

Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2000; 150:413-9.

Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2006; 35:491-510.

Chapman MJ. Metabolic syndrome and type 2 diabetes: lipid and physiological consequences. *Diab Vasc Dis Res*. 2007; 4Suppl 3:S5-8.

Choy PC, Siow YL, Mymin D, O K. Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol*. 2004; 82:212-24.

Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15:1987–94.

Curtin A, Deegan P, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH. Elevated triglyceride-rich lipoproteins in diabetes. A study of apolipoprotein B-48. *Acta Diabetol*. 1996; 33:205-10.

Daugherty A, Rateri DL, Lu H. As macrophages indulge, atherosclerotic lesions bulge. *Circ Res*. 2008; 102:1445-7.

Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29:870-6.

de Vries R, Groen AK, Perton FG, Dallinga-Thie GM, van Wijland MJ, Dikkeschei LD, Wolffenbuttel BH, van Tol A, Dullaart RP. Increased

cholesterol efflux from cultured fibroblasts to plasma from hypertriglyceridemic type 2 diabetic patients: roles of pre beta-HDL, phospholipid transfer protein and cholesterol esterification. *Atherosclerosis*. 2008; 196:733-41.

Duell PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosylation of HDL and impaired HDL-receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes*. 1991;40:377-84.

Duez H, Lamarche B, Uffelman KD, Valero R, Cohn JS, Lewis GF. Hyperinsulinemia is associated with increased production rate of intestinal apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:1357-63.

Eckel RH, Wassef M, Chait A, Sobel B, Barrett E, King G, Lopes-Virella M, Reusch J, Ruderman N, Steiner G, Vlassara H. Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: Writing Group II: pathogenesis of atherosclerosis in diabetes. *Circulation*. 2002; 105(18):e138-43.

Edwards PA, Kast HR, Anisfeld AM. BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res*. 2002; 43:2-12.

Federico LM, Naples M, Taylor D, Adeli K. Intestinal insulin resistance and aberrant production of apolipoprotein B48 lipoproteins in an animal model of insulin resistance and metabolic dyslipidemia: evidence for activation of protein tyrosine phosphatase-1B, extracellular signal-related kinase, and sterol regulatory element-binding protein-1c in the fructose-fed hamster intestine. *Diabetes*. 2006; 55:1316-26.

Feng H, Li XA. Dysfunctional high-density lipoprotein. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009; 16:156-62.

Ferretti G, Bacchetti T, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Dousset N, Curatola G. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis*. 2006; 184:1-7.

Franceschini G. Apolipoprotein function in health and disease: insights from natural mutations. *Eur J Clin Invest*. 1996; 26:733-46.

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.

Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-

dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem.* 1998; 273:18714-18719.

Garvey WT, Kwon S, Zheng D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, Pugh K, Jenkins AJ, Klein RL, Liao Y. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes.* 2003; 52:453-62.

Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res.* 2005; 36:232-40.

Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Cabré A, Heras M, Guardiola M, Ribalta J, Masana L. Oxidized to non-oxidized lipoprotein ratios are associated with arteriosclerosis and the metabolic syndrome in diabetic patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis. Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008; 18:380-7.

Gleissner CA, Leitinger N, Ley K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension.* 2007; 50:276-83.

Goldstein JL, Brown MS. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res.* 1984; 25:1450-61.

Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:431-8.

Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977; 62:707-14.

Gowri MS, Van der Westhuyzen DR, Bridges SR, Anderson JW. Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may be due to the abnormal composition of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:2226-33.

Greaves DR, Gordon S. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age:current knowledge and future challenges. *J Lipid Res.* 2009 ;50 Suppl:S282-6.

Greaves DR, Gordon S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res.* 2005 ;46:11-20.

Guérin M, Le Goff W, Lassel TS, Van Tol A, Steiner G, Chapman MJ. Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:282-8.

Guo Q, Avramoglu RK, Adeli K. Intestinal assembly and secretion of highly dense/lipid-poor apolipoprotein B48-containing lipoprotein particles in the fasting state: evidence for induction by insulin resistance and exogenous fatty acids. *Metabolism.* 2005; 54:689-97.

Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998;339:229-34.

