# CAROLINA PIRAS DE OLIVEIRA

Estudo da cinética plasmática

do colesterol livre e esterificado em pacientes diabéticos tipo 2

com ou sem doença coronariana diagnosticada

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de mestre

São Paulo 2009

# CAROLINA PIRAS DE OLIVEIRA

# Estudo da cinética plasmática do colesterol livre e esterificado em pacientes diabéticos tipo 2 com ou sem doença coronariana diagnosticada

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção de título de mestre

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Lerario

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

Oliveira, Carolina Piras de

Estudo da cinética plasmática do colesterol livre e esterificado em pacientes diabéticos tipo 2 com ou sem doença coronariana diagnosticada / Carolina Piras de Oliveira. -- São Paulo, 2009.

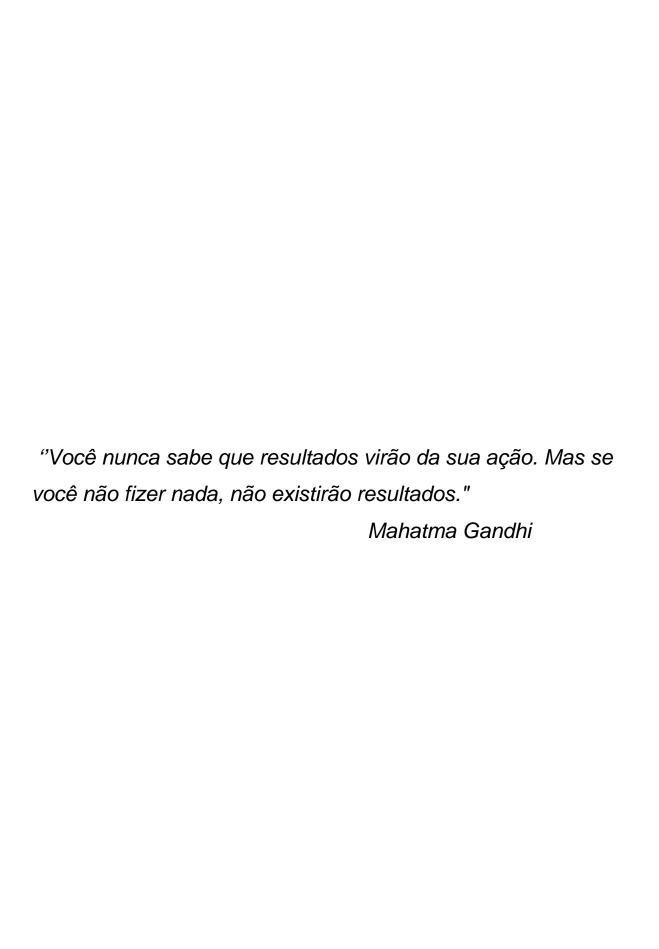
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica .

Área de concentração: Endocrinologia. Orientador: Antonio Carlos Lerario.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 2 2.Cinética 3.Dislipidemias 4.Doença das coronárias

USP/FM/SBD-415/09



# Dedicatória

À meus pais, Sonia e Piras, pelo incentivo a pós graduação desde o início da graduação.

Ao meu marido Moacir Henrique, pelo suporte nesta jornada.

Aos meus doces pacientes com carinho, sem os quais eu jamais teria conseguido chegar até aqui, e principalmente por serem a minha fonte de inspiração.

# Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Lerario por dar a oportunidade de me iniciar no mundo da pesquisa acreditando em mim e me incentivando para ir ao final. Sua calma foi meu guia!

Ao Prof. Dr. Raul C. Maranhão por abrir as portas de seu laboratório e confiar, mais que isso, dividir seus conhecimentos em pesquisa e sua paixão pelo colesterol. Pela orientação intelectual e braçal nesta jornada a qual foi fundamental para a sua finalização.

Ao Prof. Dr. Bernardo Leo Wajchenberg pelos sábios conselhos e incentivo. Sua sede de conhecimento é contagiante!

Ao Prof. Dr. Simão Lottemberg, suas sábias orientações de como lidar com meus orientadores por diversas vezes foram úteis.

A Prof. Dra. Carmem Vinagre pela boa vontade em ajudar, discutir e entender o mundo complexo da cinética de lipoproteínas.

Ao Prof. Dr. Carlos H. Mesquita pelas manhãs que perdeu explicando como funciona o modelo compartimental, tornando a física tão compreensível como a glicemia para o endocrinologista, fácil só para quem está habituado.

Ao Prof. Dr. Carlos Rochite pela realização dos exames de imagens destes pacientes.

Ao Dr. Natanael Morais pela insistência em arrumar pacientes, pela realização do usg de carótidas e das idéias de como sair das enrascadas.

Ao Prof. Dr. Roberto Betti pelo incentivo em todos os momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. João Eduardo Nunes Salles por manter acesa a chama da dúvida das minhas certezas e confirmar a certeza das minhas dúvidas, ainda quando eu era apenas sua residente de endocrinologia na Santa Casa de São Paulo.

Aos meus antigos mestres da endocrinologia, Prof. Dr. Osmar Monte e Prof. Dra. Nilza Scalissi, por permitirem que eu tivesse dúvidas todos os dias quando a teoria não se encaixava com a clínica.

Aos meus professores de graduação, principalmente Ricardo e Arthur de bioquímica e Raul Cisternas de fisiologia, da Faculdade Medicina do ABC que nos primeiros anos de graduação me introduziram ao mapa metabólico, e aguçaram minha curiosidade para o estudo do metabolismo de carboidratos, lípides e proteínas.

A Marina Bertato, que foi minha fiel escudeira no laboratório, tentando desvendar os caminhos da complexa nanoemulsão artificial de LDL.

A Renata Salles, que dividiu essa jornada pela pós-graduação. Muito obrigada pela compreensão.

Aos colegas de laboratório que dividiram angústias e conquistas, meu muito obrigado:

Ana Carolina M. Gagliardi, que dividiu as dificuldades para buscar controles e me aguentou as vésperas da minha aula em Boston.

Cristina Pio de Almeida pelas longas discussões sobre receptores de lipoproteínas

Fernanda Pozzi que trocou o mundo dos diabéticos tipo2 pela inflamação das artrites.

Jeferson Silva que me ajudou a compreender que cinética de lipoproteínas com LDL-símile nem sempre é o que parece. Exercitamos mais os neurônios do que os músculos para tentar compreendê-la.

Aos fúncionários do laboratório de lípides- meu muitíssimo obrigada!!!

Conceição- pelas análises de transferência; Wanderley pelo auxílio com as veias dos pacientes; Débora pela ardua tarefa de preparar as emulsões; Maria pelo auxilio na esterificação.

Augusta por manter a ordem dos armários e a limpeza dos tubos.

Rosane, Fátima, Priscila e Alexandra- pela compreensão, suporte e ajuda diversas vezes.

A Marineuza, ops a Neuza, sem a qual eu com certeza não teria conseguido. Foi secretaria, ajudante, amiga e paciente.

Ao meu Tio Nosor que como médico, clínico geral às antigas, sempre foi o exemplo ao qual eu pensava em seguir.

A Dra. Bartira Figueiredo, que confiou em mim seus pacientes e me dá a oportunidade de criar os meus.

Ao meu irmão Gustavo que mesmo longe sempre me apoiou dando abrigo quando precisei e torcendo por mim em todos os momentos.

A Cristina Villar, amiga e cunhada que de longe me estimulou e foi exemplo de perseverança, mostrando que dificuldades existem até na terra do tio Sam.

Ao meu primo Théo, que costuma reclamar das conversas médicas entre eu e seu pai, mas eu sei que cada vez mais se interessa por conversas cintíficas. Ao meu primo Tales que é bem capaz de contar a história do colesterol de modo animado e interativo. Quem sabe podemos criar um filme sobre as lipoproteínas.

À tia Selma e a Dilene, que é "tia" também, muito obrigado pelo suporte psicológico e familiar.

# SUMÁRIO

Abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	19
1.1- O papel da resistência a insulina e o risco cardiovascular	21
1.2-O controle glicêmico e o risco cardiovascular.	22
1.3- O metabolismo do colesterol e lipoproteínas	25
1.3.1- Enzimas envolvidas na homeostase do colesterol	28
1.3.2-A homeostase das lipoproteínas	30
1.3.2.1-Sintese de colesterol celular	30
1.3.2.2- Metabolismo das lipoproteínas apo B 48	34
1.3.2.3- Metabolismo das lipoproteínas apo B 100	35
1.4 Transporte reverso do colesterol	36
1.5- A Dislipidemia no diabetes mellitus tipo 2	38
1.6-Estudos cinéticos de lipoproteína	39
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAIS e MÉTODOS	45
3.1. Local do estudo	46
3.2. Casuística	47
3.2.1 Avaliação dos pacientes	47
3.3.Determinações bioquímicas	48
3.4. Preparação da nanoemulsão lipídica artificial	50
3.4.1 Cinética plasmática do <sup>3</sup> H-colesterol e <sup>14</sup> C-éster de colesterol	50

3.4.2 Análise compartimental da curva de decaimento plasmático dos lípides	51
radioativo	
3.4.3 Técnica para avaliar a esterificação do colesterol livre presente na nanoemulsão	53
lipídica artificial	
3.4.4 - Transferência de lípides radioativos de uma nanoemulsão artificial lipídica para	ı 53
HDL-C in vitro.	
3.5. Avaliação quanto a aterosclerose subclínica	53
3.5.1 Avaliação para detectar doença coronária no grupo diabético e controle:	54
3.5.2 Ultrassonografia com dopller das artérias carótidas	54
3.6.Segurança radiológica	55
3.7 Avaliação da resistência a insulina	56
3.8 Análises estatísticas	56
3.9. Apoio financeiro	57
4. RESULTADOS	58
4.1 Características clínicas e determinações bioquímicas da população do estudo	59
4.2 Características clínica antropométrica e laboratorial nos grupos divididos pela	64
presença ou não de estenose coronária	
4.3 Cinética da nanoemulsão marcada com <sup>14</sup> C-éster colesterol e <sup>3</sup> H- colesterol livre	66
4.4. Esterificação do <sup>3</sup> H-colesterol livre	70
4.5 Transferência de lípides in vitro da nanoemulsão de LDL-símile para a HDL dos	70
DM2 e controles	
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	80
7. ANEXOS	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

#### LISTA DE ABREVIATURAS

AAS Acido acetil salicílico
A1c Hemoglobina glicada

ABCA1 ATP binding cassete transportador A1
ABCG1 ATP binding cassete transportador G1

ACAT Acil colesterol aciltransferase

ACC Acetil- CoA carboxilase

ACCORD Action to control cardiovascular risk in diabetes

ADA American Diabetes Association

AGE Produto final de glicação avançada

AGL Ácido graxo livre

AHA American Heart Association

AMPK AMP- Activated Protein Kinase

bpm Batimentos por minuto

CA Circunferência abdominal

CAC Calcificação de artéria coronária

CETP Proteína transportadora de éster de colesterol

CL Colesterol livre cm Centímetros

CQ Circunferência Quadril

CT Colesterol total

DAC Doença arterial coronária
DCV Doença cardiovascular
DM2 Diabetes mellitus tipo 2

EC Éster de colesterol

h Horas

HCFMUSP Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo

HDL Lipoproteína de alta densidade

IECA Inibidor da enzima de conversão da angiotensina

IMC Índice de massa corporal

InCor Instituto do Coração INSIG Insulin induced gene

kg Quilograma

kg/m² Quilograma por metro quadrado

LCAT Lecitina colesterol aciltransferase

LDL Lipoproteína de baixa densidade

LH Lipase hepática

LLP Lipase lipoprotéica

LRP Proteína relacionada ao receptor de LDL

LXR Liver X receptor

m metro

m<sup>2</sup> Metro quadrado

mg miligramas

mg/dL miligramas por decilitro mmHg Milímetros de mercúrio

MTP Proteína de transferência de triglicérides microssomal

n Número de pacientes

ng/dL Nanograma por decilitro

RAGE Receptor de produtos finais de glicação avançada

RI Resistência insulínica

SCAP SREBP clevage activating protein SR-B1 Receptor scavanger classe b tipo1

SREBP Sterol regulatory element binding protein

TFR Taxa fracional de remoção

TG Triglicérides

TRC Transporte reverso de colesterol

UKPDS United Kingdom Prospective Diabetes Study

VLDL Lipoproteína de muito baixa densidade

# LISTA DE TABELAS:

TABELA 1:	Principais tipos de lipoproteínas presentes no	27
	plasma e suas características	
TABELA 2:	Características e principais funções das principais apolipoproteínas	28
TABELA 3:	Características clínicas e antropométricas dos	60
TABELA 4	pacientes estudados  Medicamentos utilizados pelos pacientes para tratamento do diabetes e das comorbidades	61
TABELA 5	Características dos exames laboratoriais dos pacientes estudados	63
TABELA 6	Valores estimados da concentração de insulina, HOMA β , HOMAS e resistência a insulina	64
TABELA 7	Caracteristiscas clínicas nos diabéticos com e sem CAC e nos controles	65
TABELA 8	Taxas fracionais de remoção e parâmetros cinéticos <sup>14</sup> C-CE e <sup>3</sup> H-CL, nos grupos diabéticos e	67
TABELA 9	controle	68
TABELA 10:	com e sem CAC e controle	70
TABELA 11:	diabéticos e controles	71
TABELA 12:	controles  Transferência de lipídeos (%) da nanoemulsão da LDL-símile para HDL de diabéticos e controles <i>in vitro</i>	72

# LISTA DE FIGURAS:

Modelo esquemático da lipoproteína plasmática	26	
Diagrama esquemático do metabolismo das 3 lipoproteínas		
Modelo esquemático da partícula LDL - símile da nanoemulsão artificial	48	
Modelo compartimental utilizado para analisar a cinética plasmática do <sup>14</sup> C-éster de colesterol e do <sup>3</sup> H-colesterol livre da nanoemulsão LDL - símile	52	
Curva de decaimento plasmático do <sup>14</sup> C-éster de colesterol em diabéticos e controles, pela porcentagem da média de radioatividade presentes no plasma em função do tempo	69	
' ' '	69	
	Diagrama esquemático do metabolismo das lipoproteínas	

.

#### **RESUMO**

**TíTULO:** Estudo da cinética plasmática do colesterol livre e esterificado em diabéticos tipo 2 com e sem doença arterial coronariana diagnosticada.

INTRODUÇÃO:. A dislipidemia diabética é um dos principais fatores de risco para doença arterial coronária (DAC) O uso de uma nanoemulsão LDL-símile para avaliar clearance do éster de colesterol(EC) e colesterol livre(CL) do intravascular mostrou uma remoção acentuada do CL e um maior depósito em vasos sanguíneos de indivíduos com DAC avançada. OBJETIVOS: Identificar em DM2 a cinética plasmática do CL e EC; se há diferença na cinética de CL e EC em DM2 assintomáticos para DAC com e sem aterosclerose subclínica. **MÉTODOS:** Estudou-se 12 DM2 e 09 controles pareados para idade e sexo. A aterosclerose subclínca foi avaliada pela presença de Calcificação na artéria coronária (CAC). A Nanoemulsão artificial LDL-símile com dupla marcação radioativa <sup>14</sup>C-EC, <sup>3</sup>H-CL foi utilizada para o estudo cinético do colesterol, sendo injetada nos participantes e amostras de sangue foram coletadas durante 24 horas para mensuração da radioatividade. Remoção dos lípides da circulação foi calculada por análise compartimental. Mediu-se a taxa de esterificação do <sup>3</sup>H-CL no plasma e avaliouse a capacidade in vitro da HDL de receber lípides a partir das LDL-símile. **RESULTADOS:** Os diabéticos tiveram IMC. CA e CA/CQ maior que os controles. respectivamente:  $31.9 \pm 4.6$  vs.  $27.1 \pm 2.4$ , p<0.05;  $104.9 \pm 9.8$  vs.  $94.2 \pm 7.3$ , p<0.05;  $0.98 \pm 0.09 \text{ vs.} 0.89 \pm 0.06, \text{ p} < 0.01. \text{ A glicemia de jejum (171 \pm 96 vs. 83 \pm 7.5 mg/dl, p}$ <0.05) e hemoglobina glicada (8.9  $\pm$  2.1 vs. 5.6  $\pm$  0.4%, p<0.05) também foram maiores no DM2. A concentração de colesterol total, LDL, HDL, Triglicérides e apolipoproteínas A1,B e E não diferiu entre os grupos. A Taxa fracional de remoção (TFR)<sup>14</sup>C-EC foi 22% maior DM2 que nos controles  $(0.07 \pm 0.02 \text{ vs. } 0.05 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}, \text{ p} < 0.01)$ . A TFR<sup>3</sup>H- CL foi semelhante entre os dois grupos, bem como a esterificação. A presença de CAC no grupo DM2 não alterou a remoção de EC e CL nesses pacientes. In vitro a capacidade da HDL em receber EC  $(4.2 \pm 0.8 \text{ vs. } 3.5 \pm 0.6 \text{ \%}, \text{ p=0.03})$  e TG  $(6.8 \pm 1.6 \text{ vs. } 5.0 \pm 1.1, \text{ cm})$ p=0.03) foi maior nos DM2. CONCLUSÕES: A remoção acelerada do <sup>14</sup>C-EC na população DM2 e a remoção semelhante do <sup>3</sup>H-CL quando comparado com grupo controle, pode sinalizar alterações na gênese da dislipidemia diabética. O fato dos DM2 com CAC assintomática não apresentam alterações na remoção de colesterol livre sinaliza uma provável relação do CL com a instabilidade da placa aterosclerótica.

Palavras Chaves: diabetes tipo 2; dislipidemia; doença coronária.

#### SUMMARY

**TITLE**: Plasma kinetics of study of the free cholesterol and cholesteryl ester in type 2 diabetes mellitus patients with and without coronary artery disease.

**INTRODUTION:** The diabetic dyslipidemia is one of the most important risk factor in the development of coronary artery disease (CAD). The LDL-like nanoemulsion is being used to study the clearance of cholesteryl ester(CE) and free cholesterol(FC) from intravascular in patients with advanced CAD and it was shown a higher removal of FC and higher deposit in vases. OBJECTIVE: The aim of this study is to analyze the plasma kinetics of FC and CE in Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM); and identify if there are any differences in the removal of FC in the presence of subclinical atherosclerosis in asymptomatic patients with T2DM. **METHODS:** It was studied 12 T2DM and 09 controls paired by age and gender. The LDL-like nanoemulsion labeled with radioactive: <sup>14</sup>Ccholesterol ester (CE), <sup>3</sup>H-cholesterol free (CF) was used on plasma kinetics. The nanoemulsion was injected intravenously in all participants and blood sample was collected over 24 hours for radioactivity measurement. The intravascular lipid removal was calculated through compartmental analysis. The intravascular esterification of FC contained in the nanoemulsion was calculated. The ability of HDL to received lipids from LDL-simile were observed in vitro essays. Coronary Calcium Score was detected to identify subclinical atherosclerosis. **RESULTS:** T2DM patients had a bigger BMI, waist and waist/hip than control, respectively 31.9  $\pm$  4.6 vs. 27.1 $\pm$  2.4, p<0.05; 104.9  $\pm$  9.8 vs.  $94.2\pm7.3$ , p<0.05; 0.98± 0.09 vs. 0.89 ± 0.06,p<0.01. Fasting glycemia (171 ± 96 vs. 83  $\pm$  7.5 mg/dl, p <0.05) and glycated hemoglobin( 8.9  $\pm$  2.1 vs. 5.6  $\pm$  0.4%,p<0.05) was higher in T2DM, and there was no differences in the concentration of Total cholesterol. HDL, LDL, Triglycerides and apolipoproteins A1, B and E concentrations. Fractional Clearance rate (FCR) <sup>14</sup>C –CE in T2DM was 22% bigger than control (0.07 ± 0.02 vs. 0.05± 0.01 h<sup>-1</sup>, p<0.01). FCR <sup>3</sup>H-CF was similar between the groups. The CAC in T2DM did not show differents TFR in CE and FC in these group. In Both groups there was no statistical difference in FC esterification rate. The HDL ability to received CE  $(4.2 \pm 0.8 \text{ vs.} 3.5 \pm 0.6 \%, p=0.03)$  and TG  $(6.8 \pm 1.6 \text{ vs.} 5.0 \pm 1.1, p=0.03)$  from LDL-like nanoemulsion was higher in T2DM. **CONCLUSIONS**: The higher removal of <sup>14</sup>C-CE and similar removal of FC in T2DM can be related to the genese of the diabetic dyslipidemia. The similar removal of FC between the control group and T2DM asymptomatic CAD, with and without subclinical atherosclerosis, could possibly signalize to the relation of FC and the atherosclerotic plague stability.