Haidari M, Leung N, Mahbub F, Uffelman KD, Kohen-Avramoglu R, Lewis GF, Adeli K. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. *J Biol Chem.* 2002; 277:31646-55.

Haslbeck KM, Bierhaus A, Erwin S, Kirchner A, Nawroth P, Schlotzer U, Neundorfer B, Heuss D. Receptor for advanced glycation endproduct

(RAGE)-mediated nuclear factor-kappaB activation in vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve*. 2004; 29:853-60.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH, The Distribution and Chemical Composition of Ultracentrifugally Separated Lipoproteins in Human Serum. *J. Clin. Invest.* 1955; 34:1345-53.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH, The Distribution and Chemical Composition of Ultracentrifugally Separated Lipoproteins in Human Serum. *J. Clin. Invest.* 1955; 34:1345-53.

Heinecke JW. The HDL proteome: a marker--and perhaps mediator--of coronary artery disease. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl:S167-71.

Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J*. 1988; 7:4119-27.

Hoang A, Murphy AJ, Coughlan MT, Thomas MC, Forbes JM, O'Brien R, Cooper ME, Chin-Dusting JP, Sviridov D. Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties. *Diabetologia*. 2007; 50:1770-9.

Holme I, Aastveit AH, Jungner I, Walldius G. Relationships between lipoprotein components and risk of myocardial infarction: age, gender and short versus longer follow-up periods in the Apolipoprotein MOrtality RiSk study (AMORIS). *J Intern Med.* 2008; 264:30-8.

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002; 109:1125-31.

Iborra RT, Ribeiro IC, Neves MQ, Charf AM, Lottenberg SA, Negrão CE, Nakandakare ER, Passarelli M. Aerobic exercise training improves the role of high-density lipoprotein antioxidant and reduces plasma lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus. *Scand J Med Sci Sports.* 2008; 18:742-50.

Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. *Curr Opin Lipidol.* 2009; 20:363-9.

Jessup W, Gelissen IC, Gaus K, Kritharides L. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol.* 2006; 17:247-57.

Jessup W, Kritharides L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol*. 2000; 11:473-81.

Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab*. 2005; 1:121-31.

Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006; 3:144-53.

Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, Basso E, Seraglia R, Traldi P. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41:1166-73.

Letellier C, Durou MR, Jouanolle AM, Le Gall JY, Poirier JY, Ruelland A. Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. *Diabetes Metab*. 2002; 28:297-304.

Levy E, Sinnett D, Thibault L, Nguyen TD, Delvin E, Ménard D. Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human

fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Lett.* 1996; 393:253-8.

Liguori A, Abete P, Hayden JM, Cacciatore F, Rengo F, Ambrosio G, Bonaduce D, Condorelli M, Reaven PD, Napoli C. Effect of glycaemic control and age on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in diabetes mellitus type 1. *Eur Heart J.* 2001; 22:2075-84.

Lowry OH, Rosebrough N J, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.

Lyons TJ, Jenkins AJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol.* 1997; 8:174-80.

Lyons TJ, Klein RL, Baynes JW, Stevenson HC, Lopes-Virella MF. Stimulation of cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by low-density lipoproteins from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: the influence of non-enzymatic glycosylation of low-density lipoproteins. *Diabetologia.* 1987; 30:916-23.

MacDonald-Wicks L, Gibson LZ, Godfrey DM, Green JM, Horan BP, Monger KL, Wischer RM, Garg ML. Oxidised LDL in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004; 13(Suppl):S65.

Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1998; 139:341-9.

Makita T, Tanaka A, Nakano T, Nakajima K, Numano F. Importance of glycation in the acceleration of low density lipoprotein (LDL) uptake into macrophages in patients with diabetes mellitus. *Int Angiol*. 1999; 18:149-53.

Marks JB, Raskin P. Cardiovascular risk in diabetes: a brief review. *J Diabetes Complications*. 2000; 14:108-15.

Mastorikou M, Mackness B, Liu Y, Mackness M. Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. *Diabet Med*. 2008; 25:1049-55.

Mastorikou M, Mackness M, Mackness B. Defective metabolism of oxidized phospholipid by HDL from people with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006; 55:3099-103.

Mauldin JP, Nagelin MH, Wojcik AJ, Srinivasan S, Skaflen MD, Ayers CR, McNamara CA, Hedrick CC. Reduced expression of ATP-binding

cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2008; 117:2785-92.

Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet*. 2008; 371(9626):1800-9.

McQueen MJ, Hawken S, Wang X, Ounpuu S, Sniderman A, Probstfield J, Steyn K, Sanderson JE, Hasani M, Volkova E, Kazmi K, Yusuf S; INTERHEART study investigators. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study. *Lancet*. 2008; 372(9634):224-33.

Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*. 2006; 98:1352-64.

Mironova MA, Klein RL, Virella GT, Lopes-Virella MF. Anti-modified LDL antibodies, LDL-containing immune complexes, and susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000; 49:1033-41.

Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract. Endocrinol Metab*. 2009; 5:150-9.

Moore KJ, Freeman MW. Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:1702-11.

Nagai R, Hayashi CM, Xia L, Takeya M, Horiuchi S. Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins. *J Biol Chem.* 2002; 277:48905-12.

Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.* 2004; 45:993-1007.

Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, Fogelman AM. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res.* 2001; 42:1308-17.

Neaton JD, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and atherosclerosis from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316099 white men. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med.* 1992; 152:56-64.

Nègre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med.* 2006;41:1031-40.

Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem.* 2001; 276:27584-90.

Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B et al. Reconstituted high density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation.* 2005; 111:1543–50.

Nobécourt E, Jacqueminet S, Hansel B, Chantepie S, Grimaldi A, Chapman MJ, Kontush A. Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia.* 2005; 48:529-38.

Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006; 16:371-86.

Noto H. Latest insights into high-density lipoprotein functions. *The Endocrinologist*. 2009; 19:179-86.

Passarelli M, Shimabukuro AF, Catanozi S, Nakandakare ER, Rocha JC, Carrilho AJ, Quintao EC. Diminished rate of mouse peritoneal macrophage cholesterol efflux is not related to the degree of HDL glycation in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2000; 301(1-2):119-34.

Passarelli M, Tang C, McDonald TO, O'Brien KD, Gerrity RG, Heinecke JW, Oram JF. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes*. 2005;54:2198-2205.

Pennings M, Meurs I, Ye D, Out R, Hoekstra M, Van Berkel TJ, Van Eck M. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Lett*. 2006; 580:5588-96.

Pennings M, Meurs I, Ye D, Out R, Hoekstra M, Van Berkel TJ, Van Eck M. Regulation of cholesterol homeostasis in macrophages and consequences for atherosclerotic lesion development. *FEBS Lett*. 2006; 580:5588-96.

Perségol L, Vergès B, Foissac M, Gambert P, Duvillard L. Inability of HDL from type 2 diabetic patients to counteract the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent vasorelaxation. *Diabetologia*. 2006; 49:1380-6.

Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl:S189-94.

Rashduni DL, Rifici VA, Schneider SH, Khachadurian AK. Glycation of high-density lipoprotein does not increase its susceptibility to oxidation or diminish its cholesterol efflux capacity. *Metabolism*. 1999; 48:139-43.

Redgrave TG, Roberts DC, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem*. 1975; 65 (1-2):42-9.

Ribeiro IC, Iborra RT, Neves MQ, Lottenberg SA, Charf AM, Nunes VS, Negrão CE, Nakandakare ER, Quintão EC, Passarelli M. HDL atheroprotection by aerobic exercise training in type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Sports Exerc*. 2008; 40:779-86.

Rosenblat M, Karry R, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux, when

present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: relevance to diabetes. *Atherosclerosis*. 2006; 187:74-81.

Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denèfle P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*. 1999; 22:352-5.

Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res*. 2009; 50 Suppl:S195-200.

Scheffer PG, Bos G, Volwater HG, Dekker JM, Heine RJ, Teerlink T. Associations of LDL size with in vitro oxidizability and plasma levels of in vivo oxidized LDL in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med*. 2003; 20:563-7.

Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest*. 1997; 99:457-68.

Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, Brett J, Cao R, Kuwabara K, Costache G, Simionescu N, Simionescu M, Stern D. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in

vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:8807-11.

Schwartz K, Lawn RM, Wade DP. ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 274:794-802.