Keywords: type 2 diabetes; diabetic dyslipidemia; lipoproteins kinetics

# 1. Introdução

O diabetes mellitus tipo 2 é uma doença metabólica caracterizada por apresentar hiperglicemia crônica, em função de uma produção insuficiente de insulina pela célula  $\beta$  pancreática e uma menor sensibilidade dos tecidos a ação da insulina. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais comum de diabetes, acomete normalmente a população adulta e vem tendo um aumento na sua prevalência nas últimas décadas. Atualmente estima-se que 194 milhões de pessoas tenham diabetes no mundo e em 2025 esse número se elevará para 330 milhões (1; 2).

Uma série de complicações crônicas incapacitantes a longo prazo irão acometer a população de diabéticos especialmente nos indivíduos com controle glicêmico não adequado. As complicações mais graves são a perda da visão, a lesão renal terminal, a amputação não traumática de membros inferiores e o infarto agudo do miocárdio. É o risco de desenvolver tais complicações que faz o diabetes mellitus tipo 2 ser considerado um dos principais problemas de saúde dos dias atuais (2; 3).

A mortalidade desses pacientes encontra-se relacionada ao aumento de casos de doenças cardiovasculares (DCV), sendo a doença arterial coronária (DAC) a principal responsável pela mortalidade dos portadores de DM2(4).

A doença aterosclerótica no diabético apresenta-se de forma mais difusa e agressiva, agravando o prognóstico dos eventos isquêmicos nesses pacientes. No diabético o infarto agudo do miocárdio freqüentemente é mais extenso, apresentando menores taxas de sobrevida em médio prazo quando comparado com a população de não-diabéticos(5).

A despeito dos grandes avanços na abordagem da DAC, ainda observamos um grande número de óbitos em indivíduos DM2 assintomáticos para DAC. Em estudos de autópsia a prevalência de diabetes com DAC é de 50-80%(6) Estima-se que apenas 20% dos diabéticos possuem DAC sintomática(7). Em torno de 46% de pacientes diabéticos assintomáticos sem complicações crônicas apresentaram calcificação coronária indicativa de aterosclerose (6; 8).

Mesmo exames com metodologia mais sofisticada ainda mostram-se insuficientes para identificar pacientes de alto risco para o desenvolvimento de DAC. Além disso, sabe-se que até o momento modelos preditivos mais complexos falham na estratificação adequada destes pacientes. (9)

As razões para essa alta morbidade cardiovascular nos pacientes diabéticos ainda não estão totalmente compreendidas. Apesar da dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica estarem associadas com alta freqüência na população diabética, o risco aumentado para eventos cardiovasculares persiste mesmo quando é ajustada a dislipidemia e a hipertensão arterial. (10; 11). Mecanismos propostos para o aumento do risco cardiovascular em diabéticos incluem: glicosilação e oxidação de lipoproteínas e da parede arterial(12; 13), nefropatia, albuminúria, alterações microvasculares da *vasavasorum*, hipertensão arterial, obesidade, alterações hemostáticas e plaquetárias e dislipidemia associada ao diabetes. O diabetes mellitus por si confere um risco de 75% a 90% de DAC(14; 15).

#### 1.1- O papel da resistência a insulina e o risco cardiovascular

A resistência a insulina (RI), levando a disfunção endotelial precoce e a dislipidemia, é considerada "o elo comum" entre o diabetes e o risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular agressiva nesses indivíduos(16; 17).Como citado anteriormente, o principal defeito metabólico presente é a redução na massa de célula β, em função de aumento do apoptose e defeito nos mecanismos regeneração celular(18). A resistência à insulina nos tecidos adiposo, músculo e fígado geralmente associada a obesidade que com frequência é encontrada no paciente com diabetes tipo 2, passa então a ser o fator desencadeande ou agravante para a deficência secretória da célula β, podendo até ser primária a esta(19).

A RI é, também, considerada o principal componente fisiopatológico para a existência da síndrome metabólica(20), que foi descrita como uma síndrome clínica na qual a associação de hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade levariam a um aumento no risco cardiovascular(21; 22). Entretanto, a síndrome metabólica em si é atualmente questionada em ser um quadro sindrômico, ou seria simplesmente uma

associação de fatores de risco que se sobrepõem para instalação da doença cardiovascular(23). Se o diabetes tipo 2 é incluído ou não na definição da síndrome metabólica também é controverso, mas é amplamente reconhecido o fato é que os mecanismos fisiológicos alterados na resistência à insulina, não só explicam o surgimento do diabetes, como também da aterosclerose(24; 25).

Inúmeras evidências demostram que a RI está presente provavelmente por tempo prolongado, antes mesmo do surgimento da hiperglicemia. Quando associada a uma falência da célula  $\beta$  em secretar insulina, a RI culmina em um desequilíbrio no metabolismo de carboidratos, gerando a glicemia de jejum alterada, a tolerância à glicose dimuída e o diabetes mellitus tipo 2. No entanto, nas fases pré-falência de célula  $\beta$ , a hiperinsulinemia compensatória é o que vai favorecer as modificações no metabolismo de lípides, na atividade do sistema nervoso simpático e no estímulo de fatores inflamatórios, contribuindo para a instalação da doença cardiovascular de forma precoce nesses pacientes(20; 22).

A disfunção endotelial micro e macrovascular, ocasionada pela RI, que é observada antes do aparecimento da hiperglicemia e já presente nas fases iniciais do DM2, teria um papel fundamental na aterogênese(26). A interação inflamação, diabetes e aterosclerose sugerem que o processo inflamatório contribui na patogenia de ambas as doenças. CERIELLO em 2004, revendo a hipótese do elo comum sugere que o stress oxidativo seria o mecanismo comum pelo qual a RI levaria a lesão endotelial e a lesão da célula  $\beta$ , fazendo o diabetes e a doença cardiovascular estar intimamente relacionados(16).

#### 1.2 O controle glicêmico e o risco cardiovascular

A geração dos produtos finais de glicação avançada (AGE) – é considerada uma das razões para a lesão macrovascular(27). A formação dos AGE está aumentada nos diabéticos(28), em função da hiperglicemia crônica. Os AGEs são originados de reações não enzimáticas entre proteínas extracelulares e lípides com a glicose e vão

acelerar a aterosclerose tanto por mecanismos dependentes quanto por independentes de receptores específicos(13).

Essa taxa de formação de compostos protéicos e lipídicos com AGEs é um mecanismo importante para acelerar a aterosclerose nos diabéticos(29), uma vez que acumulam AGE no interior de macrófagos e das células endoteliais desses indivíduos. A interação das lipoproteínas modificadas por AGEs com o colágeno na matriz extracelular favorece o seqüestro das lipoproteínas e de imunoglobulinas no espaço subendotelial. As modificações nas lipoproteínas podem ocorrer tanto nas apoliproteínas como nos fosfolípides, diminuindo a remoção da partícula de lipoproteína via os receptores específicos, como por exemplo o receptor de LDL (lipoproteína de baixa densidade), aumentando a oxidação dessas partículas. A captação das lipoproteínas modificadas pelos AGEs vai estar aumentada pelos macrófagos em comparação as lipoproteínas não modificadas em função de uma maior afinidade dos receptores não específicos (receptores scavenger) por lipoproteínas modificadas. Receptores específicos de AGEs (RAGES) foram descritos em diferentes tecidos entres os quais as células endoteliais, a célula muscular lisa e os macrófagos, e são importantes no processo de instalação e progressão da aterosclerose. Os RAGES sofrem uma regulação aumentada na sua expressão ao se ligar aos AGEs, principalmente em diabéticos e em processos relacionados ao envelhecimento. A interação AGEs e RAGES, vai estimular o estresse oxidativo celular e, consequentemente, sinaliza para produção de citocinas inflamatórias fundamentais na formação da placa de ateroma (29).

A hiperglicemia por favorecer a formação de AGES, passou a ser o foco principal de atenção para controle do DM2 e redução de suas complicações micro e macrovasculares(30; 31).

Em relação ao risco cardiovascular no diabetes tipo 2, apesar da hiperglicemia de jejum (32; 33) e pós prandial(34) e aumentos de hemoglobina glicada(35-37) estarem relacionadas a aumento deste, os grandes estudos clínicos falharam em mostrar redução de morbidade macrovascular com o tratamento glicêmico intensivo.

Em 1998, o United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) (38) foi o primeiro estudo a mostrar que a hiperglicemia não é um fator tão marcante para a doença macrovascular como mostrou ser para a microvascular. Para um aumento de A1c (hemoglobina glicada) em 5,5 % o risco para a doença microvascular aumenta 10 vezes enquanto o risco para a doença macrovascular aumenta apenas duas vezes. Apenas o braço do UKPDS em uso da metformina mostrou redução de evento cardiovascular(39). Outros estudos foram então idealizados para tentar elucidar se a redução na glicemia era importante na prevenção da aterosclerose, ou se apenas seria mais um fator associado à hipertensão arterial e dislipidemia(40-43).

No estudo ADVANCE(Action in Diabetes and Vascular Disease), pacientes diabéticos não se beneficiaram do controle glicêmico para redução do risco cardiovascular, mas sim a microalbuminúria foi um fator determinante para tal(41). O estudo ACCORD (Action to control cardiovascular risk in diabetes), mostrou que o controle glicêmico rigoroso aumentou a mortalidade por DCV gerando dúvidas se a melhora no controle glicêmico seria benéfica para reduzir a mortalidade por DCV(42). Em 2008, a continuação do estudo UKPDS(43) mostrou que aqueles pacientes mantidos em bom controle glicêmico passaram a apresentar um menor número de eventos cardiovasculares em um período de dez anos em comparação aos pacientes sem controle rígido da glicemia no estudo original do UKPDS.

Apesar se ser reconhecida importância do papel da hiperglicemia para o desenvolvimento da aterosclerose permanecem ainda não adequadamente esclarecidos os motivos da baixa eficácia das intervenções sobre esta glicemia na redução do risco cardiovascular. (22; 38; 44).

Também foi o UKPDS um dos primeiros estudos que evidenciou a importância da dislipidemia diabética no risco cardiovascular de diabéticos do tipo 2(27), ao mostrar que o aumento na concentração de LDL e a diminuição da concentração de HDL (lipoproteína de alta densidade) foram preditores do infarto do miocárdio. Neste estudo o aumento da concentração de LDL foi o principal fator de risco para DAC, seguido da diminuição na concentração de HDL, sinalizando a importância do controle lipídico no diabético(27; 45).

Diferentes estudos buscaram então avaliar a efetividade da correção dos

múltiplos fatores de risco para prevenção da DAC(40; 46-49). No estudo Heart Protection Study observou-se que a redução do risco cardiovascular com a correção da dislipidemia tende a ser maior no grupo de diabéticos em relação aos não diabéticos(46).

Baseados no fato do tratamento das alterações lipídicas e de lipoproteínas parecerem ter um maior impacto que o controle glicêmico para prevenção da DAC nos DM2(50), os valores da meta de tratamento de LDL vem sendo reduzidos gradualmente nas últimas diretrizes de tratamento(51-54). Considerando que estudos observacionais The Strong Heart Study(47) e The Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (51) mostraram melhora no risco cardiovascular com metas de LDL em torno 70-80mg/dl(47; 51; 55) para pacientes diabéticos, a atual diretriz de tratamento da ADA (American Diabetes Association) reduziu a recomendação de concentração de LDL de abaixo 130mg/dl(53), para LDL <100mg/dl (51; 54), colocando como meta opcional LDL <70mg/dL.

#### 1.3. O metabolismo do colesterol e lipoproteínas

O colesterol é um componente essencial para os seres vivos, com funções importantes na constituição de membranas celulares e organelas, e síntese hormonal. No sangue dois terços do colesterol transportado é o éster de colesterol, e em função de sua característica hidrofóbica são transportados no plasma pelas lipoproteínas(56).

As lipoproteínas são partículas esféricas, constituídas pelos lípides hidrofóbicos como éster de colesterol e triglicérides, que ocupam o centro ou core da partícula, e substâncias hidrofílicas - colesterol livre, ou não esterificado, e proteínas e fosfolípides dispostos na sua superfície(56). (FIGURA 1).

Existem diferentes tipos de lipoproteínas que são classificadas pelo tipo de lipídio que carregam e pela sua densidade (TABELA 1). Dependendo de seu local de síntese terá um diferente conteúdo lipídico e protéico. São as proteínas presentes nas lipoproteínas, ou apolipoproteínas (apo) (TABELA 2), que permitem a interação da lipoproteína com seus receptores de diferentes tecidos. As apos também atuam como

cofatores para diferentes enzimas que agem sob o conteúdo lipídico das lipoproteínas, sendo importante para a homeostase do colesterol plasmático. (57; 58)

Lípides polar superfície

Fosfolípide Colesterol livre

Apolipoproteína

Lípides não polar Core

Ester de colesterol triglicérides

Apolipoproteína

Figura 1. Modelo esquemático da lipoproteína plasmática.

Adaptada de LipoScience(59).

A concentração de colesterol no plasma é diretamente proporcional ao risco de doença cardiovascular(60). Por conseqüência fatores envolvidos na regulação da síntese, transporte das lipoproteínas, e degradação do colesterol, estarão envolvidos direta ou indiretamente com fisiopatologia da aterosclerose(61).

TABELA 1: Principais tipos de lipoproteínas presentes no plasma e suas características.

Tipo	Tamanho (nm)	Origem tecidual	Lípides constituintes	Principais apolipoproteínas
	Densidade (g/mL)			
Quilomicrom	50-200/ < 0.95	Intestino	85% Triglicérides 9% fosfolípides 4% colesterol	2% proteínas Principal-B48 Outras- A1, A4 (E, C1, C2, C3—transferido da HDL)
Quilomicrom remanescente	<1.006	Intestino	60% Triglicérides 20% colesterol	B48, E
	30-70/<1.006		50% Triglicérides 20% Colesterol	10% proteínas Principal-B100
VLDL		Fígado	20% fosfolipide	Outras-E, C1, C2, C3
VDL	1.006-1.019		35% Colesterol 25%	
remanescente		Derivado do VLDL	triglicérides	B100, E
LDL	20-25/1.019-	Derivado do VLDL remanescente	45% Colesterol 20% fosfolipide 10% triglicérides	25% de proteína Principal-B100
HDL	8-11/1.063-	Fígado,intestino, plasma	25% fosfolípides 15% Colesterol 5% triglicérides	55% de proteína Principal- A1 Outras- A2, C1, C2, C3, E
$HDL_2$	/1.063-1.125			
$HDL_3$	/1.125-1.21			
Lp(a)	/1.05-1.09	Fígado	60% Colesterol 5% triglicérides	B100, apo(a)

Adaptado de Maheley(56)

TABELA 2: Características e principais funções das principais apolipoproteínas.

Apolipoproteínas	Concentração* / PM(×1000)	Principais locais de síntese	Função principal
A1	130/ 29	Fígado intestino	Proteína estrutural /HDL; Cofator para LCAT; Importante TRC;Ligante de ABCA1 e SR-B1
A2	40/≅17 (dimer)	Fígado	Inibição da ligação da apo-E com receptores (complexo E-AII)
A4	40/≅45	Intestino	Facilita o efluxo de colesterol das células; Ativador da LCAT; Facilita a secreção de lípides pelo intestino
A5	<1/39	Fígado	Ativação da LPL-mediando lipolise; provável inibição hepática da síntese de
			VLDL
B100	85/≅513	Fígado	Proteína estrutural /VLDL and LDL; Ligante do receptor de LDL
B48	Variável/≅241	Intestino	Proteína estrutural /Quilomicrons
C1	6/≅6.6	Fígado	Modula a ligação de remanescentes aos receptores; ativa LCAT
C2	3/8.9	Fígado	Cofator da LPL
C3	12/ 8.8	Fígado	Modula a ligação de remanescentes aos receptores; Inibidor da LPL
E	5 /≅34	Fígado, cérebro, pele, testículos, Baço	Ligante dos receptores de LDL e remanescentes; redistribuição de lípides local; TRC(HDL com apo-E)

mg/dL. PM- peso molecular; ABCA1-ATP binding cassette transportador A1; apo-apolipoproteina; HDL- lipoproteina de alta densidade; LCAT-lecitina-colesterol aciltransferase; LDL-lipoproteina de Baixa Densidade; LPL- lipase lipoprotéica; SR-BI-scavenger receptor tipo BI; VLDL-lipoproteína de muito baixa densidade. Adaptado de Maheley(56)

#### 1.3.1 Enzimas envolvidas na homeostase

#### -Lecitina Colesterol Acil-Transferase (LCAT)

LCAT é uma enzima sintetizada no fígado que ao ser secretada na circulação vai se associar a lipoproteínas e lipídios livres. Catalisam a transferência de 2 grupos acil da lecitina e fosfotidilcetoetanolamina para colesterol livre(62). A reação da LCAT utiliza apo A1 como cofator, resultando em mais moléculas de éster de colesterol que por serem hidrofóbicas vão acumulando no interior da partícula de HDL e permitindo que outras moléculas de colesterol livre sejam captadas pela HDL(62). A LCAT também é capaz de esterificar o colesterol na LDL, mas sua ação é mais favorável na HDL pois a apo A1 que é um excelente cofator para ação dessa enzima, é a apo mais encontrada nas HDLs(61).

A reação de esterificação do colesterol no plasma é determinado pela atividade de LCAT, concentração de TG e o tipo de HDL, sendo que a  $HDL_2$  tem maior atividade de LCAT que  $HDL_3$ (63).

#### -Proteína transportadora de éster de colesterol

A CETP (proteína transportadora de éster de colesterol) é sintetizada no fígado e tecido adiposo e secretada já associada ao HDL para a circulação(62). Realiza a troca de triglicérides e éster de colesterol entre as lipoproteínas. As proteínas ricas em TG (VLDL, VLDL remanescente e o quilomocrom remanescente) recebem EC das HDL e LDL, e enriquecem-se com TG. Vamos ter partículas de HDL maiores, ricas em TG e depletadas de EC. A LDL por sua vez se transforma pela lipase em LDL pequena e densa, rica em TG e pobre em EC. O processo de transferência de lípides entre as lipoproteínas via CETP é dependente da atividade de CETP, da concentração de HDL e de lipoproteínas ricas em TG e também do conteúdo de fosfolípide e colesterol livre dessas partículas(64).

#### -Proteína Transportadora de Fosfolípides

A proteína transportadora de fosfolípides (PLTP) é responsável pela

transferência de fosfolípides e colesterol livre entre lipoproteínas durante a lipólise e pode promover a transferência de éster de colesterol entre lipoproteínas ricas em TG(62; 63). É uma enzima sintetizada no fígado, pulmão e tecido adiposo. Regula o tamanho e a composição das partículas de HDL. Sendo importante para o transporte reverso de colesterol.

#### Lípases

São as principais enzimas envolvidas na interação das diferentes lipoproteínas. São solúveis em água, e tem como função hidrolisar as cadeias éster dos lipídios hidrofóbicos (TG, fosfolípides e éster de colesterol). A lípase endotelial, lípase hepática e lípase lipoprotéica- migram para células endoteliais e se ancoram nos tecidos por meio do heparan sulfato(62).

A lípase endotelial é responsável pela hidrólise de fosfolípides de VLDL, QM e HDL. A lípase hepática (LH) faz hidrólise de TG proveniente do VLDL e VLDL remanescentes, e também é capaz de converter HDL<sub>2</sub> para HDL<sub>3</sub> que são partículas mais densas. A lípase lipoprotéica (LPL) está envolvida na hidrólise de TG no músculo, tecido adiposo e macrófagos, gerando AGL(ácido graxo livre) e glicerol para o estoque de energia e ações metabólicas(62).