Serfaty-Lacrosniere C, Civeira F, Lanberg A, Isaia P, Berg J, Janus ED, Smith MP Jr, Pritchard PH, Frohlich J, Lees RS, Barnard GF, Ordovas JM, Schaefer EJ. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 1994; 107:85–98.

Shepherd J. Dyslipidaemia in diabetic patients: time for a rethink. *Diabetes Obes Metab*. 2007; 9:609-16.

Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*. 2000; 6:77-86.

Silverstein RL. Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med*. 2009; 76 Suppl 2:S27-30.

Singh IM, Shishehbor MH, Ansell BJ. High-density lipoprotein as a therapeutic target: a systematic review. *JAMA*. 2007; 298(7):786-98.

Soccio RE, Breslow JL. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24:1150-60.

Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. 1993;16:434-44.

Stewart MW, Laker MF, Dyer RG, Game F, Mitcheson J, Winocour PH, Alberti KG. Lipoprotein compositional abnormalities and insulin resistance in type II diabetic patients with mild hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb*. 1993; 13:1046-52.

Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004; 84:1381-478.

Sviridov D, Mukhamedova N, Remaley AT, Chin-Dusting J, Nestel P. Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: how much versus how good. *J Atheroscler Thromb*. 2008; 15:52-62.

Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002; 161:245-54.

Syvne M, Ahola M, Lahdenper S, Kahri J, Kuusi T, Virtanen KS, Taskinen MR. High density lipoprotein subfractions in non-insulin-dependent diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Lipid Res.* 1995; 36:573-82.

Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu Rev Nutr.* 1999; 19:123-39.

Tall AR. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med.* 2008; 263:256-73.

Tall AR. Plasma high density lipoproteins. Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest.* 1990; 86:379-84.

Tames FJ, Mackness MI, Arrol S, Laing I, Durrington PN. Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis.* 1992; 93:237-44.

Terpstra AH, Nicolosi RJ, Herbert PN. In vitro incorporation of radiolabeled cholesteryl esters into high and low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1989; 30:1663-71.

Thornalley PJ. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043:111-7.

Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol.* 2003; 17:985-93.

Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, Byun J, Vuletic S, Kassim S, Singh P, Chea H, Knopp RH, Brunzell J, Geary R, Chait A, Zhao XQ, Elkon K, Marcovina S, Ridker P, Oram JF, Heinecke JW. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest.* 2007; 117:746-56.

Van Eck M, Singaraja RR, Ye D, Hildebrand RB, James ER, Hayden MR, Van Berkel TJ. Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:929-34.

Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995; 96:2758-67.

Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:9774-9.

Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:1310-6.

Wang X, Rader DJ. Molecular regulation of macrophage reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol*. 2007; 22:368-72.

Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjorck RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 2001; 50:1495-504.

Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, Soran H, Durrington PN. Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis*. 2009; 202:162-8.

Dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos controles.

Indivíduos controles	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	GLI (mg/dL)	HbA _{1c} (%)	CT (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)
1	29	85,9	1,69	30,1	100	5,3	154	95	48	55
2	28	61,9	1,72	20,9	88	5,2	142	78	47	85
3	41	90,7	1,72	30,7	93	4,6	189	108	36	224
4	24	77,5	1,77	24,7	100	5,7	157	103	37	87
5	29	50,1	1,54	21,1	85	4,7	143	73	45	123
6	28	56,5	1,58	22,6	93	5,3	173	74	81	89
7	25	65,6	1,63	24,7	89	5,4	173	112	54	35
8	30	114	1,98	29,1	104	5,1	171	118	36	85
9	41	70,2	1,65	25,8	80	6,1	175	96	66	67
10	50	69,0	1,78	21,8	89	6,2	147	78	58	54
11	25	70,3	1,65	25,8	84	5,7	173	120	39	72

Dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos portadores de DM 2.