#### 1.3.2 A homeostase das lipoproteínas

A homeostase das lipoproteínas está envolvida diretamente com a síntese de colesterol pelo fígado, e com o colesterol proveniente da dieta. (Figura 2). Existem nos seres humanos diferenças genéticas a considerar nessa regulação de ambos os mecanismos, mas em geral 70% do colesterol terá origem na síntese hepática e apenas 30% é proveniente da dieta(65).

#### 1.3.2.1 Síntese de colesterol celular

O início da síntese de colesterol se dá partir da acetil Coenzima-A (acetil-CoA)

que direcionada para a via do mevalonato gera diferentes compostos precursores até formar o colesterol. Um ponto chave nessa produção e a conversão de HMG-CoA (Hidroxi-metil-glutaril-Coenzima A) para mevalonato pela HMG-CoA redutase. Esta e outras enzimas finais da síntese são associadas ao retículo endoplasmático. No retículo endoplasmático também teremos enzimas chaves dessa regulação da produção como as que hidroxilam o colesterol e geram oxiesterois e enzimas que esterificam o colesterol, adicionando um ácido graxo no carbono 3 da cadeia de colesterol(66).

A regulação da síntese e captação de éster de colesterol nos hepatócitos se dá por receptores nucleares SREBP (sterol regulatory element binding protein) e LXR (receptor X hepático). O estímulo de SREBP aumenta a transcrição de genes relacionados à síntese de colesterol, enquanto o estímulo de LXR facilita o transporte reverso, e aumenta a secreção de ácido biliares(66; 67).

VLDL-R LDL-R Colesterol e ácidos biliares Fígado SRB1 VLDL ABCA1 LDL-R Gordura e LPL colesterol da dieta **VLDLR** HDL LPL Intestino Tecido periférico LDL-R Degradação da Efluxo lipoproteína A-I **HDL** Nascente

Figura 2: Diagrama esquemático do metabolismo das lipoproteínas.

QM- quilomicrom; QR- QM remanescente; VLDL- lipoproteina de muito baixa densidade; VLDLR- VLDL remnescente; LDL- lipoproteína de baixa densidade; HDL- lipoproteína de alta densidade; SRB1- receptor scavenger tipo b classe 1; LDL-R-receptor de LDL; CETP- proteína de transferencia do ester de colesterol; LCAT- lecitina colesterol acil transferase; LPL- lipase lipoprotéica; VLDL-R- receptor de VLDL; LH- lipase hepática; FC- colesterol livre; ABCA1- ATP binding cassete transportador tipo 1; LRP- receptor relacionado a lipoproteina. Adaptado de Chan. (68)

SREBP que está no retículo endoplasmático é ativado quando temos baixo conteúdo de colesterol intracelular, sendo transportado ao complexo de Golgi, então SREBP sofre proteólise, migra ao núcleo e ativa a transcrição de HMG-CoA redutase e do receptor de LDL. O acúmulo de colesterol intracelular bloqueia esse transporte da SREBP ao núcleo por meio de alteração conformacionais de duas proteínas

chaperonas a INSIG(Insulin induced gene) e SCAP(SREBP clevage activating protein). SCAP está associada ao SREBP e a INSIG está ligada ao retículo endoplasmático. A ligação de 25 hidroxi- colesterol com INSIG faz as chaperonas ligarem-se entre si, e não permite que a SCAP entre no reticulo endoplasmático rugoso, diminuindo a síntese HMG-CoA e dos receptor de LDL(69; 70).

Um importante mecanismo para redução de colesterol livre no retículo endoplasmático é a esterificação, que será catalisada pela Acil- CoA aciltransferase (ACAT). Ácidos graxos esterificados são estocados em gotas lipídicas que se projetam a partir do retículo endoplasmático. A gênese e a degradação das gotas lipídicas não está totalmente entendida, e sofre influência da proteína caveolin, que também age no processo de regulação das caveulas, e dos TG(66).

A captação de lipoproteínas plasmáticas é um fator importante na regulação da síntese de colesterol pelo fígado, sendo o receptor de LDL um dos principais receptores envolvidos nesta captação. O receptor de LDL reconhece as apos B100, presentes no VLDL, VLDL remanescentes e LDL, e apo E presentes em remanescentes de Quilomicrons e VLDL, e VLDL(71).

Já foi esclarecido que após o reconhecimento da apo pelo seu receptor a partícula de lipoproteína sofre endocitose pela vesícula de clatrina e é transportada para compartimentos endocíticos ácidos, no qual os éster de colesterol são hidrolisados pela lípase ácida para originar colesterol livre que passam a se juntar ao pool de colesterol livre das células. Grande parte do colesterol endocitado nas partículas vai servir para reciclar o conteúdo de colesterol de vesículas internas e das membranas lisossomais. As membranas de colesterol que remanescerem são enriquecidas com fosfolípides LBPA/ BMP (acidolisobifosfatidico/ bismono acilglicerofosfato) que servem como reguladores no transporte interno do colesterol(66).

Os ésteres de colesterol podem acumular nas células e exceder o conteúdo de colesterol livre destas como acontece com os macrófagos, por exemplo. Já derivados oxidados do colesterol, tem maior afinidade pela membrana e movem-se livremente no meio aquoso podendo funcionar como sinalizador lipídico. No fígado pela característica de serem solubilizados costumam ser secretados na bile, como ácidos

biliar. O éster de colesterol por suas características tem de se intercalar com gotas de lipídios para gerar um estoque de colesterol intracelular. Tanto essas gotas de éster de colesterol acumulados, como os éster de colesterol captados das lipoproteínas plasmáticas, quando nos hepatócitos, são primeiros hidrolisados para gerar colesterol não esterificado ou livre, e após a hidrólise serão direcionados para reposição de membrana ou síntese de lipoproteínas principalmente a VLDL(66).

#### 1.3.2.2. Metabolismo das lipoproteínas Apo B 48

O colesterol proveniente da dieta é transportado do intestino para o fígado e deste, é distribuído pelo organismo. Na luz do intestino delgado o colesterol da dieta vai ser solubilizado em micelas pelos esteróis do ácido biliar, de forma que podem então difundir-se pelos enterócitos(66).

Na membrana de enterócitos temos diferentes transportadores ABCG5 e ABCG8 que são capazes de realizar o transporte do colesterol dos enterócitos para a luz intestinal. A NPC1L1(Niemman- Pick C1 like 1) facilita a captação de micelas pelo enterócito, e quando inibida reduz de modo significativo a absorção de colesterol(66).

O processo de absorção deste colesterol da dieta é complexo e envolve a síntese nos enterócitos dos quilomicrons, que é a lipoproteína responsável em entregar o conteúdo de TG e colesterol da dieta ao fígado. A via pela qual os colesteróis das micelas chegam ao retículo endoplasmático do enterócito para dar inicio a síntese do quilomicron é desconhecido. Quando no retículo endoplasmático, o colesterol das micelas é esterificado pela ACAT e alocado em vesículas conjuntamente com a síntese da apo B48, originando o quilomicron, que será secretado via vesículas COPII até os vasos linfáticos(66).

Os QMs uma vez na circulação linfática e venosa vão adquirindo apos, entre elas apo E, que determinará o clearance hepático dessa lipoproteína (conforme explicado anteriormente). A apo E vai interagir com a LH que permite a hidrólise do TG gerando um quilomicron remanescente, que pode ser captado pelo fígado via receptor de LDL e LRP(proteína relacionada ao receptor de LDL), sendo a partícula internalizada como um todo, e oferecendo dessa forma seu conteúdo lipídico para a

hidrolise, direcionando o AGL e colesterol para a síntese de VLDL(72).

#### 1.3.2.3 Metabolismo de lipoproteínas Apo B 100

A síntese de VLDL inicia-se quando houver suficiente conteúdo de lípides no retículo endoplasmático, síntese de Apo B100 e interação com MTP (proteína de transferência de triglicérides microssomal). A MTP é importante para catalisar e incorporar os lípides na Apo B100. Uma partícula imatura de VLDL é secretada a partir do retículo endoplasmático e vai ao complexo de golgi, onde será adicionado TG. Logo temos a formação de um VLDL pobre em TG ou VLDL2 que pode ser secretado, ou continuar a ser lipidado, por um processo provavelmente dependente de ARF (ADP- fator ribosilação) e vir a constituir um VLDL rico em TG ou VLDL1 (61).

A conversão do VLDL2 para um VLDL1 requer um grande enriquecimento de TG o que difere do enriquecimento inicial de formação da Apo B100. A VLDL1 é dependente da concentração de TG no citossol, que muitas vezes encontram-se estocados nas gotas de lípides citoplasmáticas. O fígado é capaz de secretar partículas menores de lipoproteínas como as VLDL remanescentes, e até mesmo o LDL.(73)

VLDL, VLDL remanescente e LDL são lipoproteínas que possuem uma apo B100 por partícula. A VLDL tem a capacidade de trocar apo E por apo C2 das HDL circulantes. A VLDL 1 secretada pelo hepatócito, após adquirir apo C2 e E, pode interagir com LPL que hidroxila os lípides gerando as VLDL remanescentes, partículas com menor conteúdo de TG e apo C2, que serão hidrolisadas pela LH e também pela LPL formando as LDL. A captação hepática de VLDL remanescentes pode se dar pelo receptor de LDL, VLDL(74) e LRP1(75). Quanto maior a partícula de VLDL remanescentes maior a afinidade por esses receptores. Já partículas menores são mais suscetíveis a ação LPL originando o LDL(76). Durante todo esse processo a apo B100 permanece na partícula. (77)

Logo é a VLDL produzida e liberada na circulação pelo fígado que ao ser metabolizada pela ação de enzimas, como explicado acima, se transforma em LDL. A LDL é a partícula com a meia vida mais longa em, torno de três dias, uma característica atribuída a sua menor interação com as apos que estimulam hidrólise de colesterol via lipases, e por ter um conteúdo de éster colesterol mais estável no interior da partícula(56).

Aproximadamente dois terços da LDL é captada preferencialmente via receptor de LDL (61), sendo que 75% é captado pelos hepatócitos, e o restante é distribuído pelos tecidos. É a presença dos receptor de LDL nos tecidos periféricos, que permite que o LDL realize seu papel de distribuição de CE para as células. O terço não captado pelos receptores de LDL provavelmente envolvem processos de captação sem mediação de receptor. (56)

A concentração plasmática do LDL vai depender da concentração de VLDL, um competidor natural pelo receptor de LDL e LRP, e a diminuição do catabolismo receptor de LDL. Maiores concentrações de VLDL, VLDL remanescentes significam maior concentração de apo E, que tem maior afinidade pelo receptor de LDL, do que apo B100. ApoE em humanos possui diferentes isoformas determinadas por diferentes constituições de aminoácidos em suas cadeias, o que determina afinidade pelo receptor de LDL diferentes. A Isoforma E2 tem menor afinidade pelo receptor e leva a hiperlipemia familiar, com baixos valores de LDL(56; 61); já a isoforma E4 com maior afinidade, leva à diminuição na concentração de HDL, aumento de LDL e aumento do colesterol total.

É o LDL então a principal lipoproteína circulante e acaba distribuindo a maior parte de colesterol para os tecidos periféricos. Quando tecidos periféricos estão ricos em éster de colesterol são capazes de gerar HDL nascentes, e esta lipoproteína vai recolher o colesterol em excesso e transportá-lo até o fígado num processo denominado de transporte reverso do colesterol (TRC)(56; 66).

#### 1.4 O Transporte Reverso do Colesterol

Os transportadores ABC surgiram como reguladores do transportes de colesterol de células de tecidos periféricos para lipoproteínas plasmáticas a HDL. O hepatócito é a principal fonte de HDL e Apo A1. A produção de apo A1 vai utilizar lípides provenientes da síntese "de novo" e da recaptação de LDL e do ABCA1

hepático. É o ABCA1(transportador ABC cassete A1) um dos passos limitantes na formação da partícula de HDL e manutenção da concentração desta no plasma(78). A ligação de apo A1 com o receptor ABCA1 é o passo inicial para desencadear a transferência de fosfolípides e colesterol para apo A1 e gerar a partícula discóide de HDL, ou HDL nascente. ABCG1(transportador ABC cassete G1) coopera com ABCA1 adicionando colesterol a partícula de HDL já madura(79).

Nesse processo de maturação da partícula de HDL a ação da LCAT, convertendo o colesterol livre em éster é fundamental. O EC por ser mais hidrofóbico do que o livre migra para o interior da partícula, levando a mudança geométrica desta. O colesterol livre é proveniente das outras lipoproteínas e dos tecidos. Quanto menor a HDL maior atividade da LCAT, e conforme aumenta o diâmetro da HDL diminui a afinidade da LCAT da superfície da partícula(61).

A lípase endotelial também vai regular a hidrólise de fosfolípides nas HDL, inibindo o efluxo de colesterol via SR-B1, e aumentando o efluxo via ABCA1 e a captação de HDL no fígado(62).

Diferente da captação da partícula de LDL, que é retirada como um todo da circulação, a captação de éster de colesterol de HDL pelos hepatócitos se dá pelo SR-B1, que capta apenas o conteúdo de colesterol das HDL, enquanto os demais lípides e proteínas permanecem na partícula. Desta forma, a HDL 2 e 3 podem ser rapidamente recicladas a pré-β- HDL e o TRC pode ser reiniciado.(79)

No desenvolvimento da aterosclerose, a eliminação do colesterol dos macrófagos é o passo fundamental para prevenir a formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica. A maior parte do colesterol encontrado nas células espumosas, que são formadas a partir de macrófagos ricos em colesterol e são a principal célula na placa aterosclerática, estão estocados como gotas lipídica e o aumento da hidrólise do EC, leva ao acúmulo de colesterol livre que vai aumentar o fluxo de colesterol a partir de macrófagos para as HDL, em um processo que é dependente de receptores como ABCA1 e ABCG1. Os macrófagos que possuem incapacidade de secretar colesterol via ABCA1 e ABCG1 tem uma interrupção completa do fluxo de colesterol in vitro, e in vivo, o que favorece a aterosclerose(79). O SR-B1 também facilitam o efluxo de colesterol a partir de macrófagos para HDL in vitro, mas não

promovem o efluxo de macrófagos in vivo, provavelmente por captar seletivamente éster de colesterol de HDL e LDL pelo SR-B1 in vivo(80).

#### 1.5.-A Dislipidemia no diabetes mellitus tipo 2

A dislipidemia no diabético tem origem complexa, e envolve alterações na concentração, composição e no metabolismo das lipoproteínas, sendo resultantes da RI e da hiperinsulinemia(64).

A dislipidemia diabética clássica é caracterizada pela baixa concentração de HDL, apo A1, alta concentração de VLDL, TG e a maior proporção de LDL pequeno e denso, que são principalmente encontrados em diabéticos em estado de mau controle glicêmico sendo a RI associada a este perfil(45; 81; 82). Tanto HDL baixo e LDL pequeno e denso são considerados fatores de risco independentes para a doença macrovascular. A diminuição de apo A1 e o aumento de apo B tem sido associada à doença coronária prematura(82).

A hiperinsulinemia, que comumente é encontrada em DM2 induz a ativação de transcrição SREBP-1c no fígado, por mecanismos independentes da sinalização do receptor de insulina(83).

Altas concentrações de VLDL e os elevados valores de TG, encontrados nos diabéticos, ocorrem por uma maior produção de VLDL ricos em TG e por uma redução do clearance de VLDL(26), aumentando a concentração de VLDL remanescentes. O aumento de TG é maior quando o DM2 está descompensado por aumento dos AGL que chegam ao fígado, e pela diminuição do clearance de VLDL via lípase lipoprotéica que é estimulada pela insulina(64; 73).

Os baixos valores de HDL ocorrem por uma alteração na produção de HDL nascente, pelo aumento do clearance de HDL e aumento da transferência de EC do HDL para VLDL via CETP. Na presença da CETP o excesso de VLDL secretado no plasma rico em TG, vai transferir seu conteúdo de TG para a HDL e LDL, e depletando a HDL e LDL de éster de colesterol. O resultado é uma HDL com menor conteúdo de éster de colesterol para o transporte reverso para o fígado, e a perda de apo A1 por essas partículas, vai reduzir a concentração de HDL disponível para o

TRC, por menor ação da LCAT(64; 79).

A RI aumenta a hidrólise dos TG no tecido adiposo, com aumento dos AGL circulantes que promovem a secreção de VLDL ricos em TG, que via CETP vão interagir tanto com o HDL, como com o LDL trocando TG por CE. Teremos então um aumento da degradação das HDL, com conseqüente redução da sua concentração(64). A LDL rica em TG e com pouco CE, LDL de padrão β é menor e mais densa que uma LDL normal, o que permite que ela penetre mais facilmente a parede dos vasos sanguíneos e seja oxidada mais facilmente(82).

O aumento da atividade da LH na RI e DM pode levar uma maior hidrólise do TG das LDL. Maiores valores de AGL também estimulam a troca de TG entre LDL ou HDL, e EC das VLDL. Mesmo quando TG de jejum são normais, o diabético tem aumento dos TG pós-prandial, à custa de uma maior produção de QM e VLDL. Como todo o indivíduo, que no dia a dia está mais em fase pós-absortiva do que em jejum, a concentração de LDL pequena e densa é indicativa de significante hiperlipemia pós-prandial. O tipo de VLDL também é importante e o diabético tende a secretar VLDL maiores e mais ricas em TG que vão originar LDL mais ricos em TG, e conseqüentemente LDL pequenos e densos(73; 82).

Sabe-se que todas as partículas que contém apo B tem capacidade de migrar para o espaço subendotelial e acumular nas lesões ateroscleróticas, com exceção dos QM nascentes. Assim com uma mesma concentração de LDL, um paciente com LDL pequeno e denso tem mais partículas de LDL e esse maior número de partículas apo B é fundamental para o desenvolvimento da aterosclerose(64).

Essa propensão a LDL pequeno e denso, a hipertrigliceridemia, o aumento de VLDL remanescentes e os baixos valores de HDL, comuns ao diabetes, favorecem a alta incidência de DAC nesses pacientes, uma vez que cada uma das alterações lipídica está isoladamente associada ao aumento de risco para DCV(26).

Sabe-se que LDL que sofre glicação avançada, é mais aterogênicas que LDL não glicadas, somando outra razão, talvez a mais determinante para a DAC ser mais agressiva nos diabéticos(82).

#### 1.6- Estudos Cinéticos de lipoproteínas

Mudanças na taxa de produção, conversão e catabolismo de lipoproteínas vão levar a alterações na concentração de lipoproteínas e apos. Essas mudanças quantitativas são importantes, e facilmente mensuráveis, mas não revelam os mecanismos que desencadeiam as alterações lipídicas. Para tentar melhor decifrar esses mecanismos fisiológicos e patológicos do metabolismo de lipoproteínas são necessários estudos cinéticos.(73)

Brown e Goldenstein, em 1986, já atentavam ao fato dos estudos cinéticos de lipoproteínas permitirem avaliar de modo mais adequado as diferentes classes de lipoproteínas, ressaltando entretanto as dificuldades e segurança técnicas(84).

Estudo que utilizam traçadores são úteis pois permitem avaliar a concentração, o catabolismo e também as taxas de transporte de uma determinada partícula. Os traçadores podem ser radioativos ou isótopos estáveis e, pode se utilizar tanto lipoproteínas marcadas endógenas (um aminoácido marcado é incorporado a lipoproteína a ser estudada) ou exógenas (lipoproteínas são isoladas marcadas e reinjetadas no paciente)(85). Ambos os métodos tem vantagens e desvantagens. Traçadores radioativos são metodologias mais simples, que se limitam pela segurança do radioisótopo utilizado ao organismo(86-88).

Nos últimos anos, a grande parte dos estudos são realizados com marcação com isótopos estáveis. A injeção de aminoácidos marcados com isótopos instáveis é incorporada na síntese da proteína alvo, como apo B100 para avaliar cinética de VLDL e LDL. Diferentes modelos compartimentais já foram desenvolvidos estimando a taxa de produção e degradação dessas lipoproteínas(89).