Indivíduos controles	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (Kg/m ²)	GLI (mg/dL)	HbA _{1c} (%)	CT (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)
1	53	99,8	1,68	35,4	302	12,8	142	71	30	203
2	71	83,5	1,68	29,6	104	10,0	141	81	43	86
3	56	84,3	1,7	29,2	256	8,8	122	67	27	139
4	61	89,9	1,54	37,9	143	8,6	157	78	42	185
5	77	92,5	1,73	30,9	112	9,7	214	68	75	356
6	65	90,8	1,58	36,4	161	9,5	159	98	29	161
7	54	70,9	1,43	34,7	302	9,6	201	139	47	76
8	48	77,4	1,56	31,8	290	12,1	208	134	48	132
9	67	60,0	1,62	22,9	318	13,2	214	134	63	86
10	45	46,2	1,45	22,0	185	13,4	208	126	53	143
11	58	74,5	1,45	35,4	323	10,8	176	96	64	80

Conteúdo celular de colesterol total, colesterol livre e colesterol esterificado em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com lipoproteínas isoladas de indivíduos controles (n = 11); valores individuais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína celular).

Incubações	Indivíduos controles	Colesterol total	Colesterol livre ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína celular)	Colesterol esterificado
LDL(C)	1	33,7	21,6	12,1
	2	433,8	142,4	291,5
	3	86,7	59,1	27,6
	4	132,1	92,8	39,3
	5	502,3	146,7	355,7
	6	367,1	100,9	266,2
	7	720,9	175,1	545,8
	8	156,3	141,5	14,9
	9	645,3	161,9	483,4
	10	455,1	105,4	349,7
	11	331,6	80,3	251,3
LDL(C) + HDL(C)	1	47,8	30,8	17,0
	2	908,2	292,3	615,9
	3	112,8	84,5	28,3
	4	281,4	112,3	169,1
	5	496,7	149,0	347,6
	6	355,3	96,9	258,4
	7	1091,4	266,9	824,5
	8	604,7	141,1	463,6
	9	476,7	100,1	376,6
	10	328,0	96,5	231,5
	11	319,8	70,8	248,9
LDL(C) + HDL(C) <i>pool</i>	1	34,3	18,0	16,3
	2	589,8	183,1	406,7
	3	110,6	74,3	36,4
	4	73,1	67,9	5,2
	5	573,4	151,5	421,9
	6	265,9	59,3	206,6
	7	329,5	143,3	186,2
	8	71,9	57,5	14,3
	9	556,0	124,8	431,2
	10	58,5	47,4	11,1
	11	259,4	55,6	203,8

Conteúdo celular de colesterol linoleato, colesterol oleato e colesterol palmitato em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com lipoproteínas isoladas de indivíduos controles (n = 11); valores individuais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína celular).

Incubações	Indivíduos controles	Colesterol linoleato	Colesterol oleato	Colesterol palmitato
(μg/mg de proteína celular)				
LDL(C)	1	12,1	0,0	0,0
	2	238,4	24,7	28,3
	3	27,6	0,0	0,0
	4	39,3	0,0	0,0
	5	262,0	64,6	29,1
	6	189,8	58,1	18,3
	7	372,8	75,4	97,6
	8	14,9	0,0	0,0
	9	311,9	90,6	80,9
	10	226,1	58,5	65,1
	11	169,4	37,1	44,8
LDL(C) + HDL(C)	1	17,0	0,0	0,0
	2	478,7	48,8	88,3
	3	28,3	0,0	0,0
	4	158,7	10,4	0,0
	5	261,4	63,5	22,7
	6	186,0	56,3	16,1
	7	582,9	120,3	121,4
	8	311,6	79,8	72,2
	9	241,0	72,1	63,5
	10	156,9	34,3	40,2
	11	152,3	41,5	55,1
LDL(C) + HDL(C) <i>pool</i>	1	16,3	0,0	0,0
	2	319,0	33,7	54,1
	3	36,4	0,0	0,0
	4	5,2	0,0	0,0
	5	312,0	76,6	33,4
	6	117,6	28,9	60,1
	7	90,6	12,6	83,0
	8	14,3	0,0	0,0
	9	275,9	82,5	72,8
	10	8,8	2,3	0,0
	11	127,7	34,2	41,9

Conteúdo celular de colesterol total, colesterol livre e colesterol esterificado em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com lipoproteínas isoladas de indivíduos portadores de DM 2 (n = 11); valores individuais (µg/mg de proteína celular).