O uso de emulsões artificiais para explorar o metabolismo de lipoproteínas principalmente quilomicrons(90-94) e LDL(95-99) vem se mostrando tecnicamente seguro e adequado, pois se utilizam nesses estudos nanoemulsões ricas sintetizadas a partir de lipídios artificiais preparadas sem proteínas, e adicionada à marcação radioativa(91-94; 96-104). Uma vez na corrente sanguínea as nanoemulsões artificiais adquirem apos(101), entre elas a Apo E, que é a responsável pela remoção da nanoemulsão do plasma mais rapidamente que o LDL nativo, encurtando o tempo

necessário para o estudo cinético de lipoproteínas(99; 105). Outra vantagem é o fato desta nanoemulsão a partir de um mesmo preparo, poder ser usada para diferentes indivíduos, o que não pode ser feito com uso das lipoproteínas naturais, cujo estudo cinético em cada paciente deve ser realizado com o preparo de lipoproteínas autólogas.

A cinética do LDL no plasma costuma ser avaliada pela marcação radioativa da Apo B, que é a única apo presente no LDL, que não sofre troca com outras lipoproteínas, e a cinética da Apo B reflete a do LDL (106; 107).

Gylling e Miettinen, em 1997, utilizando cinética de lipoproteína natural em diabéticos não insulino-dependentes evidenciaram um aumento da síntese e do clearance de LDL Apo B quando comparado com controles(107), isto explicaria o fato do diabético ter concentração normal de LDL. Esse padrão acelerado do fluxo de LDL, é semelhante ao observado em pacientes normolipêmicos com doença cardiovascular e em pacientes com hipercolesterolemia familiar, indicando que apesar da concentração semelhante de LDL o seu metabolismo teria um padrão metabólico próaterogenico(108; 109). Gylling e Miettinen, em 1996, já haviam avaliado a cinética de lipoproteína natural em diabéticos com e sem DAC, não evidenciando diferença nem na taxa de produção nem no clearance da LDL Apo B(110)

Santos, Hueb e col., em 2003, estudando pacientes com DCV definida pela cineangiocoronariografia, sem diabetes, com o uso de nonaemulsão lipídica com dupla marcação, <sup>14</sup>C- éster de colesterol (CE) e <sup>3</sup>H-colesterol livre (CL), mostraram que há diferença no clearance plasmático do colesterol livre, que é mais rápido nos pacientes com DAC estabelecida em comparação com doentes sem doença coronária(96). Não houve diferença no clearance de CE entre esses dois grupos. Couto, Dallan e col. em 2007 utilizando a mesma nanoemulsão com dupla marcação mostraram um maior depósito de CL na aorta, artéria torácica interna e veia safena de pacientes com DAC(95). Postulou-se a partir desses estudos um novo mecanismo para gênese da doença coronária no qual o CL ao dissociar-se das partículas de LDL e se depositar na parede dos vasos pode favorecer o surgimento ou progressão da placa aterosclerótica(95; 96).

#### **JUSTIFICATIVA**

Nossa proposta é estudar a cinética do colesterol livre e esterificado, presente na nanoemulsão lipídica artificial LDL-símile, em pacientes diabéticos tipo 2 assintomáticos para DAC. Uma vez que o diabetes é um importante fator de risco para doença coronária, avaliar se mesmo assintomáticos apresentariam diferenças no comportamento do EC e do CL.

### 2.OBJETIVO

- Avaliar em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2 a cinética plasmática do colesterol livre e esterificado utilizando nanoemulsões artificiais LDL – símile
- Avaliar se há diferença na cinética do colesterol livre e esterificado a partir da nanoemulsão artificial em pacientes diabéticos assintomáticos para DAC com ou sem aterosclerose subclínica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Local do Estudo

O estudo foi realizado na unidade de diabetes da disciplina de Endocrinologia e Metabologia no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Metabolismo de Lípides do InCor/FMUSP-SP.

#### 3.2. Casuística

Estudou-se pacientes diabéticos que tiveram como critério de inclusão: ser pacientes com diagnóstico de DM2, seguindo os critérios da ADA(51); ter no máximo 15 anos de doença; de ambos os sexos; com faixa etária entre 40 e 70 anos; assintomáticos para doença coronária; sem hipertensão arterial ou com hipertensão arterial controlada até 130 mmHg de pressão arterial sistólica (PAS) e 85 mmHg de pressão arterial diastólica (PAD)- em três medidas em dias diferentes; com valores de LDL até 160mg/dl.

Os pacientes foram comparados a um grupo controle que incluiu indivíduos sem alteração no metabolismo de carboidratos, segundo o critério da ADA(54). Os pacientes do grupo controle também podiam apresentar hipertensão arterial controlada, até 130mmHg de PAS e 85mmHg de PAD em três medidas em dias diferentes; e valores de LDL até 160mg/dl.

Foram excluídos os pacientes diabéticos e controles que: em uso glitazonas nos últimos 3 meses, e em uso de glicocorticóide; mulheres que estejam na menacme, ou com última menstruação há menos de 1 ano; presença de retinopatia proliferativa; insuficiência renal crônica (Creatinina>1,5mg/dl); insuficiência cardíaca e hepática, asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, tireoidopatia descompensada, doença inflamatória e oncológica. Todos pacientes em uso de sinvastatina ou fibrato tiveram seu uso suspenso por um mês e reavaliados seus valores de colesterol total, LDL, e triglicérides para inclusão no estudo.

Os pacientes foram estudados após consentimento informado de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética local.

#### 3.2.1 Avaliação clínica dos pacientes

Os pacientes que freqüentam a Unidade de Diabetes do Hospital das Clínicas foram avaliados clinicamente por anamnese e exame físico para queixas relativas à doença coronária (angina, dispnéia, palpitação), sendo tomados parâmetros clínicos de freqüência cardíaca, pressão arterial, peso em kilogramas (kg), altura (A) em metro (m), IMC (kg/m²), circunferência abdominal e quadril em centímetros (cm). Foram submetidos à análise laboratorial sérica de glicemia jejum, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, colesterol livre, triglicérides, uréia, creatinina, TSH (hormônio tireoestimulante) e hemograma completo. Calculou-se ainda o índice TG/HDL e a quantidade de éster de colesterol (EC), EC=colesterol total- colesterol Livre.

Os indivíduos controles foram selecionados por pesquisa ativa com acompanhantes, funcionários e colegas de outros ambulatórios do Hospital das clínicas. Sendo submetidos à mesma avaliação clínica e laboratorial que os diabéticos.

#### 3.3. Determinações bioquímicas

Amostras de sangue venoso dos diabéticos e controles foram obtidas após jejum de 12 horas, com dieta anterior habitual. Neste mesmo dia também foram realizados os estudos cinéticos.

Na divisão do laboratório central do HCFMUSP foram realizados as concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total, HDL, e glicemia, mensurados através do método enzimático colorimétrico automatizado e o colesterol de LDL foi mensurado pelo método cinético automatizado. As mensurações da concentrações plasmáticas de apo A1 e B por turbidimetria (Roche/ Hitachi – Roche Diagnostics –Mannheim) e a de apoE por nefelometria. A dosagem do colesterol livre foi

feita pelo método enzimático colorimétrico (Wako-wako Pure Chemical industrie), no laboratório de lípides e metabolismo do InCor.

Mensuramos a hemoglobina glicada, utilizando sangue total, pelo método HLPC, certificado pelo Nacional Glyco Hemoglobin Standardization Program (NGSP-EUA), considerando como valor normal entre 4,1 a 6,0%. A glicemia foi medida pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Roche/ Hitachi – Roche Diagnostics – Mannheim).

Para determinação quantitativa da insulina no soro foi utilizado o sistema de imuno-ensaio automatizado autodelfia (Perkin-Elmer Life Science, Wallac, Oy, Finland) e do TSH (Life Science, Wallac, Oy, Finland) pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42 do HCFMUSP.

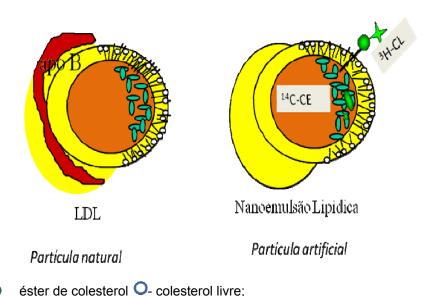
#### 3.4 Preparação da nanoemulsão lipídica artificial

As nanoemulsões utilizadas foram preparadas segundo a técnica descrita por Ginsberg e colaboradores(111) modificada por Maranhão e colaboradores(112) a partir de misturas lipídicas constituídas de 20mg de fosfatidilcolina, 40mg de éster de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5mg de colesterol (Sigma Chemical Co – St. Louis, EUA). À mistura são adicionados 70kBq de <sup>14</sup>C-éster de colesterol (<sup>14</sup>C-EC) e 70kBq <sup>3</sup>H-colesterol (<sup>3</sup>H-CL) (Perkin-Elmer, Estados Unidos da America) para o preparo da nanoemulsão para o estudo da cinética plasmática do colesterol, esterificação de colesterol livre e transferência de lípides in vivo. Para o ensaio de transferência de lípides de uma nanoemulsão artificial lipídica para a HDL in vitro, são adicionados <sup>3</sup>H-éster de colesterol (<sup>3</sup>H-EC) e <sup>14</sup>C-fosfatidilcolina (<sup>14</sup>C-PL) ou <sup>3</sup>H-triglicerídeos (<sup>3</sup>H-TG) e <sup>14</sup>C-colesterol livre (<sup>14</sup>C-CL)( Ameshan Life Science). Na figura temos o modelo a da partícula LDL- símile com as marcações para o ensaio da cinética plasmática do colesterol.

A seguir, a mistura é seca sob fluxo de nitrogênio, em banho-maria a 37°C e mantida em dessecação a vácuo a 4°C por 16 horas, para remoção dos solventes residuais. A mistura lipídica é, posteriormente, ressuspensa em 10ml de tampão-Tris

HCl, e a suspensão emulsificada por irradiação ultra-sônica de 125Watts no modo de operação "contínuo", por um período de 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio. A temperatura é mantida entre 51 a 55°C e a temperatura de fusão do éster de colesterol é monitorada por um termômetro de ponta inserido nos frascos durante o procedimento. A suspensão de lípides emulsificados é, então, transferida para tubos para duas etapas de ultracentrifugação, sendo a primeira a 195.000xg (30 min), em um rotor TH 641 (Sorvall) de ultracentrífuga, a 4°C. Os 10% da solução da parte superior do tubo, contendo partículas que flutuam em uma densidade de fundo de aproximadamente 1,006g/ml é removido e a densidade da solução restante é ajustada para 1,21g/ml por adição de KBr sólido. Uma segunda etapa de ultracentrifugação é realizada, a 195.000xg (120min) a 4°C. Após atingir a temperatura ambiente, 20 a 30% do topo do tubo é coletado. O KBr é removido por gel filtração em coluna de Sephadex G-25, equilibrada e eluída com solução fisiológica estéril. As preparações resultantes são ainda purificadas por 2 etapas de ultracentrifugação e filtrada através da passagem em filtro Millipore de 0,22μm.

Figura 3: Modelo esquemático da nanoemulsão lipídica artificial LDL símile. Notar ausência de apolipoproteínas na partícula artificial.



Todo o material utilizado é despirogenizado em estufa a 180°C, durante 90 minutos e, após, esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos. As emulsões foram testadas quanto a sua esterilidade e pirogenicidade antes da utilização nos participantes.

# 3.4.1. Cinética plasmática do <sup>3</sup>H-colesterol e <sup>14</sup>C-éster de colesterol a partir da nonoemulsão lipídica artificial.

Após coleta de sangue para determinações bioquímicas em jejum, os indivíduos foram submetidos à injeção endovenosa de aproximadamente 150µl da nanoemulsão marcada com <sup>3</sup>H-colesterol e <sup>14</sup>C-éster de colesterol. A seguir foram coletadas amostras de sangue (10ml) em tubo de ensaio contendo 250Ul de heparina sódica durante 24 horas nos intervalos de 5 minutos, 1 hora, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após a injeção da emulsão. Após a coleta de 1 hora era oferecido café da manhã padronizado. Após coleta de 4 horas era oferecido almoço.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 r.p.m., durante 10 minutos, em centrífuga Sorvall (modelo RT7, Wilmington, EUA) para obtenção de plasma. Alíquotas de 1,0 mL de plasma foram pipetadas em frascos de cintilação. Foram acrescentados a esses frascos, 5,0 mL de solução Ultima GoldTM XR (Packard – Groningen, Holanda) para a determinação da radioatividade presente nas amostras, utilizando-se um contador Beta (Packard, modelo 1660 TR, EUA).

## 3.4.2. Análise compartimental da curva de decaimento plasmático dos lípides radioativos

A radioatividade presente nas amostras de plasma dos participantes foi utilizada para a determinação das curvas de decaimento plasmático e cálculo dos parâmetros cinéticos dos componentes lipídicos radioativos da emulsão, através do programa computacional de análise compartimental, AnaComp® versão 4(113).

A curva de decaimento plasmático da radioatividade da nanoemulsão apresenta um perfil biexponencial com um rápido decaimento inicial, seguido de um decaimento

mais lento. Esse perfil levou à adoção de um modelo com quatro compartimentos (Figura 3), dois para o <sup>14</sup>C-CE e dois para <sup>3</sup>H-CL a partir do qual foram calculados os parâmetros cinéticos (k), para cada marcação da nanoemulsão. Os compartimentos e os parâmetros cinéticos desse modelo são definidos do seguinte modo:

- compartimento 1: nanoemulsão, introduzida no espaço intravascular, assim como foi injetada;
- compartimento 2: nanoemulsão após aquisição de apolipoproteínas, no plasma;
  - -k<sub>1.0</sub>: remoção não específica da nanoemulsão;
  - -k<sub>1.2</sub>: transformação da nanoemulsão pela aquisição de apolipoproteínas
- $-k_{2,0}$ : remoção da nanoemulsão do compartimento plasmático para espaço extravascular.

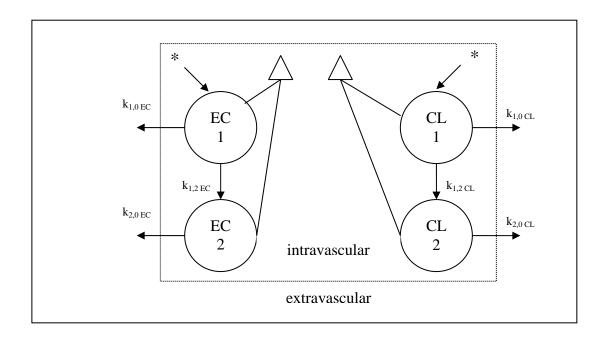
Para representar a remoção das partículas foram utilizados os parâmetros denominados taxas fracionais de remoção (TFR), em h<sup>-1</sup>, dos lípides marcados, utilizando-se as respectivas taxas fracionais de transferência (k).

(1) TFR = 
$$(k_{1,0} + k_{1,2}) \times k_{2,0} / k_{1,2} + k_{2,0}$$
.

# 3.4.3 Técnica para avaliar a esterificação do colesterol livre presente na nanoemulsão lipídica artificial

Alíquotas de 1000 μl de plasma dos participantes foram utilizadas para a extração dos lípides pelo método de Folch(114). As amostras foram extraídas com clorofórmio:metanol:água destilada (2:1:1, v/v/v) em 12 horas a 4 °C, o sobrenadante protéico foi aspirado e o infranadante, seco sob fluxo de nitrogênio, ressuspesso com 150 μL de solução de Folch e submetido à separação por cromatografia em camada delgada (TLC) (sílica-gel 60H, 0,5mm de espessura).

FIGURA 4. Modelo compartimental utilizado para analisar a cinética plasmática do <sup>14</sup>C-éster de colesterol e do <sup>3</sup>H-colesterol livre da nanoemulsão LDL-símile.



seta e asterisco indica a nanoemulsão sendo injetada na circulação. Triângulo indica mistura dos lipides radioativos 1- compartimento da nanoemulsão injetada. 2- compartimento após aquisição de apolipoproteinas. $k_{1,0EC}$  e  $k_{1,0CL}$  remoção não específica da nanoemulsão;  $k_{1,2CE}$  e  $k_{1,2}$  CL- transformação da nanoemulsão pela aquisição de apolipoproteínas;  $k_{2,0EC}$  e  $k_{2,0}$  CL - remoção da nanoemulsão do compartimento plasmático para espaço extravascular. Adaptado de Couto.(95)

Após a aplicação, as placas foram colocadas em sistema solvente, constituído de n-hexano/éter etílico/ácido acético glacial (70:30: 1, v/v/v), para separação das frações lipídicas. Separamos as bandas correspondentes ao éster de colesterol e ao colesterol livre, após serem reveladas por vapores metálicos de iodo. A seguir as bandas foram transferidas para "vials" de contagem contendo 5ml de solução cintiladora (PPO dimetil POPOP-Triton X-100-tolueno, 5g:0,5g:333ml:667ml;v/v/v/v). Radioatividade foi contada usando o espectrofotômetro Packard 1660 TR (Meridien, CT).

A Razão de esterificação foi calculada a partir da radioatividade <sup>3</sup>H- colesterol livre presente na banda de colesterol livre sobre a radioatividade <sup>3</sup>H medida na banda

de éster de colesterol para cada tempo do experimento (5 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas).

A porcentagem (%) de esterificação foi calculada, considerando como total de colesterol livre, a somatória da radioatividade <sup>3</sup>H na banda do colesterol livre e do éster de colesterol, para cada tempo do experimento.

- (1) RE= <sup>3</sup>H-banda de Colesterol livre/ <sup>3</sup>H na banda do éster Colesterol.
- (2) % esterificação = <sup>3</sup>H na banda de Colesterol esterificado/ <sup>3</sup>H colesterol livre total (<sup>3</sup>H na banda CE + <sup>3</sup>H banda CL) x100.

# 3.4.4 - Transferência de lípides radioativos de uma nanoemulsão artificial lipídica para HDL-C in vitro.

Para o ensaio de transferência de lípides de uma nanoemulsão artificial para a HDL, foram incubados 200  $\mu$ L de plasma com 50  $\mu$ L de cada solução de nanoemulsão marcada radioativamente: solução A-  $^3$ H-éster de colesterol ( $^3$ H-CE) e  $^{14}$ C-fosfatidilcolina ( $^{14}$ C-PL); e solução B-  $^3$ H-triglicerídeos ( $^3$ H-TG) e  $^{14}$ C-colesterol livre ( $^{14}$ C-CL), por 60minutos, a 37°C, em agitador orbital Gyromax 706R, sob agitação de 40 rpm. Após incubação, foram adicionados à mistura 250  $\mu$ L de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2%/ MgCl<sub>2</sub> 3M, v/v). A mistura foi agitada por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. Alíquotas de 250  $\mu$ L do sobrenadante, contendo a HDL, foram pipetadas em vials com solução cintiladora Ultima Gold e a radioatividade presente nas amostras foi quantificada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA). A quantificação dos lipídeos transferidos da nanoemulsão lipídica artificial para HDL plasmática foram expressas como percentagem (%) em relação à radioatividade total incubada(115).

#### 3.5. Avaliação quanto aterosclerose subclinica:

#### 3.5.1. Avaliação para detectar doença coronária no grupo diabético e controle:

Todos os pacientes foram submetidos à tomografia computadorizada de 64 colunas de detectores, aparelho de múltiplos detectores ou multislice.

Foram adquiridas até 40 imagens por segundo, sendo o sistema de resolução temporal máxima de 125-250 ms e a espessura de corte de 0,5mm. As imagens foram analisadas em estação de trabalho da *Toshiba* (*VITREA 2-Vital Images , Minnetonka,EUA*).

Para avaliação de escore de cálcio de Agatston e escore de volume, os pacientes não receberam qualquer tipo de contraste e o tempo total de duração do exame foi de 5 a 10 minutos. Foi utilizado "trigger" prospectivo e espessura de corte de 3 mm. Este estudo corresponde a uma exposição menor que 1 minuto aos raios X (dose de radiação de 2,6 a 4,0 mSv).

Utilizou-se beta-bloqueador, se freqüência cardíaca >65 bpm, buscando manter o paciente com FC entre 60 a 65 bpm durante o exame. O beta-bloqueador utilizado foi o metoprolol por via endovenosa na dose de 5 mg, repetido a cada 5 minutos se necessário até a dose máxima de 15mg.

#### 3.5.2-Ultrassonografia com dopller das artérias carótidas

Utilizou-se ultra-som vascular bidimensional APAGE 800 plus, ATL com transdutor linear de 7,5 MHZ de alta resolução banda larga na artéria carótida comum esquerda e direita, corte longitudinal cerca de 1 cm abaixo da bifurcação. O transdutor foi posicionado perpendicularmente ao vaso, de forma a permitir clara visualização da parede proximal, luz e parede distal com identificação das camadas íntima média e adventícia (116). As imagens foram gravadas em fita de vídeo cassete com registro eletrocardiográfico simultâneo. Foi selecionada uma imagem de calibração e três imagens da artéria em seu momento de maior diâmetro, nos 6ms da onda T e três imagens no momento de menor diâmetro no pico da onda R, sendo suas medidas

realizadas com auxílio de um programa computadorizado, desenvolvido no InCor, especificamente para análise do diâmetro , fluxo arterial e espessamento média intima.

Após calibração, foram delimitadas as fronteiras entre camadas médias e íntimas na parede proximal e fronteira interna- luz na parede distal. Os parâmetros medidos foram a relação intima/média. Assim, indivíduos com placas ou com relação íntima-média ≥ 0,8 mm em qualquer dos locais examinados foram considerados portadores de espessamento íntima-média. Todos os exames foram analisados por observador treinado e cego aos resultados.

Os pacientes diabéticos foram divididos em dois grupos quanto a presença quanto a presença de DAC diagnosticada: diabéticos com CAC presente e diabéticos sem CAC. Os pacientes do grupo controle foram excluídos quando apresentassem CAC.

#### 3.6. Segurança Radiológica

A dose radiológica injetada foi avaliada de acordo com as normas internacionais de proteção radiológicas. O parâmetro "Annual Limit for Intake" (ALI) de radionuclídeo é definido como a quantidade de radioisótopo que induz a uma dose equivalente de 50mSv. Para componentes orgânicos marcados com <sup>14</sup>C ou <sup>3</sup>H, os valores de ALI são 9 x 10<sup>7</sup> e 3 x 10<sup>9</sup>Bq, respectivamente. No presente estudo, a dose injetada de <sup>14</sup>C foi de 22,2 x 10<sup>4</sup>Bq, o que equivale a: (22,2 x 10<sup>4</sup> Bq / 9 x 10<sup>7</sup> Bq) x 50mSv = 0,1233mSv. Para o <sup>3</sup>H, a dose injetada foi de 44,4 x 10<sup>4</sup> Bq, portanto a dose equivalente: (44,4 x 10<sup>4</sup>Bq / 3 x 10<sup>9</sup>Bq) x 50mSv = 0,0075mSv. A dose equivalente incorporada no corpo inteiro, em conseqüência da exposição aos lípides radioativos, foi estimada em 0,04 mSv, conforme avaliado pelo método MIRD - Medical Internal Radiological Dosimetry(117). Os dados descritos para ratos pesando 0,4kg foram ajustados para seres humanos, estimando-se um peso médio de 70kg, utilizando-se um fator de correção com a equação seguinte:

KHomen =  $kRato \times (70kg/0.4kg)^{1-x}$ 

O valor exponencial X representa uma escala de variações interespécies da farmacocinética, levando em consideração o tempo biológico de cada espécie, que varia de 0,65 a 0,95. Considerando o valor de X=0,86, estima se para os seres humanos, um concentração plasmática total de 204mg/dL e uma excreção diária de colesterol de 1250mg/dia(118). Esse valor está dentro da média descrita em avaliações laboratoriais desses parâmetros, em seres humanos (119). O método acima descrito permite estimar que os participantes deste estudo recebessem por dose injetada de <sup>14</sup>C-éster de colesterol, 0,26mGy no intestino grosso inferior, 0,5mGy no intestino grosso superior, 0,18mGy na pele, 0,13mGy na superfície dos ossos e 0,13mGy no fígado. A dose recebida pelos pulmões, coração, ovários ou testículo é desprezível. Em conformidade com as normas de proteção radiológica (Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1988), este valor é muito inferior ao máximo permitido que é de 1mSv. A dose de radiação induzida pela injeção dos radioisótopos é menor que a obtida com a maioria dos procedimentos radiológicos, sendo cerca de 10 vezes menor que a dose induzida por uma radiografía de crânio(120).

A dose de radiação total com tomografia computadorizada encontra-se inteiramente dentro dos limites anuais de exposição ocupacional permitidos(121)

#### 3.7 Avaliação da resistência insulínica:

Utilizou-se a metodologia de Modelo da Avaliação da Homeostase - homeostasis model assessment (HOMA) que é um modelo matemático para definição da capacidade de secreção de célula β e da sensibilidade da Insulina em porcentagem a partir do HOMA Calculator(www.dtu.ox.sc.uk)(122). O HOMA foi realizado em pacientes diabéticos sem uso de insulina e todos os pacientes do grupo controle.

#### 3.8 Análises Estatísticas:

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvio-padrão e mediana. Para as variáveis qualitativas calcularam-se freqüências absolutas e relativas.

Para a comparação das médias dos dois grupos foi utilizado o teste t de Student. Quando a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada, utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para a comparação de três grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com comparações múltiplas realizadas através do teste de Dunn, pois a suposição de normalidade dos dados foi rejeitada. Para se testar a homogeneidade entre as proporções foi utilizada o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando ocorreram freqüências esperadas menores de 5. Para o estudo das correlações foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman(123).

O software utilizado para a realização dos testes foi o SPSS 15.0 for windows. O nível de significância utilizado para os testes foi de 5%.

#### 3.9. Apoio Financeiro:

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo- 07/55466-3

4.RESULTADOS

## 4.1. Características clínicas e determinações bioquímicas da população do estudo.

De 500 pacientes DM2 atendidos, foram selecionados 24 pacientes com características clínicas para participar no estudo, sendo que 7 foram excluídos por não descontinuarem a sinvastatina ou ao descontinuar apresentaram LDL > 160 mg/dL, 1 foi excluído por não fazer a tomografia de coronária, 2 excluídos por alteração na medicação durante o estudo, 2 por problemas técnicos do teste de cinética laboratorial (hemólise).

Dos controles selecionamos 12 pacientes, sendo que 1 foi excluídos por não realizarem a tomografia computadorizada, 2 por apresentar calcificação artéria coronária. Finalizamos então com 21 indivíduos, sendo 12 com DM2 e 09 controles.

A TABELA 3 mostra as características antropométricas e clínicas dos dois grupos. Temos que os diabéticos já possuem o diagnóstico de DM2 há 8,8 anos. A distribuição quanto a idade, raça e sexo entre os dois grupos é semelhante. Em relação a composição corporal não há diferença entre o peso, mas o IMC(30,9  $\pm$  4,06 vs. 26,4  $\pm$  1,94Kg/m², p<0,01) , a CA( 103,7  $\pm$  10,0 vs. 91,3  $\pm$  3,6 cm, p<0,01) e a relação CA/CQ (0,98  $\pm$  0,1 vs. 0,87  $\pm$  0,04, p<0,01) é maior no grupo de diabéticos do que no grupo controle. A presença de HAS e história Familiar(HF) para DAC foi semelhante nos dois grupos. Apenas 3 pacientes apresentam hipotiroidismo controlado, sendo 2 controles e apenas 1 diabético. Todos os 3 pacientes tabagistas faziam parte do grupo de diabetes.

TABELA 3: Características clínicas e antropométricas dos pacientes estudados.

	Diabéticos	Controle	Р
n	12	09	
Idade(ano)*	58,8 ±4,4	54,6 ± 5,1	0,07
Sexo Masculino**	6	5	1,00
Sexo Feminino**	6	4	1,00
Raça Branca**	9	6	1,00
Raça Negra**	3	3	1,00
Peso(kg)*	81,5 ±12,6	73,4 ± 6,5	0,11
IMC(kg/m <sup>2</sup> )*	30,96 ± 4,0	26,4 ± 1,9	<0,01
CA(cm)*	103,7± 10,0	91,3 ± 3,55	<0,01
CQ(cm)*	106,2 ± 8,8	105,2 ± 5,6	0,55
CA/ CQ(cm)*	$0.98 \pm 0.10$	$0.87 \pm 0.04$	<0,01
Tempo de			
Diabetes(ano)	8,8	-	
HAS**	8	4	0,40
HF para DAC**	3	4	0,40
Tabagismo**	3	0	0,22
Hipotiroidismo			
compensado**	(1)	(2)	0,55

Dados expressos pelas médias ± desvio padrão.\* Teste t \*\* teste Exato Fisher.

CA- circunferência abdominal, CQ- circunferência quadril, HAS- hipertensão arterial sistêmica, HF- história familiar.

Na Tabela 4 constam os medicamentos utilizados pelos pacientes. Do grupo de diabéticos observamos que todos os indivíduos faziam uso de metformina, 3 usam insulina, e 8 sulfoniluréias. O uso exclusivo de metformina foi feito por 6 pacientes, a associação sulfoniluréias e metformina foi a mais encontrada, sendo utilizada por 3 pacientes; 2 pacientes usavam metformina e insulina e apenas 1 paciente utilizava sulfonilureias, metformina e insulina (dados de associação de medicamentos não mostrados).

TABELA 4: Medicamentos utilizados pelos pacientes para tratamento do diabetes e das comorbidades

	Diabéticos	Controles	р
n	12	9	
Insulina(NPH ou regular)	3	-	0,11
Metformina	12	-	0,001
Sulfa	4	-	0,104
Betabloqueador	2	0	0,49
Bloqueador do receptor AT1	1	1	1,00
Inibidor da ECA	7	3	0,387
Bloqueador de Canal de Cálcio	3	2	1,00
Tiazídicos	2	1	1
AAS	4	0	0,104
Estatina( suspensa por 1mês)	3	0	0,229

Dados expressos em valores absolutos( percentagem) qui-quadrado, teste exato Fisher

Em relação aos anti-hipertensivos o mais utilizado tanto por diabéticos como controles foram os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), seguido pelos bloqueadores de canal de cálcio (anlodipino). Dos 8 pacientes diabéticos com HAS, 5 utilizavam associação de antihipertensivos, enquanto apenas 2 controles dos 5 hipertensos usavam mais de uma droga, entretanto sem diferença estatística entre os grupos (dados não mostrados). O uso de AAS foi observado apenas no grupo de diabéticos. O uso de estatina, prévio a inclusão, era feito por 3 pacientes diabéticos, todos com dose de 20mg dia, e nenhum paciente controle, porêm sem ser significativo(p=0,22).

A TABELA 5 mostra os parâmetros laboratoriais tais como a concentração plasmática de lípides e apos, controle glicêmico em diabéticos e controles. Em relação à concentração lípides e as Apoliproteínas A1, B e E não houve diferença entre os dois grupos. Apesar de não haver diferença entre os grupos da concentração de HDL e TG, os diabéticos apresentam menores média (44 vs. 61 mg/dL) e mediana (40 vs. 56

mg/dL) de HDL e maiores médias(150 vs. 111 mg/dL) e mediana (142 vs 97 mg/dL) de TG do que os controles. Não observamos diferença na razão TG/HDL para os diabéticos e controles, respectivamente.

Os diabéticos tinham controle glicêmico ruim apesar da utilização de medicamentos para controle glicêmico. A média da glicemia de jejum e  $A_{1c}$  nos grupo diabético e controle, foi de 171  $\pm$  104 mg/dL vs. 82  $\pm$  5mg/dL, p<0,01 e 8,9  $\pm$  2,1% vs 5,6  $\pm$  0,4%, p<0,01, respectivamente

A estimativa da secreção, da sensibilidade e da resistência à insulina dada pelo HOMA 2 feita só para os diabéticos sem uso de insulina podem ser visualizados na TABELA 6. Os pacientes diabéticos apresentam concentração insulina basal maior que os controles (12,4 ± 5,5 μU/mL vs. 5,8 ± 2,10μU/mL, p<0,01). A sensibilidade a insulina foi menor nos diabéticos do que nos controles (64,1 ± 42 vs. 149 ± 51%, p= <0,01), e o índice de RI também mostrou-se diferente entre os grupos 2,18 ± 1,21 vs. 0,74 ± 0,74, p= <0,01, sendo maior nos DM2. A capacidade de secreção da insulina pela célula  $\beta$ , avaliada pelo HOMA $\beta$  57 ± 43 vs. 99 ± 37 %, p= 0,06 não diferiu entre os grupos.

TABELA 5 : Característica dos exames laboratoriais dos pacientes estudados.

	Diabéticos	Controles	р
N	12	9	
Glicemia (mg /dl)	171 ± 104	82 ± 7,5	<0,01
A1c(%)	$8,9 \pm 2,1$	$5,6 \pm 0,43$	<0,01
Colesterol Total(mg/dL)	182 ± 41	197 ± 40	0,61
Colesterol não HDL	138 ± 36	136 ± 32	0,97
LDL	117 ± 16	113 ± 30	0, 80
HDL	44 ± 13	61 ± 26	0,13
Triglicérides	150 ± 66	111 ± 55	0,21
TG/HDL	$3.8 \pm 2.2$	2,0 🗆 1,5	0,05
VLDL	30 ± 13	22 ± 11	0,19
CL <sup>a</sup>	60 □14	62	0,96
EC <sup>a</sup>	126 ± 41	141 ± 32	0,42
Apolipoproteína (mg/dL)			
A1	130 ± 21	152 ± 44	0,70
В	93 ± 25	87 ± 21	0,60
Е	$4,5 \pm 2,1$	$4.0 \pm 1.2$	0,75

Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste não paramétrico de Mann- Whitney. <sup>a</sup>para n = 12 no grupo diabéticos e 7 no grupo controle.

TABELA 6: Valores estimados da concentração de Insulina, HOMA β , HOMAS e resistência a insulina

	Diabéticos	Controles	Р
N	9	9	
Insulina (µU/mL)	12,4 ± 5,5	5,8 ± 2,1	<0,01
Homaβ (%)	57 ± 43	99 ± 37	0,06
Homa S (%)	64 ± 42	149 ±51	<0,01
RI	2,18 ± 1,21	0,74 ±0,25	<0,01

Média ± desvio padrão. Teste não paramétrico de Mann- Whitney Média da concentração de insulina após jejum de 12 horas. HOMA β- capacidade de secreção de insulina pela célulab pancreática. Homa S- sensibilidade a insulina. RI índice de resistência a insulina(1/homaS)

#### 4.2 Doença macrovascular diagnosticada na população diabética

Na tabela 7 encontramos os achados da tomografia computadorizada das artérias coronárias com o score de cálcio de Agatston e escore de volume e o achado do USG de carótida desses pacientes. Notamos que 8 pacientes apresentaram CAC, mas não houve diferença entre as características clínicas e laboratorial dos DM2 com ou sem CAC. Já em relação aos controles notamos que eles continuam a apresentar CA e valores de glicemia de jejum e A<sub>1c</sub> menor que os DM2 com ou sem CAC.

Tabela 7 : Característica clínica nos diabéticos com e sem calcificação de artéria coronária e nos controles sem calcificação de artéria coronária.

	Diabéticos		Controle	
	CAC	Sem CAC		р
n	8	4	9	
Escore de Cálcio de				
Agatston	$70 \pm 73$	0	0	0,4
Escore Volumétrico	66 ± 61	0	0	0,4
EIM CCD(mm)	$0.8 \pm 0.20$	$0,68 \pm 0,10$		0,7
EIM CCE(mm)	1,1 ± 0,5	$0.84 \pm 0.21$		0,7
Tempo de diagnóstico	$7.8 \pm 3.9$	$8,7 \pm 5,4$		
Idade(ano)	59,7 ± 4.4	61.4 ± 1.5	55,0 ± 6.2	0,18
Sexo F/ M <sup>a</sup>	3/7	3/0		0,15
Raça Branca/ Negra <sup>a</sup>	5/2	3/0	5/1	1,00
Peso(kg)	82.2 ± 13.6	78.6 ± 9.2	73.0 ± 6.9	0,28
IMC(kg/m <sup>2</sup> )	$30,9 \pm 4,6$	$30,9 \pm 2.4$	26.3 ± 2.3	0,05
CA(cm)	105,0 ± 11	101,8 ±7,6	90,0 ± 3,2*	<0,01
CQ(cm)	107,5 ± 9,7	103.5 ± 12,5	$105,0 \pm 6,6$	0,86
CA/CQ	$0.98 \pm 0.05$	$1,0 \pm 0,20$	$0.86 \pm 0.04$	0,01
Glicemia(mg/dL)	189 ± 116	136 ± 28	82 ± 7,2*	0,04
A1c (%)	$9,2 \pm 2,5$	$8,0 \pm 0,23$	$5,6 \pm 0,5*$	<0,01
Colesterol Total(mg/dL)	186± 30	173 ± 53	194 ± 44	0,29
LDL	110 ± 14	131± 7	122 ± 34	0,28
HDL	48 ± 13	35 ± 8	47 ± 14	0,21
TG	125 ± 49	199 ± 59	125 ± 55	0,43
Apolipoproteínas(mg/dL)				
A1	133 ± 26	132 ± 4,9	131 ± 30	0,57
В	91± 27	96 ± 23	94 ± 21	0,96
E	5 ± 2,3	$3,1 \pm 0.5$	$3,4 \pm 0,9$	0,14

Dados expressos média± desvio padrão. CAC- calcificação de artéria coronária. dados expressam o número de casos; Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. controle difere Diabéticos com CAC e sem CAC, p<0,05(teste Dunn).

# 4.3. Cinética da nanoemulsão marcada com <sup>14</sup>C- éster de colesterol e <sup>3</sup>H-colesterol livre.

Nas Tabela 8 e 9 encontram-se as médias das taxa fracional remoção(TFR) e os parâmetros cinéticos  $k_{1,0}$ ,  $k_{1,2}$  e  $k_{2,0}$  para o  $^{14}$ C-EC e  $^{3}$ H-CL da população estudada . A TFR da nanoemulsão marcada com  $^{14}$ C-éster de colesterol nas 24h foi maior nos diabéticos do que nos não-diabéticos, p<0,01. Entretanto essa diferença não se manteve para o grupo de diabéticos quando separamos pela presença de CAC (TABELA 9) e de espeçamento íntima arterial das artérias carótidas (dados não mostrados). Tentamos também realizar análise multivariada e não foi possível devido ao baixo número de casos avaliados. Não houve diferença na TFR do  $^{3}$ H-colesterol entre os individuos DM2 e controle, e nem quando dividimos o grupo de DM2 pela presença de CAC.

A avaliação dos parâmetros de cinética  $k_{1,0}$ ,  $k_{1,2}$  e  $k_{2,0}$  notamos que o  $k_{2,0}$ - $^{14}$ C-CE foi maior para os diabéticos em relação ao controle, esta diferença não se mantém quando separamos os diabéticos pela presença de CAC. Já o  $k_{1,0}$ - $^{3}$ H-CL foi maior que  $k_{1,0}$ - $^{14}$ C-EC em todos os grupos. O k1,2 do  $^{14}$ C-EC e  $^{3}$ H-CL não apresentou diferença estatística para nenhum dos grupos de pacientes estudados.

TABELA 8: Taxas fracionais de remoção e parâmetros cinéticos <sup>14</sup>C-EC e <sup>3</sup>H-CL, nos grupos diabéticos e controle.

	Diabéticos	Controle	р
n	12	9	
TFR <sup>14</sup> C-EC(h <sup>-1</sup> )	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	<0,01
$k_{1,0}$ <sup>14</sup> C-EC	$0.31 \pm 0.15$	$0.33 \pm 0.28$	0,91
$k_{1,2}^{14}C-EC$	1,10 ± 1,29	1,18 ± 1,53	0,60
$k_{2,0}^{14}C$ -EC	$0,05 \pm 0,02$	$0.03 \pm 0.01$	0,03
3.1. 0. (1.1)			
TFR <sup>3</sup> H-CL(h <sup>-1</sup> )	$0.05 \pm 0.02$	$0.05 \pm 0.02$	0,75
k <sub>1,0</sub> ³H-CL	$0,77 \pm 0,40$	$0.89 \pm 0.69$	1,00
$k_{1,2}{}^3H$ -CL	0,84± 1,01	1,01 ± 1,11	1,00
$k_{2,0}{}^3H$ -CL	$0.02 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.02$	1,00

Média ± desvio padão. Teste não paramétrico de Mann-Whitney.TFR- taxa Fracional de Remoção, EC- éster de colesterol, CL- colesterol livre.k<sub>1,0</sub>-remoção não específica da nanoemulsão;k<sub>1,2</sub>- transformação da nanoemulsão pela aquisição de apolipoproteínas;k<sub>2,0</sub>- remoção da nanoemulsão do compartimento plasmático para espaço extravascular.