Incubações	Indivíduos DM 2	Colesterol total	Colesterol livre (µg/mg de proteína celular)	Colesterol esterificado
LDL(D)	1	172,3	49,8	122,4
	2	228,4	102,0	126,4
	3	192,6	119,1	73,5
	4	80,0	71,1	8,9
	5	690,6	173,7	516,9
	6	465,3	117,5	347,8
	7	829,9	397,9	432,0
	8	515,3	289,6	225,7
	9	138,3	138,3	0,0
	10	257,3	82,0	175,3
	11	350,8	81,9	268,8
LDL(D) + HDL(D)	1	270,6	74,2	196,4
	2	323,1	123,8	199,3
	3	679,8	190,0	489,8
	4	1401,7	265,9	1135,8
	5	674,7	171,7	503,0
	6	662,1	175,3	486,8
	7	874,2	310,1	564,1
	8	536,6	206,2	330,4
	9	243,9	198,8	45,0
	10	417,1	109,6	307,5
	11	597,8	124,4	473,5
LDL(D) + HDL(C) <i>pool</i>	1	114,5	37,9	76,7
	2	257,2	121,9	135,4
	3	152,7	86,7	66,0
	4	132,3	94,3	38,0
	5	582,9	149,6	433,3
	6	848,8	207,1	641,7
	7	838,7	431,9	406,8
	8	229,3	218,6	10,8
	9	169,6	164,9	4,7
	10	59,1	48,2	10,9
	11	603,3	135,1	468,2

Conteúdo celular de colesterol linoleato, colesterol oleato e colesterol palmitato em macrófagos de peritônio de camundongos incubados com lipoproteínas isoladas de indivíduos portadores de DM 2 (n = 11); valores individuais (µg/mg de proteína celular).

Incubações	Indivíduos DM 2	Colesterol linoleato	Colesterol	
			oleato	palmitato
(µg/mg de proteína celular)				
LDL(D)	1	56,7	16,1	49,6
	2	112,4	14,0	0,0
	3	73,5	0,0	0,0
	4	8,9	0,0	0,0
	5	369,8	89,2	57,9
	6	274,3	44,4	29,1
	7	185,5	30,4	216,1
	8	27,1	0,0	198,6
	9	0,0	0,0	0,0
	10	118,7	26,7	29,9
	11	196,5	31,2	41,2
LDL(D) + HDL(D)	1	104,0	31,5	60,9
	2	178,5	20,8	0,0
	3	393,5	58,7	37,6
	4	832,6	79,1	224,1
	5	347,4	84,1	71,5
	6	369,4	66,4	51,1
	7	355,6	70,3	138,1
	8	33,4	0,0	297,1
	9	45,0	0,0	0,0
	10	207,5	46,4	53,5
	11	344,5	56,9	72,1
LDL(D) + HDL(C) <i>pool</i>	1	51,3	7,6	17,8
	2	122,0	13,3	0,0
	3	59,7	6,3	0,0
	4	38,0	0,0	0,0
	5	313,9	77,0	42,4
	6	465,1	89,0	87,6
	7	86,2	0,0	320,7
	8	10,8	0,0	0,0
	9	4,7	0,0	0,0
	10	7,8	3,0	0,0
	11	337,4	62,8	68,1

Medicamentos em uso pelos indivíduos portadores de DM 2.

Indivíduos	Medicamentos
DM 2	
1	metformina; glicazida; acarbose; insulina NPH; insulina Lispro; AAS; enalapril; losartana; atenolol; hidroclorotiazida; atorvastatina
2	metformina; glibenclamida; pioglitazona; AAS; captopril; atenolol; hidroclorotiazida; sinvastatina; ezetimibe
3	metformina; glicazida; pioglitazona; insulina NPH; insulina Lispro; AAS; losartana; sinvastatina
4	metformina; rosiglitazona; AAS; enalapril; atenolol; hidroclorotiazida
5	metformina; glicazida; rosiglitazona; insulina NPH; insulina Lispro; AAS; enalapril; furosemida; sinvastatina
6	metformina; glicazida; acarbose; insulina NPH; AAS; captopril; atenolol; hidroclorotiazida; sinvastatina
7	glicazida; AAS; enalapril; carvedilol; furosemida; sinvastatina; isossorbida
8	metformina; glicazida; acarbose; insulina NPH; AAS; enalapril; sinvastatina
9	metformina; glicazida; enalapril
10	DM 2 recém-diagnosticado, sem tratamento prévio
11	Não referidos

Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN. Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol*. 2008; 19:378-84.