TABELA 09: Taxas fracionais de remoção e parâmetros cinéticos <sup>14</sup>C-EC e <sup>3</sup>H-CL, nos grupos diabéticos com e sem CAC e controle.

	Diabéticos		Controle	
	CAC	Sem CAC		P
n	8	4	9	
TFR <sup>14</sup> C-EC (h <sup>-1</sup> )	$0.07 \pm 0.02$	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,26
k <sub>1,0</sub> <sup>14</sup> C-EC	$0.32 \pm 0.15$	$0.29 \pm 0.14$	$0.33 \pm 0.28$	0,95
k <sub>1,2</sub> <sup>14</sup> C-EC	0,92 ± 1,10	1,36 ± 1,95	1,18 ± 1,53	0,93
k <sub>2,0</sub> <sup>14</sup> C-EC	$0.04 \pm 0.02$	$0.04 \pm 0.02$	$0.03 \pm 0.01$	0,89
TFR <sup>3</sup> H-CL(h <sup>-1</sup> )	$0.04 \pm 0.02$	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,19
k <sub>1,0</sub> <sup>3</sup> H-CL	$0,53 \pm 0,37$	$0.99 \pm 0.06$	$0.89 \pm 0.69$	0,09
k <sub>1,2</sub> <sup>3</sup> H-CL	0,78 ± 1,15	$0,60 \pm 0,12$	1,01 ± 1,11	0,64
k <sub>2,0</sub> <sup>3</sup> H-CL	$0.02 \pm 0.01$	$0.02 \pm 0.01$	$0.03 \pm 0.02$	0,40

Média  $\pm$  desvio padrão . Teste não paramétrico de Kruskall- Wallis. TFR- taxa Fracional de Remoção, EC- éster de colesterol, CL- colesterol livre. $k_{1,0}$ -remoção não específica da nanoemulsão; $k_{1,2}$ - transformação da nanoemulsão pela aquisição de apolipoproteínas; $k_{2,0}$ - remoção da nanoemulsão do compartimento plasmático para espaço extravascular.

Os Figura 5 e 6 expressam a curva de remoção de <sup>14</sup>C-CE e <sup>3</sup>H-CL em 24 horas para o grupo diabético e controle. No anexo encontram –se as curvas separadas tanto para presenseça de CAC. Tanto para o colesterol livre quanto o éster de colesterol.

FIGURA 5: Curva do decaimento plasmático do <sup>14</sup>C-éster de colesterol em diabéticos e controles, pela porcentagem da média de radioatividade presentes no plasma em função do tempo.

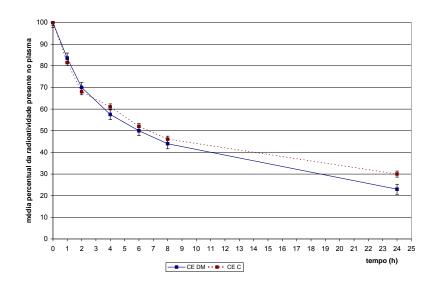
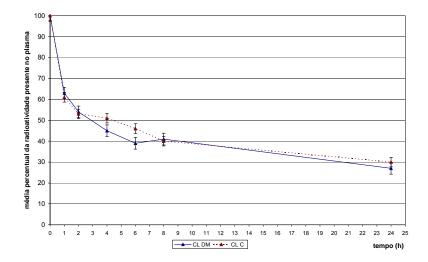


FIGURA 6: Curva do decaimento plasmático do <sup>3</sup>H- colesterol livre em diabéticos e controles, pela porcentagem da média de radioatividade presentes no plasma em função do tempo.



### 4.4. Esterificação do <sup>3</sup>H-Colesterol livre

Não encontramos diferença nem na taxa percentual de esterificação e nem na razão de esterificação TABELA 10 e 11.

TABELA 10: Taxa percentual de esterificação do <sup>3</sup>H- Colesterol presente na nanoemulsão LDL-símile nos diabéticos e controles.

Tempo de coleta(h)	Di	abéticos	Co	ntroles	р
	N	%	N	%	
0,08	9	79 ± 33	5	86 ± 12	0,08
01	9	68 ± 36	5	88 ± 11	0,60
02	11	62 ± 33	6	85 ± 15	0,18
04	6	84 ± 26	6	$73 \pm 25$	0,39
06	8	72 ± 33	6	82 ± 22	0,34
08	8	67 ± 32	4	69 ± 39	0,80
24	5	73 ± 23	6	87 ± 16	0,17

Média ± DP.Teste não paramétrico de Mann-whitney.

### 4.5 Transferência de lípides in vitro da nanoemulsão LDL- símile para HDL dos diabéticos e controles.

Notamos uma porcentagem maior de  $^3$ H-EC e TG nas HDL dos diabéticos em relação ao controle, respectivamente  $6.8 \pm 1.71$  vs. $5.0 \pm 1.1\%$ , p= 0.03; e não notamos diferença na porcentagem de fosfolípides e colesterol livre transferidos entre os grupos. (Tabela 12)

TABELA 11 : Razão de esterificação do <sup>3</sup>H-Colesterol presente na nanoemulsão LDL-símile nos diabéticos e controles

Tempo de	С	Diabéticos	C	Controles	Р
coleta(h)					
	n	RE	n	RE	
0,08	9	1,08 ± 1,88	5	0,18 ± 0,16	1,00
01	9	$0,77 \pm 1,50$	5	$0,15 \pm 0,16$	1,00
02	11	1,26 ± 2,03	6	$0,21 \pm 0,27$	0,40
04	6	$0.05 \pm 0.04$	6	$0.58 \pm 0.76$	0,06
06	8	$1,54 \pm 3,58$	6	$0.35 \pm 0.59$	0,66
80	8	1,05 ± 1,67	4	$4,06 \pm 5,55$	0,40
24	5	0,87 ± 1,47	6	$0,19 \pm 0,29$	0,17

Média ± DP.Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

TABLE 12: Transferência de lipídeos (%) da nanoemulsão da LDL-símile para HDL de diabéticos e controles *in vitro*.

	Diabético	Control	Р
N	11	9	
<sup>3</sup> H- éster de Colesterol	$4,2 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,6$	0,038
<sup>14</sup> C-fosfatidilcolina	$24,1 \pm 2,7$	$22,0 \pm 0,9$	0,152
<sup>3</sup> H- triglicérides	$6.8 \pm 1.6$	5,0 ± 1,1	0,031
<sup>14</sup> C- colesterol	$9,2 \pm 2,9$	$7,4 \pm 2,6$	0,230

Média ± desvio padrão. Teste não paramétrico de Mann-Whitney

5. DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2, adultos com longa duração da doença, controle glicêmico ruim e sem complicações microvasculares significativas, assintomáticos para doença coronária, com hipertensão arterial controlada comparados a controles pareados para idade, sexo, raça, e comorbidades. O perfil lipídico foi semelhante entre os diabéticos e os controles, entretanto, este grupo de pacientes diabéticos possui média da concentração de TG maior e média de HDL menor que os controles, com concentrações semelhantes de LDL, compatível com o perfil da dislipidemia diabética(81; 124). Nos DM2 é a porcentagem de LDL pequeno e denso que é maior e mais relacionada a DCV(82). HANAK e cols, em 2004, observaram que pacientes com TG/ HDL > 3,8 mg/dl possuem 79% da concentração de LDL com o fenótipo tipoB(pequeno e denso) e valores TG /HDL< 3,8 mg/dl expressam 81% de fenótipo tipo A da LDL(125) . Não encontramos diferença na relação de TG/HDL entre os grupos, provavelmente em função do número de doentes no grupo DM2, mas a média TG/HDL foi de 3,8 mg/dL indicando um provável aumento no número de LDL pequena e densa nesta população.

Da Luz e col em 2005, avaliando a relação do perfil lipídico com o desenvolvimento de angina, testes isquêmicos positivos e obstrução na angiografia, encontraram que a relação TG/HDL quando maior que 4 mg/dl é fator preditor independente para o desenvolvimento de DAC (126), e ainda em 2008 mostraram que este índice é um dos mais importantes preditores de DAC extensa (127). Mostrando que os diabéticos podem estar com mais risco para desenvolvimento de DAC, principalmente quando já com CAC.

Até o momento estima-se em 20% a prevalência de aterosclerose coronária na população de pacientes diabéticos(3). Em pacientes diabéticos com aterosclerose determinada pela tomografia computadorizada a presença de CAC teve uma maior relação com a mortalidade por causas cardíacas e infarto não fatal, do que em pacientes não diabéticos com mesmo valores de escore de Cálcio coronário. Diabéticos com a alteração em ECG de repouso (onda Q), e teste de estresse induzindo isquemia

apresentam uma maior índice de cálcio detectado pela tomografia computadorizada(128). Na nossa população de diabéticos assintomáticos para DAC, sem alterações no ECG, detectamos 8 pacientes com escore de cálcio positivo e 04 com escore negativo, e não identificamos diferenças clínicas e laboratoriais entre os grupos.

Nossos dados possuem uma grande variabilidade no escore de cálcio de Agatston, com média 47 com mínimo de 01 e máximo de 229. Wong, em 2005 comparando a CAC com a isquemia pela cintilografia mostrou que o diabetes associouse com 13% de isquemia em pacientes com CAC entre 100-399, enquanto na ausência de CAC a isquemia foi 3,6%(129). A presença de CAC nos nossos pacientes sinaliza que eles já tem comprometimento aterosclerótico mas essa presença não serve para nos determinar a gravidade da lesão.

Os fatores que podem interferir nas cinéticas do EC e do CL na nanoemulsão seriam: a concentração de LDL, a presença de apo E e os receptores de lipoproteínas. No presente estudo a TFR-<sup>14</sup>C-EC em pacientes diabéticos tipo 2, apresentou-se 22% maior do que nos controles, e ambos os grupos não diferiram na concentração de lipoproteínas plasmáticas, incluindo o LDL. Esse resultado é semelhante ao de Gylling, em 1997, que avaliando cinéticas de lipoproteína natural marcada com <sup>131</sup>I- ApoB LDL em 13 pacientes DM2 e 18 controles, observaram que a TFR da apo B LDL foi maior nos diabéticos, enquanto as concentrações e a taxa de síntese de apo B e de LDL ,respectivamente, eram semelhantes nos dois grupos(107).

Kissebah, em 1983, estudando a população de DM2 com hiperlipidemia também com a cinética de lipoproteína natural marcada com <sup>125</sup>I- ApoB LDL, observou que em 08 diabéticos com controle glicêmico ruim(glicemia de jejum maior que 150 mg/dl), a TFR da ApoB LDL foi reduzida em comparação a 20 pacientes diabéticos com glicemia de jejum até 150 mg/dl, sugerindo que o aumento da glicemia estaria interferindo na interção do LDL e o receptor de LDL(130; 131). Os estudos com isótopos estáveis marcando apo B e E em DM2 também mostram um atraso na remoção plasmáticas dessas partículas(132; 133), e a este atraso é atribuído a menor afinidade das apo B e E pelo receptor de LDL em diabéticos.

A hiperglicemia crônica leva a formação de AGES, e consequentemente os DM2 com mau controle glicêmico vão ter um maior percentual de lipoproteínas modificadas por AGES, e consequentemente um aumento na expressão de RAGES e receptores scavengers. (13; 131). O receptor de Lecitina oxidada tipo1 (LOX-1) e o SR-B1 são receptores scavengers que tem sua expressão aumentada em diabéticos, e maior afinidade por partículas de lipoproteínas modificadas (134; 135). O LRP que tem sua interação com lipoproteínas mediada pela interação da apo E com heparansulfato, também tem sua interação modificada pela glicação das apos nos DM2.

Dessa forma é possível que a LDL-símile está sendo removida mais rápida da circulação por adquirir apo E modificadas dos pacientes DM2, podendo então além de ser retirada via receptor de LDL do plasma ()poder interagir com os receptores para apo E modificadas presentes nos DM2.

A apo mais adquirida pela LDL-símile da nanoemulsão artificial é a apoE, tanto nos modelos animais como nos humanos, e quanto mais apo E maior a remoção(96; 99; 102; 104)

O éster de colesterol pode ainda estar sendo captado seletivamente, como já foi demonstrado em modelos animais e humanos(136) o que explicaria a TFR do EC apresentar-se acelerada enquanto a TFR do CL apresenta-se igual ao controle. O SR-B1 seria o receptor responsável por essa captação seletiva de EC a partir de LDL e HDL nas células hepáticas(134), que é o tecido no qual foi demonstrado uma maior do captação EC da nossa emulsão

Devemos levar em conta que todos os pacientes diabéticos deste estudo estão em uso de metformina. O mecanismo de ação da metformina está relacionado ao estímulo da AMPK (AMP-activated protein kinase). A AMPK é importante no fígado para regular as proteínas envolvidas no metabolismo lipídico. Quando ativada fosforila e inativa ACC e HMG-CoA redutase, reduzindo então a síntese de colesterol. Da mesma forma inativa ACC reduzindo malonil Coa, aumentando a atividade CPT-1 e consequente aumento da oxidação do ácido graxo. Logo estimula a oxidação de AGL e o bloqueio da síntese de colesterol e TG. Também inibem a transcrição de SREBP-1, que é um fator de transcrição estimulado pela insulina e que é implicado na patogênese da RI, dislipidemia e diabetes tipo 2, desta forma aumentando a expressao

de receptor de LDL. Já foi comprovado para a metformina ter efeito na redução de lípides é necessária a ativação da AMPK(137).

Em diabéticos tipo1 com controle glicêmico ruim a remoção do <sup>14</sup>C-éster de colesterol da nanoemulsão lipídica também foi mais rápido do que em indivíduos não-diabéticos, por provável ação da hiperinsulinemia na expressão de receptores hepáticos(138).

Notamos ainda que tanto os diabéticos tipo1 estudados anteriormente (138), como os tipo 2 aqui estudados apresentavam grau de controle glicêmico semelhantes. Acreditamos então que a remoção EC acelerada em diabéticos tipo1 e tipo2 mal controlados, pode também ser por efeito da glicação tanto de lipoproteínas plasmáticas quanto teciduais(139; 140), que podem estar interferindo no clearance das lipoproteínas como já relatados acima.

A resistência a insulina vista como o principal fator fisiopatológico que levaria o diabético a ter um alto risco para doença cardiovascular, está associada as alterações no perfil lipídico desse indivíduos(141). No presente trabalho os índices de homeostase glicêmica foram avaliados pelo Homa calculator. Nos diabéticos, nem os índices de RI e nem a concentração de insulina associaram-se a remoção TFR <sup>14</sup>C-EC (dados no anexos). Vale lembrar que todos os diabéticos faziam uso de metformina o que pode ter nos levado a subestimar a resistência a insulina nesses pacientes, do mesmo modo que o uso de sulfonilúreias pelos 4 diabéticos fez com que nosso índice de HOMA β fosse hiperestimado.

No presente estudo não encontramos diferença entre a concentração de apo E nos pacientes e não observamos correlação desta com remoção de lípides da nanoemulsão (dados no anexo). Bach-Ngohou e cols, em 2002, avaliaram a cinética de apo E através da infusão de isótopos estáveis e com modelo compartimental mais detalhado, em DM2 (n=7) e controles (n=5), e também encontraram concentração plasmática semelhante de apo E em ambos os grupos; mostraram que a concentração de TG se correlacionou positivamente com a concentração plasmática de apo E e Apo E VLDL; e que o aumento na taxa de produção de apo E – VLDL e Apo E- HDL nos diabéticos também não interferem na remoção das partículas. A remoção de Apo E VLDL foi correlacionada positivamente com RI e a A1c. Em outro estudo sabemos que

diabéticos tem glicação de apo E 2 e 3 maior que pacientes não diabéticos, a glicação dos diferentes fenótipos de apo E- E2,E3,E4 foram associados com alteração na interação com seus receptores receptor de LDL, LRP ( que necessita de heparan sulfato interação para se ligar ao este)(142).

O fato dos nossos diabéticos com ou sem CAC não mostrarem diferença na TFR<sup>14</sup>C-EC coincide com os trabalhos de Gylling em 1996 que avaliando 13 DM2 com hipercolesterolemia leve, sendo 07 com DAC definida por infarto prévio ou alteração na angiografia, ou alteração no ECG de esforço, não encontrou diferença entre as TFR de LDL-apoB nos dois grupos(110); e com o trabalho de Santos em 2002 que com o uso da mesma nanoemulsão utilizada por nós, avaliando 19 pacientes com DAC, 14 sem DAC, selecionados após angiocoronariografia, também não apresentaram diferença na TFR <sup>14</sup>C-EC, fato este coincidente com os nossos resultados(96). Podemos afirmar então que a presença ou não da doença aterosclerótica coronária numa mesma população com condições clínicas semelhantes, não altera o clearance do EC do compartimento intravascular.

Em relação TFR <sup>3</sup>H-CL que foi semelhante nos dois grupos estudados confirma o achado de que o colesterol livre presente na LDL- símile, semelhante aos das lipoproteínas naturais, tem comportamento diferente do EC, sendo mais instável podendo migrar para outras partículas ou meio aquoso(96). Já foi demonstrado previamente que em hipercolesterolemicos familiar as estatinas podem acelerar a remoção de EC mais do que a remoção de CL(143). O colesterol livre pode sofrer ação da LCAT se tornando um colesterol esterificado. A ação das LCAT é maior nas HDL que tem apo A1(62). Neste estudo não encontramos diferenças na esterificação do <sup>3</sup>H-CL nos DM2 e controles, mostrando que a ação da LCAT é importante para o metabolismo do CL do intravascular, uma vez que encontramos uma menor esterificação do <sup>3</sup>H-CL nos pacientes com DAC que apresentavam aumento na remoção plasmática do CL (96). Observamos uma concentração semelhante de CL entre os diabéticos e não diabéticos, confirmando que a remoção e esterificação do CL nesta população se faca de forma semelhante.

A maior remoção de CL foi associada a DAC avançada(95; 96). A população deste estudo é constituída por pacientes assintomáticos para DAC. A presença de

cálcio na artéria coronária esta relacionado com a existência de placa aterosclerótica, mas só passa a ser detectado pela tomografia computadorizada quando acumulado sob formas de placas na base da íntima arterial(144). Entretanto não foi ainda estabelecida a correlação deste achado com a gravidade da lesão coronária, principalmente em diabéticos, como relatado previamente. O CL é citotóxico e um conteúdo maior de CL é encontrado em macrófagos de placas ateroscleróticas instáveis. Uma maior concentração intracitoplasmática de CL leva a uma maior produção de proteínas inflamatórias que culminam com a instabilidade da placa(145). O efluxo de CL a partir dos macrófagos para a HDL é mediado pela interação de ABCA1 com apo A1 das HDL(146). Os AGES diminuem a expressão de ABCA1 e consequentemente diminui o efluxo de colesterol das células(147), mas a metformina pode aumentar o efluxo de colesterol frente a presença de AGES(148).

A PLTP e a CETP também pode estar interferindo nas vias metabólicas do CL e do CE. Estudos prévios de transferência in vitro de lípides a partir da LDL-símile para HDL em DM2 e pacientes controles, observou que a HDL de DM2 foram mais capazes de captar fosfolípides e CL. Nesses estudos o grupo controle tinha médias mais baixas de TG e mais altas de HDL que o grupo de DM2(149; 150). Quando avaliamos as HDL de pacientes com síndrome do ovário policistico, que também tinham HDL menor e TG maior que o grupo controle tiveram maior transferência de TG e fosfolípides. Sendo que a transferência de TG foi correlacionada com o aumento da RI pelo HOMA-IR nessa população(151). Encontramos uma semelhança entre os diabéticos e não diabéticos em receber fosfolípides e CL da LDL- símile, mas tiveram uma maior capacidade de receber CE e TG, e existem concentrações plasmáticas semelhantes de HDL e TG entre os dois grupos. A capacidade de HDL receber lípides vai ser determinada tanto pela atividade de PLTP e CETP, que pode ser variável em DM2 bem como depender do subtipo de HDL presente no plasma: HDL3 ou HDL2. As HDL 2 tem um maior conteúdo de TG e são mais instáveis, com um catabolismo aumentado(79). Como nossos pacientes aparentemente a LCAT apresenta atividade semelhante, pode estar influindo na transferência de lípides de superfície para HDL tornando-a semelhante. aumento na transferência de TG e EC pode estar relacionado ao fato desses pacientes não estarem sob o uso de estatinas, o que aconteceu nos demais estudos com DM2. Em uma analise prévia a estatina mostrou ser capaz de reduzir a transferência de todos os lípides da nanoemulsão LDL- símile para HDL(115). Os demais estudos com diabéticos tipo 2 incluem pacientes em uso de estatinas e com doses variáveis e tempo de uso também variável, sendo este nosso primeiro estudo no qual os DM2 estavam sem usar estatinas há pelo menos 1 mês antes das analises.

.A formação da LDL pequena e densa que está aumentada em DM2, correlaciona-se com altas concentrações de TG, o tipo de HDL e atividade da LH e LPL, pois como sabemos essa partícula de LDL é depletada de EC e tem um maior conteúdo de TG(82). Uma enzima importante nessa formação das LDL pequenas e densas é a CETP, que vai agir transferindo EC da HDL para as VLDL1, que estão aumentadas no DM2, e doar TG para as HDL. Com um maior conteúdo de TG as HDL se tornam mais instáveis e são removidas de modo mais eficaz pela LH(64) A HDL dos diabéticos, neste estudo avaliadas in vitro, foram mais eficientes em receber TG e CE, podendo este fato estar associado à atividade da CETP, PLTL, LPL e LH nesses pacientes, e indiretamente relacionado a formação da LDL pequenas e densas(62; 79).

Considerando o número reduzido de pacientes avaliados neste estudo, podemos relacionar que a maior remoção do éster de colesterol em pacientes diabéticos tipo 2 mas uma igual remoção de colesterol livre pode indicar um desequilíbrio no conteúdo lipídico das principais lipoproteínas presentes nesta patologia, o que poderia vir a favorecer aterosclerose nesses pacientes.

## 6. CONCLUSÕES

- 1- Os pacientes com diabetes mellitus tipo 2 apresentam uma maior remoção do EC e remoção de CL semelhante quando comparados com indivíduos nãodiabéticos.
- 2- Não houve diferença na remoção plasmática do EC e do CL entre os pacientes diabéticos assintomáticos para DAC, com ou sem aterosclerose subclínica. O fato do colesterol livre nesses pacientes asintomáticos para DAC com e sem aterosclerose subclinica não diferir na sua remoção, reforça a ligação do colesterol livre com a doença coronariana avançada.
- 3- Esse desequilibrio na remoção do colesterol livre e éster das lipoproteínas surge como uma opção a ser investigada na gênese da dislipidemia diabética e consequente aterosclerose nesses pacientes.

## 8.Anexos

## Anexo 1

-Transferência de lípides radioativos de uma nanoemulsão artificial lipídica para HDL-C in vivo.

A partir de alíquotas de 1000μl de plasma dos participantes para cada tempo do experimento (5min, 1h, 2h, 4 h, 6h, 8h e 24h) foram utilizadas. Adicionou-se à mistura 1000 μL de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2%/ MgCl<sub>2</sub> 3M, v/v). A mistura foi agitada por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000rpm. Todo o sobrenadante, contendo a HDL, foram pipetadas em vials de cintilação com 5ml de solução cintiladora Ultima Gold e a radioatividade presente nas amostras foi quantificada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA). A quantificação dos lipídeos transferidos da nanoemulsão lipídica artificial para HDL plasmática foram expressas como percentagem (%) em relação à radioatividade total encontrada no plasma dos pacientes que usamos para o cálculo do decaimento plasmático radioativo e parâmetros cinéticos.

Transferência de <sup>3</sup> H- colesterol livre da nanoemulsão LDL-símile para HDL in vivo pelo tempo.

Tempo de	Diabéticos	Controles	р
Coleta(h)			
0,08	26,2 ± 8,1	40,5± 4,7	0,008
01	29,15 ± 15,02	36,0 ±14,42	0,368
02	$32,0 \pm 14,9$	43,3 ± 10,87	0,283
04	41,1 ± 16,7	$44,4 \pm 28,0$	0,886
06	42,37 ± 19,24	35,18 ± 27,5	0,556
08	$38,2 \pm 27,0$	36, 7 ± 15,4	0,905
24	39,6 ± 16,0	42,7 ± 17,26	0,788

Média ± desvio padrão.

Transferência de <sup>14</sup>C- éster de colesterol da nanoemulsão LDL-símile para HDL in vivo pelo tempo.

Tempo de Coleta	Diabéticos	Controles	Р
(h)			
0,08	31,6 ± 6,17	38,1 ± 23,29	0,260
01	$34,5 \pm 9,13$	51,81 ± 14,4	0,07
02	40,8 ± 11,2	51,1 ± 7,9	0,106
04	36,5 ±11,7	51,7 ±11,5	0,114
06	$32,3 \pm 3,9$	33,2 ± 17,1	1,00
08	38,1 ± 11,5	53,6 ± 25,9	0,468
24	$46,7 \pm 14,4$	$42,3 \pm 18,9$	1,00

Média ± desvio padrão.

**Anexo2**-Correlação de parâmetros cinéticos e perfil glicêmico e lipídico

Correlação dos parâmetros da cinética <sup>14</sup>C-EC e <sup>3</sup>H- CL e os parâmetros de controle glicêmico e índices RI para grupo diabéticos.

		Glicemia 15	Insulina 11	HOMAβ 11	HOMAS 11	RI 11	HbA1c 15
TFR <sup>14</sup> C EC	r	-0.33929	0.10000	0.23636	-0.04545	0.04545	-0.08222
	р	0.2160	0.7699	0.4841	0.8944	0.8944	0.7708
K1 <sup>14</sup> C EC	r	0.03571	-0.05455	-0.17273	-0.04545	0.04545	0.05719
	р	0.8994	0.8734	0.6115	0.8944	0.8944	0.8396
K2 <sup>14</sup> C EC	r	-0.05357	0.46364	0.13636	-0.41818	0.41818	0.03575
	р	0.8496	0.1509	0.6893	0.2006	0.2006	0.8994
K12 <sup>14</sup> C EC	r	0.23214	0.35455	-0.10909	-0.40000	0.40000	0.22520
	р	0.4051	0.2847	0.7495	0.2229	0.2229	0.4197
TFR <sup>3</sup> H-CL	r	0.29286	0.11818	0.03636	-0.25455	0.25455	-0.05183
	р	0.2895	0.7293	0.9	0.4500	0.4500	0.8544
K1,0 <sup>3</sup> H-CL	r	-0.14286	0.09091	0.26364	-0.11818	0.11818	-0.24486
	р	0.6115	0.7904	0.4334	0.7293	0.7293	0.3791
K2,0 <sup>3</sup> H-CL	r	0.49286	0.18182	0.00000	-0.22727	0.22727	0.13941
	р	0.0620	0.5926	10.000	0.5015	0.5015	0.6202
K1,2 <sup>3</sup> H-CL	r	-0.03943	0.97	0.11927	-0.08257	0.08257	0.03587
	р	0.8891	0.6470	0.7269	0.8093	0.8093	0.8990

Correlação dos parâmetros da cinética <sup>14</sup>C-EC e <sup>3</sup>H- CL e os parâmetros de controle glicêmico e índices RI para grupo controle.

Glicem	ia Insulina	НОМАβ	HOMAS	RI	HbA1c
11	11	11	11	11	11

TFR <sup>14</sup> EC -	r	0.07289	-0.86302	-0.50909	0.84545	-0.84545	-0.10092
	р	0.8313	0.0006	0.1097	0.0010	0.0010	0.7678
$k_{1,0}^{14}C\text{-EC}$	r	-0.32346	0.06393	0.16364	-0.09091	0.09091	0.08716
	р	0.3319	0.8519	0.6307	0.7904	0.7904	0.7989
$k_{2,0}$ 14C-EC	r	-0.29613	-0.54795	-0.13636	0.60909	-0.60909	-0.05046
	р	0.3766	0.0810	0.6893	0.0467	0.0467	0.8829
$k_{1,2}^{14}C$ -EC	r	-0.63326	-0.13242	0.29091	0.16364	-0.16364	-0.27065
	р	0.0365	0.6979	0.3855	0.6307	0.6307	0.4208
TFR <sup>3</sup> H-CL	r	0.02278	0.61188	0.43636	-0.65455	0.65455	-0.40369
	р	0.9470	0.0454	0.1797	0.0289	0.0289	0.2182
k <sub>1,0</sub> <sup>3</sup> H-CL	r	-0.10934	0.42923	0.43636	-0.44545	0.44545	-0.34864
	р	0.7490	0.1877	0.1797	0.1697	0.1697	0.2934
$k_{2,0}$ $^3H$ -CL	r	-0.18679	0.40183	0.45455	-0.44545	0.44545	-0.62847
	р	0.5824	0.2206	0.1601	0.1697	0.1697	0.0384
$k_{1,2}$ $^3H$ -CL	r	-0.02733	0.10959	0.19091	-0.13636	0.13636	-0.43121
	р	0.9364	0.7484	0.5739	0.6893	0.6893	0.1854

Correlação dos valores da cinética de nanoemulsão com os parâmetros do perfil lipídico para o grupo diabéticos

		CT	CNHDL	CL	EC	LDL	VLDL	HDL	TG	TG/HDL	ApoA1	ApoB	ApoE
N		15	15	14	14	15	14	15	15	15	15	15	15
TFR <sup>14</sup> C-	r	-0.164	-0.060	-0.543	-0.037	-0.279	-0.103	-0.036	0.000	-0.039	-0.228	-0.267	-0.246
EC	p	0.5585	0.8298	0.0446	0.8991	0.3134	0.7253	0.9091	10.000	0.8894	0.4126	0.3344	0.3760
$k_1$ $^{14}$ C EC	r	-0.100	-0.014	-0.382	-0.019	-0.214	-0.072	-0.225	0.100	0.175	-0.007	-0.203	0.221
	p	0.7229	0.9597	0.1767	0.9465	0.4419	0.8054	0.4184	0.7229	0.5327	0.9798	0.4668	0.4277
$k_2$ $^{14}C$ EC	r	-0.228	-0.310	-0.402	-0.243	-0.336	-0.200	0.179	-0.153	-0.192	-0.164	-0.392	-0.107
	p	0.4126	0.2597	0.1535	0.4006	0.2199	0.4930	0.5228	0.5848	0.4910	0.5585	0.1475	0.7039
k <sub>12</sub> <sup>14</sup> C EC	r	-0.267	-0.371	-0.334	-0.340	-0.393	-0.367	0.096	-0.207	-0.178	-0.182	-0.342	-0.007
	p	0.3344	0.1728	0.2425	0.2333	0.1463	0.1967	0.7315	0.4588	0.5243	0.5159	0.2109	0.9798
TFR <sup>3</sup> H-	r	-0.107	0.128	0.200	-0.182	0.102	0.336	-0.702	0.464	0.650	-0.064	-0.078	0.042
CL	p	0.7039	0.6479	0.4925	0.5325	0.7174	0.2398	0.0035	0.0813	0.0087	0.8199	0.7808	0.8795
$k_{1,0}$ $^3$ H-CL	r	-0.075	0.192	0.079	-0.041	0.284	0.507	-0.722	0.610	0.753	-0.135	0.121	0.028
	p	0.7905	0.4910	0.7878	0.8873	0.3037	0.0638	0.0024	0.0156	0.0012	0.6296	0.6664	0.9195
$k_{2,0}$ <sup>3</sup> H-CL	r	-0.078	0.071	0.143	-0.138	-0.028	0.147	-0.496	0.225	0.378	0.171	-0.089	0.192
	p	0.7808	0.8003	0.6257	0.6369	0.9193	0.6154	0.0598	0.4201	0.1641	0.5413	0.7517	0.4910
$k_{1,2}$ $^3$ H-CL	r	0.007	0.060	-0.435	0.156	0.061	0.231	-0.154	0.272	0.204	0.211	-0.129	0.039
	p	0.9798	0.8292	0.1197	0.5926	0.8288	0.4268	0.5820	0.3260	0.4652	0.4493	0.6467	0.8891

Correlação dos parâmetros da cinética de nanoemulsão com do perfil lipídico para o grupo controle.

N	<b>СТ</b> 11	CNHDL 11	CL 7	<b>EC</b> 7	<b>LDL</b> 11	<b>VLDL</b> 11	<b>HDL</b> 11	<b>TG</b> 11	TG/HDL 11	<b>ApoA1</b> 11	<b>ApoB</b> 11	<b>ApoE</b> 11
	r 0.181	0.154	-0.071	0.321	0.118	0.177	-0.168	0.218	0.218	-0.190	0.109	-0.201
TFR <sup>14</sup> C- EC	p 0.5926	0.6500	0.8790	0.4821	0.7293	0.6012	0.6195	0.5192	0.5192	0.5739	0.7495	0.5517
	r 0.218	0.472	0.535	0.035	0.527	-0.241	-0.127	-0.227	-0.063	-0.200	0.345	-0.422
k1,0 <sup>14</sup> C EC	p 0.5192	0.1420	0.2152	0.9394	0.0956	0.4744	0.7079	0.5015	0.8525	0.5554	0.2981	0.1960
	r -0.009	0.081	-0.428	-0.214	0.190	-0.537	0.009	-0.509	-0.272	-0.190	-0.054	-0.238
k <sub>1,2</sub> <sup>14</sup> C EC	p 0.9788	0.8110	0.3374	0.6445	0.5739	0.0881	0.9787	0.1097	0.4171	0.5739	0.8734	0.4800
	r 0.009	-0.090	1.00	-0.357	0.018	-0.273	-0.018	-0.245	-0.136	-0.136	-0.063	0.018
k <sub>2,0</sub> <sup>14</sup> C EC	p 0.9788	0.7904	0.0001	0.4316	0.9577	0.4160	0.9575	0.4669	0.6893	0.6893	0.8525	0.9573
	r -0.427	-0.490	-0.035	0.107	-0.563	-0.068	0.013	-0.081	-0.063	0.045	-0.554	-0.275
TFR <sup>3</sup> H-CL	p 0.1899	0.1252	0.9394	0.8192	0.0710	0.8418	0.9681	0.8110	0.8525	0.8944	0.0767	0.4127
	r -0.554	-0.400	-0.035	-0.142	-0.500	0.136	-0.278	0.145	0.236	-0.245	-0.336	-0.137
k <sub>1,0</sub> <sup>3</sup> H- CL	p 0.0767	0.2229	0.9394	0.7599	0.1173	0.6886	0.4069	0.6696	0.4841	0.4669	0.3118	0.6866
	r -0.427	-0.500	-0.035	-0.142	-0.600	0.031	-0.082	0.054	0.045	-0.109	-0.445	0.064
k <sub>1,2</sub> <sup>3</sup> H-CL	p 0.1899	0.1173	0.9394	0.7599	0.0510	0.9258	0.8101	0.8734	0.8944	0.7495	0.1697	0.8512
	r -0.472	-0.554	0.071	-0.142	-0.609	-0.227	-0.027	-0.218	-0.118	-0.090	-0.645	-0.321
k <sub>2,0</sub> 3H- CL	p 0.1420	0.0767	0.8790	0.7599	0.0467	0.5005	0.9363	0.5192	0.7293	0.7904	0.0320	0.3356

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Wild S, Roglic G, Green A, al. E: Global Prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053, 2004
- 2. Sicree R, Shaw JE, Zimmet PZ: the Global Burden of diabetes. In *Diabetes atlas*, 2nd ed. Federation ID, Ed. Brussels, Gan, D, 2003, p. 15-71
- 3. Beckman JA, Creager MA, Libby P: Diabetes and atherosclerosis, epidemiology, pathophisiology and management. *JAMA* 287:2570-2581, 2002
- 4. Rosamond WD, Chambless LE, Folsom AR, Cooper LS, Conwill DE, Clegg L, Wang CH, Heiss G: Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. *N Engl J Med* 339:861-867, 1998
- 5. Haffner SM, Lehto S, Ronnemaa T, Pyorala K, Laakso M: Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339:229-234, 1998
- 6. Goroya TY, Leibson CL, Palumbo PJ, al. E: Coronary atherosclerosis in diabetes mellitus: a population -based autopsy study. *J Am Coll Cardiol* 40:946-953, 2002
- 7. Grundy SM, Howard B, Smith S, Jr., Eckel R, Redberg R, Bonow RO: Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: executive summary: conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association. *Circulation* 105:2231-2239, 2002
- 8. Anand DV, Lim E, Hopkins D, Corder R, Shaw LJ, Sharp P, Lipkin D, Lahiri A: Risk stratification in uncomplicated type 2 diabetes: prospective evaluation of the combined use of coronary artery calcium imaging and selective myocardial perfusion scintigraphy. *Eur Heart J* 27:713-721, 2006
- 9. Prediction of mortality from coronary heart disease among diverse populations: is there a common predictive function? *Heart* 88:222-228, 2002

- 10. 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* 16:434-444, 1993
- 11. Fitzgerald AP, Jarrett RJ: Are conventional risk factors for mortality relevant in type 2 diabetes? *Diabet Med* 8:475-480, 1991
- 12. Khalil MF, Wagner WD, Goldberg IJ: Molecular Interaction Leading to lipoprotein retention and Initiation of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2211-2218, 2004
- 13. Barbosa JH, Oliveira SL, Seara LT: O papel dos produtos finais da glicação avançada no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *arq Bras Endocrinol Metabol* 52:940-950, 2008
- 14. Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, al. e: Coronary-heart-disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study. . *Lancet* 1:1373-1376, 1980
- 15. Rosengren A, Welin L, Tsipogianni A, Wilhelmsen: Impact of cardiovascular risk factors on coronary heart disease and mortality among middle aged diabetic men: a general population study. . *BMJ* 299:1127-1131, 1989
- 16. Ceriello A, Motz E: Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:816-823, 2004
- 17. Kahn SE: The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46:3-19, 2003
- 18. Khan SE: Clinical review 135: the importance of b cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4047-4058, 2001
- 19. Eizirik DL, Cardoso AK, Cnop M: The role for endoplasmic reticulum Stress in Diabetes mellitus. *Endocr Reviews* 29:42-61, 2008
- 20. Reaven GM: The Role of insulin resistance in human disease( Syndrome X): expand deffinition. *Ann Rev Med* 14:121-131, 1993

- 21. Ginsberg HN, Huang LS: The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk* 7:325-331, 2000
- 22. Haffner SM, Mykkanen I, Festa A, Burke JP, Stern MP: Insulin resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin sensitive prediabetic subjects. *Circulation* 101:975-980, 2000
- 23. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J: The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 366:1059-1062, 2005
- 24. Khan R, Buse J, Ferrannini E, Sterm M: The metabolic Syndrome. Time for a critical apraisal joint statment from the American Diabetes Association and European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 28:2289-2304, 2005
- 25. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L: Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24:683-689, 2001
- 26. Ginsberg HN: Insulin resistance and cardiovascular disease. J Clin Invest 106:453-458, 2000
- 27. Turner RC, Millns H, Neil HA, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, Holman RR: Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). *BMJ* 316:823-828, 1998
- 28. Sharp PS, Rainbow S, Mukherjee S: Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet Med* 20:575-579, 2003
- 29. Basta G, schmidt AM, Caterina R: Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular research* 63:582-592, 2004
- 30. Implications of the diabetes control and Complications Trial. *Diadetes Care* 16:1517-1520, 1993

- 31. Implications of the United Kingdom prospective diabetes study. *Diabetes care* 21:2180-2184, 1998
- 32. Salomaa V, Riley W, Kark JD, al e: Non-insulin-dependent diabetes mellitus and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness indexes. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. . *Circulation* 91:1432-1443, 1995
- 33. Hadden DR, Patterson CC, Atkinson AB, Kennedy L, Bell PM, McCance DR, Weaver JA: Macrovascular disease and hyperglycaemia: 10-year survival analysis in Type 2 diabetes mellitus: the Belfast Diet Study. *Diabet Med* 14:663-672, 1997
- 34. Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A: Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 22:920-924, 1999
- 35. Khaw KT, Wareham N, Bingham S, Luben R, Welch A, Day N: Association of hemoglobin A1c with cardiovascular disease and mortality in adults: the European prospective investigation into cancer in Norfolk. *Ann Intern Med* 141:413-420, 2004
- 36. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH: Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 141:421-431, 2004
- 37. Kuusisto J, Mykkanen L, Pyorala K, Laakso M: NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. 43:960-967, 1994
- 38. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352:837-853, 1998
- 39. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352:854-865, 1998
- 40. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O: Multifatorial intervencion and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 348:383-393, 2003

- 41. ADVANCE collaborative group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. . *N Engl J Med* 358:2560-2572, 2008
- 42. Action to Control Cardivascular Risk in Diabetes Study Group. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 358:2545-2559, 2008
- 43. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA: 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 359:1577-1589, 2008
- 44. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR: Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321:405-412, 2000
- 45. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ* 317:703-713, 1998
- 46. Heart Protection Study Collaborative Group. MCR/BHF heart protection study of cholesterol lowering with sinvastatin in 20536 high- risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 360:7-22, 2000
- 47. Howard BV, Robbins DC, Sievers MI, Lee ET, Rhoades D, Devereux RB, Cowan LD, Gray RS, Welty TK, Go OT, Howard WJ: LDL cholesterol as a strong predictor of coronary heart disease in diabetic individuals with insulin resistance and low LDL. The Strong Heart Study. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 20:830-835, 2000
- 48. Pyorala K, Pedersen TR, Kjeksus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G: Cholesterol lowering with sinvastatin improves prognois of diabetic patientes with coronary heart disease: a subgroup analysis of the Scandinavian Sinvastatin Survival Study(4S). *Diabetes Care* 20:614-620., 1997
- 49. Sacks FM, Tonlin AM, Craven T, Pfeffer MA, Sherpherd J, Keech A, Furber CD, Braunwald E: Coronary Heart disease in patiences with low LDL-C. Benefit of pravastatin in diabetics and enhanced role for HDL-c and triglycerides as risk factros. *Circulation* 105:1424-1428, 2002
- 50. Kreisberg RA, Oberman A: Medical management of Hyperlipidemia/ dyslipidemia. . *JCEM* 88: 2445-2461, 2003

- 51. American diabetes Association.Standards of Medical Care in Diabetes(position Statement). *Diabetes Care* 29 S4-S42, 2006
- 52. National cholesterol Education Program(NCEP) Expert Panel on Detection E, and treatment of High blood cholesterol in Adults(Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program(NCEP) Expert Panel on Dection, Evaluation, and treatment of High blood cholesterol in Adults(Adult Treatment Panel III) final report.

  . Circulation 106, 2002
- 53. American Diabetes Association. Consensus development conference on the diagnosis of coronary heart disease in people with Diabetes. *Diabetes Care* 9:1551-1559, 1998
- 54. American Diabetes Association. diagnosis and Classification of Diabetes mellitus(Position statement). *Diabetes Care* 28:S37- S42, 2005
- 55. Thomason MJ, Colhoum HM, Livingstone SJ, al. e: Baseline characteristics in the The Collaborative Atorvastatin Diabetes Study(CARDS) in patients with type 2 diabetes. *Diabet Med* 21:901-905, 2004
- 56. Mahley RW, Weisgraber KH, Bersot TP: Disorders of lipid metabolism. In *Williams Textbook of Endocrinology*, 11th ed. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Eds. Philadelphia, PA SAUNDERS ELSEVIER, 2008, p. 1589-1654
- 57. Breslow JL: Insights into lipoprotein metabolism from studies in transgenic mice. *Annu Rev Physiol* 56:797-810, 1994
- 58. Mahley RW, T.L. I, Rall Jr SC, Weisgraber KH: Plasma lipoproteins. apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 25:1277-1294, 1984
- 59. LipoScience.: NMR LipoProfile II Subclass Particle Analysis Technical Bulletin In <a href="http://www.lipoprofile.com/print\_control.cfm?id=174">http://www.lipoprofile.com/print\_control.cfm?id=174</a>, 2005
- 60. Stamler J, Daviglus ML, Garside DB, al. E: Relationship of baseline cholesterol levels in 3 large cohorts of younger mem to long- term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA* 2000:311-318, 2000
- 61. Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright Jr. RW, Jiang Z: Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int. J. Biol. Sci.* 5:474-488, 2009

- 62. Borggreve SE, Vries R, Dullaart RPF: Alterations in high- density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest* 33:1051-1069, 2003
- 63. Riemens S, van Tol A, Sluiter W, Dullaart R: Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM. relationships with apolipoprotein B containing lipoprotein and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis* 1998:71-79, 1998
- 64. Chahil TJ, Ginsberg HN: Diabetic Dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin N Am* 35:496-510, 2006
- 65. Grundy SM: Absorption and metabolism of dietary cholesterol. Annu Rev Nutr 3:71-96, 1983
- 66. Ikonen E: Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews* 9:125-138, 2008
- 67. Goldstein JL, DeBose- Boyd RA, Brown MS: Protein sensors for membrane sterols. *Cell* 124:35-46, 2006
- 68. Chan DC, Barrett PH, Watts GF: Lipoprotein transport in the metabolic syndrome: methodological aspects of stable isotope kinetic studies. *Clin Sci (Lond)* 107:221-232, 2004
- 69. Yan D, . Ea: OSBP-related protein 8(ORP8) suppresses ABCA1expression and cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem* 283:332-340, 2008
- 70. Radahakrishnan A, Ikeda Y, H.J. K, Brown MS, Goldstein JS: Sterol Regulated Transport of SREBPS from endoplasmatic block transport by binding to INSIG. *Proc Natl Cad Sci USA* 102:6511-6518, 2007
- 71. Jeon H, Blacklow SC: Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 74:535-562, 2005
- 72. Redgrave TG: Chylomicron metabolism. *Biochem Soc Trans* 32:79-82, 2004

- 73. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J: Overproduction of Very Low Density Lipoprotein is the hallmark of the Dyslipidemia in the Metabolic Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1225-1236, 2008
- 74. Kobayashi H, Oka K, forte T, al. e: Reversal of Hypercolesterolemia in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice by Adenovirus- mediated Gene Transfer of Very Low Density Lipoprotein Receptor. *J Biol Chem* 271:6852-6860, 1996
- 75. Herz J, Qiu SQ, Oesterle A, al. e: Initial hepatic removal of chylomicron remnants is unaffected but endocytosis is delayed in mice lacking the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4611-4615, 1995
- 76. Ginsberg HN: Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. *Med Clin North Am* 78:1-20, 1994
- 77. Soutar AK, Myant NB, Thompson GR: The metabolism of very low density lipoprotein in patients with familial hyper cholesterolemia. *Atherosclerosis* 43:217-231, 1982
- 78. Wang N, Silver DL, Costet P: specific binding of Apo A1, enhance cholesterl efflux and altered plasma menbrane morphology in cells expressing ABCA1. *J Biol Chem* 275:33053-33058, 2000
- 79. Tan KCB: Reverse Cholesterol transport in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity and metabolism*:1-10, 2009
- 80. Yvan-Chavert L, al. e: SR-B1 inhibits ABCG1 stimulated net cholesterol efflux from cells to plasma HDL. *J lip Res* 49:107-114, 2008
- 81. Taskinen M-R: Quantitative and qualitative lipoprotein abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes* 41:12-17, 1992
- 82. Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN: Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol* 19:378-384, 2008

- 83. Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, al. e: Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 6:77-86, 2000
- 84. Brown MS, Goldenstein JL: A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47, 1986
- 85. Burnett JR, Barrett PH: Apolipoprotein B metabolism: tracer kinetics, models, and metabolic studies. *Crit Rev Clin Lab Sci* 39:89-137, 2002
- 86. Barrett PH, Chan DC, Watts GF: Thematic review series: patient-oriented research. Design and analysis of lipoprotein tracer kinetics studies in humans. *J Lipid Res* 47:1607-1619, 2006
- 87. Parhofer KG, Barrett PH: Thematic review series: patient-oriented research. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. *J Lipid Res* 47:1620-1630, 2006
- 88. Barrett PHR, Foster DM: Design and analysis of lipid tracer kinetic studies. *Curr Opin Lipidol* 7:143-148, 1996
- 89. Adiels M, Packard C, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, Wennberg B, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J: A new combine multicompartmental model for apolipoprotein B-100 and triglyceride metabolism in VLDL subfractions. *J Lipid Res* 46:58-67, 2005
- 90. Cesar TB, Oliveira MR, Mesquita CH, Maranhao RC: High cholesterol intake modifies chylomicron metabolism in normolipidemic young men. *J Nutr* 136:971-976, 2006
- 91. Benjo AM, Maranhao RC, Coimbra SR, Andrade AC, Favarato D, Molina MS, Brandizzi LI, da Luz PL: Accumulation of chylomicron remnants and impaired vascular reactivity occur in subjects with isolated low HDL cholesterol: effects of niacin treatment. *Atherosclerosis* 187:116-122, 2006
- 92. Wajchenberg BL, Amancio RF, Santomauro AT, Maranhao RC: Metabolism of chylomicrons in patients with congenital lipoatrophic diabetes: a study with emulsion models of chylomicrons. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61:347-352, 2004

- 93. Oliveira MR, Maranhao RC: Relationships in women between body mass index and the intravascular metabolism of chylomicron-like emulsions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:1471-1478, 2004
- 94. Sposito AC, Santos RD, Hueb W, Ventura LI, Vinagre CC, Ramires JA, Maranhao RC: LDL concentration is correlated with the removal from the plasma of a chylomicron-like emulsion in subjects with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 161:447-453, 2002
- 95. Couto RD, Dallan LA, Lisboa LA, Mesquita CH, Vinagre CG, Maranhao RC: Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. *Lipids* 42:411-418, 2007
- 96. Santos RD, Hueb W, Oliveira AA, Ramires JAF, Maranhão RC: Plasma kinetics of cholesterol-rich emulsions in subjects with or without coronary artery disease. *J Lipid Res* 44:464-469, 2003
- 97. Melo NR, Latrilha MC, Santos RD, Pompei LM, Maranhao RC: Effects in post-menopausal women of transdermal estrogen associated with progestin upon the removal from the plasma of a microemulsion that resembles low-density lipoprotein (LDL). *Maturitas* 50:275-281, 2005
- 98. Pinto LB, Wajngarten M, Silva EL, Vinagre CC, Maranhao RC: Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in young, middle-aged, and elderly subjects. *Lipids* 36:1307-1311, 2001
- 99. Maranhao RC, Roland IA, Toffoletto O, Ramires JA, Goncalves RP, Mesquita CH, Pileggi F: Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids* 32:627-633, 1997
- 100. Redgrave TG, Maranhao RC: Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. *Biochim Biophys Acta* 835:104-112, 1985
- 101. Maranhao RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SM, Coelho IJ, Meneghetti JC, Pileggi FJ, Chamone DA: Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res* 54:4660-4666, 1994

- 102. Maranhao RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH: Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids* 28:691-696, 1993
- 103. Redgrave TG, Maranhao RC, Tercyak AM, Lincoln EC, Brunengraber H: Uptake of artificial model remnant lipoprotein emulsions by the perfused rat liver. *Lipids* 23:101-105, 1988
- 104. Vinagre CG, Ficker ES, Finazzo C, Alves MJ, de Angelis K, Irigoyen MC, Negrao CE, Maranhao RC: Enhanced removal from the plasma of LDL-like nanoemulsion cholesteryl ester in trained men compared with sedentary healthy men. *J Appl Physiol* 103:1166-1171, 2007
- 105. Hirata MH, Garcia PB, Maranhao RC: Metabolism of triglyceride-rich emulsions in rats with protein malnutrition. *J Am Coll Nutr* 12:47-52, 1993
- 106. Parhofer KG, barrett PHR, Bier DM, Schonfeld G: Determination of kinetic parameters of apolipoprotein B metabolism using amino acids labeled with stable isotopes. *J Lipid Res* 32:1311-1323, 1991
- 107. Gylling H, Miettinen TA: Cholesterol absorption Synthesis and LDL metabolism in NIDDM. *Diabetes Care* 20:90-95, 1997
- 108. Kissebah AH: Low density lipoprotein metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metabolism Rewiers* 3:619-651, 1987
- 109. Kesaniemi YA, Grundy SM: Overproduction of low density lipoproteins associated with coronary heart disease. *Arteriosclerosis* 3:40-46, 1983
- 110. Gylling H, Miettinen TA: Cholesterol absorption and lipoprotein metabolism in type II diabetes mellitus with and without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 126:325--332, 1996
- 111. Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D: Microemulsion of phospholipids and cholesterol esters Protein- free models of low density lipoprotein. *j Biol Chem* 257:8216-8227, 1982
- 112. Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso- Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH: Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsions resembling low density lipoprotein. *Lipids* 28:691-696, 1993

- 113. Marchese SRM, Mesquita CH, Cunha IL: Anacomp program application to calculate 137C transfer rates in marine organism and dose in mam. *J Radioan Nucl Chem* 232:233-236, 1998
- 114. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509, 1957
- 115. Lo Prete AC, Dina CH, Azevedo CH, Puk CG, Lopes NH, Hueb WA, Maranhao RC: In Vitro Simultaneous Transfer of Lipids to HDL in Coronary Artery Disease and in Statin Treatment. *Lipids*, 2009
- 116. Bampi ATBA: Correlação de dados clinicos e metodos não invasivos na detecção da aterosclerose humana. In *Cardiologia* São Paulo, Universidade de São Paulo(USP), 2007, p. 115
- 117. Occupational dose limits for adults.Code of Federal Regulations. Commission USNR, Ed. Rockville, MD, 1991
- 118. Boxenbaum H, Ronfeld R: Interspecies pharmocokinetic scaling and the Dedrick plots. *Am J Physiol* 245:R768-775, 1983
- 119. Maranhão R, Quintão E: Long term steroid metabolism balance studies in subjects on cholesterol-free and cholesterol rich diets: comparison between normal and hypercholesterolemic individuals. *J Lipid Res* 24:167-173, 1983
- 120. Altman PL, Dittmer DS: Federation of the american Societies for Experimental biology. In *Biology Data Book* Bethesda, Maryland, USA, 1974
- 121. Occupational dose limits for adults. Code of federal Regulations. Rockville, MD. US Nuclear Regulatory Comission, 1991
- 122. Wallace T, Levy J, Mathews D: Use and abuse of HOMA Modeling. . *Diabetes Care* 27:1487-1495, 2004
- 123. Rosner B: Fundamentals of Biostatistics. Boston, PWS Publishers, 1986

- 124. Briones ER, Mao STJ, Palumbo PJ, al. e: Analysys of plasma lipids and apolipoproteins in insulin dependent and non-insulin dependent diabetes. *Metabolism* 33:42-49, 1984
- 125. Hanak V, Munoz J, Teague J, stanley AJ, Bittner V: Accuracy of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio for prediction of the low-density lipoprotein phenotype B. *Am J Cardiol* 94:219-222, 2004
- 126. da Luz PL, Cesena FH, Favarato D, Cerqueira ES: Comparison of serum lipid values in patients with coronary artery disease at <50, 50 to 59, 60 to 69, and >70 years of age. Am J Cardiol 96:1640-1643, 2005
- 127. da Luz PL, Favarato D, Faria-Neto JR, Jr., Lemos P, Chagas AC: High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics (Sao Paulo)* 63:427-432, 2008
- 128. Beller GA: Noninvasive screening for coronary atherosclerosis and silent ischemia in asymptomatic type 2 diabetic patients: is it appropriate and cost-effective? *J Am Coll Cardiol* 49:1918-1923, 2007
- 129. Wong ND, Rozanski A, Grasnar H, al. e: Metabolic sindrome and diabetes are associated with an increased likelihood of inducible myocardial ischemia among patients with subclinical atherosclerosis. *Diabetes Care* 28:1445-1450, 2005
- 130. Steinbrecher UP, Witztum JL: Glucosylation of low- density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes* 33:130-134, 1984
- 131. Lyons TJ, Jenkins AJ: Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol* 8:174-180, 1997
- 132. Chan DC, Barrett PHR, Watts GF: Recent studies of lipoprotein kinetics in the metabolic syndrome and related disorders. *Curr Opin Lipidol* 17:28-36, 2006
- 133. Bach-Ngohou K, Ouguerram K, Nazih H, Maugère P, Ripolles-Piquer B, Zair Y, Frénais R, Krempf M, Bard JM: Apolipoprotein E kinetics: Influence of insulin resistance and type 2 diabetes. *International Journal of Obesity* 26:1451-1458, 2002
- 134. Tan KCB, Shiu SWM, Wong Y, Leng L, Bucala R: Soluble lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 in type 2 diabetes mellitus. *J. Lipid Res.* 49:1438-1444, 2008

- 135. Gillotte- Taylor K, Boullier A, Witztum JL, Steinberg D, Quehenberger O: Scavenger Receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoproteins. *J Lipid Res* 42:1474-1482, 2001
- 136. Rhainds D, Brodeur M, Lapointe J, Charpentier D, Falstrault L, Brissette L: The Role of Human and Mouse Hepatic Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) in the selective Uptake of Low Density Lipoprotein- Cholesteryl Esters. *Biochemistry* 42:7527-7538, 2003
- 137. Zang M, Zuccolo A, Hou X, Nagata D, walsh K, Herscovitz H, al. e: AMP-activated protein kinase is required for the lipid- lowering effect of metformin in insulin- resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem* 279:47898-47905, 2004
- 138. Feitosa ACR: Avaliação do metabolismo de lípides em diabéticos tipo 1 normolipidemicos e sem complicações microvasculares e macrovasculares significativas através da nanoemulsão lipídica artificial. In *Endocrinologia* São Paulo, Universidade de São Paulo, 2008, p. 123
- 139. Cohen MP, Jim Y, Lautenslager GT: Increase plasma glycated low-density lipoprotein concentrations in diabetes: a marker of atherogenic risk. *Diabet Technol Ther* 6:348-356, 2004
- 140. Houriuchi S, Higashit, Ikeda K, Et.al: Advanced Glycation End Products and their recognition by macrophages- derived cells. *diabetes* 1996:S73-S75, 1996
- 141. Reaven GM, Chen YD, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM: Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense low density lipoprotein particles. *J Clin Invest* 92:141-146, 1993
- 142. Laffont I, Shuvaev VV, Briand O, Lestavel S, Barbier A, Taniguchi N, Fruchat J-C, Clavey V, Siest G: Early glication of apolipoprotein E: effect of its binding to LDL receptor, scavenger receptor A and heparan sulphate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1583:99-107, 2002
- 143. Santos RD, Chacra AP, Morikawa A, Vinagre CC, Maranhao RC: Plasma kinetics of free and esterified cholesterol in familial hypercholesterolemia: effects of simvastatin. *Lipids* 40:737-743, 2005
- 144. Stary HC, Chander AB, Dinsmore RE, al. E: A definition of advanced type of atherosclerotic lesions and histological classification ofatherosclerosis. A report from the

Committee on vascular lesions of the council on artheriosclerosis. American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1512-1531, 1995

- 145. Tabas I: Free cholesterol induced citotoxity. A possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions. *Trends Cardiovasc Med* 7:256-263, 1997
- 146. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ: Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 117:2216-2224, 2007
- 147. Passarelli M, Tang C, McDonald TO, : Advanced glycation end products precursors impair ABCA1 dependent cholesterol removal from cells. *diabetes* 54:2198-2205, 2005
- 148. Matsuki K, Tamasawa N, Yamashita M, Tanabe J, Murakami H, Matsui J, Imaizumi T, Satoh K, Suda T: Metformin restore impaired HDL- mediated cholesterol efflux due to glycation. *Atherosclerosis*, 2009
- 149. Seydell TM: Transferencia in vitro de uma nanoemulsão artificial para a fração de HDL de pacientes com DM2. In *Cardiologia* São Paulo, Universidade de São Paulo, 2007, p. 61
- 150. Silva VM: Metabolismo do quilomicrom e capacidade da lipoproteina de alta densidade(HDL) de receber lípides na síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo 2. In *Cardiologia* São Paulo, Universidade de São Paulo, 2008, p. 104
- 151. Rocha MP, Maranhao RC, Seydell TM, Barcellos CR, Baracat EC, Hayashida SA, Bydlowski SP, Marcondes JA: Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and lipid transfer to high-density lipoprotein in young obese and normal-weight patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2009