OSCAR GIESE LAVERDY NETO

**Efeitos do controle glicêmico sobre os lípides séricos e na
transferência lipídica para a HDL em pacientes com *diabetes
mellitus* tipo 2: novos achados no status do colesterol não
esterificado**

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Lerario

São Paulo

2014

OSCAR GIESE LAVERDY NETO

**Efeitos do controle glicêmico sobre os lípides séricos e na
transferência lipídica para a HDL em pacientes com *diabetes
mellitus* tipo 2: novos achados no status do colesterol não
esterificado**

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Lerario

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Laverdy Neto, Oscar Giese

Efeitos do controle glicêmico sobre os lípides séricos e na transferência lipídica para a HDL em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 : novos achados no status do colesterol não esterificado / Oscar Giese Laverdy Neto. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientador: Antônio Carlos Lerario.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 2 2.Dislipidemias 3.Metabolismo dos lipídeos 4.Lipoproteínas HDL 5.Doenças cardiovasculares 6.Colesterol

USP/FM/DBD-305/14

Dedicatória

Dedico essa dissertação à minha mãe, Erondina, e à minha noiva, Nubia Caroline, mulheres da minha vida, que sempre me apoiaram e incentivaram nessa etapa da minha formação.

Também dedico ao meu falecido pai, Oscar, que foi um grande homem e médico e onde quer que esteja deve estar feliz pelo caminho que segue a minha carreira.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão, um gênio da medicina e da ciência, por ter acreditado em mim e por sempre ter me incentivado e apoiado na área científica, que até 3 anos atrás era uma novidade para mim. Com certeza tem sido meu grande professor e fonte de inspiração nesses últimos anos. Que continuemos esse caminho juntos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Lerário, por ter me aceitado como aluno na pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg pelos ensinamentos na área da endocrinologia.

À minha mãezinha querida por ser minha grande incentivadora e pelo apoio em momentos difíceis. Te amo!

À minha noiva, pelo amor, apoio e companheirismo nesses 8 anos juntos. Te amo!

Ao Tio Régis, meu padastro querido, a quem tenho muito carinho e admiração.

Aos meus irmãos, Ricardo, Carolina, Marcela e Lenny, que são meus orgulhos. Amo todos vocês!

Aos meus amigos-irmãos, Hemanoel, Adriano, Jota, Anderson e Lendl, inseparáveis desde a faculdade.

À Marília, ex pós-graduanda e agora doutora, pela ajuda essencial na elaboração do meu mestrado.

À querida Maria Aparecida da Silva (Cida), secretária da endocrinologia, sempre prestativa, me ajudando em momentos importantes na pós-graduação.

A todos os funcionários do laboratório de metabolismo de lípidos pela grande ajuda e ensinamentos na área da ciência. Obrigado a todos!

À FAPESP pelo apoio financeiro.

**Í O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia sim, e no
outro dia também!**

(Robert Collier)

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

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

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

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

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Características dos lipídios e das lipoproteínas	3
1.2.	A via da sinalização da insulina e a resistência insulínica	5
1.3.	A Hipertrigliceridemia no <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	7
1.4.	Metabolismo e funções da HDL.....	10
1.5.	Mudanças na HDL provocadas pelo <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	13
1.6.	Alterações na LDL provocadas pelo <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	15
1.7.	A transferência de lípidos para HDL	17
2.	OBJETIVOS	22
2.1.	Primário	22
2.2.	Secundários.....	22
3.	MÉTODOS	23
3.1.	Casuística	23
3.2.	Análise laboratorial	25
3.3.	Preparo da nanoemulsão lipídica artificial	27
3.4.	Ensaio de transferência dos 4 principais lípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para a HDL	28
3.5.	Análises estatísticas	30
4.	RESULTADOS	31
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÕES	56
7.	REFERÊNCIAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	Transportador cassete de ligação de ATP A1
ABCG1	Transportador cassete de ligação de ATP
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGE	Produto final de glicação avançada
AGL	Ácidos graxos livres
Akt	Proteína quinase B
Apo	Apolipoproteína
ARF-1	Fator 1 de ribosilação do ADP
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
ChREBP	Proteína ligadora dos elementos responsivos a carboidratos
CNE	Colesterol não esterificado
CoA	Coenzima A
COL	Colesterol
DAC	Doença arterial coronariana
DCV	Doença cardiovascular
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ERK2	Quinase regulada por sinal extracelular 2
FAS	Ácido graxo sintetase
FL	Fosfolipídios
Fox	Proteína forkhead caixa
GLUT	Transportador de glicose
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de densidade alta
HDL-c	Colesterol da lipoproteína de densidade alta
HL	Lipase hepática
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina
HSL	Lipase hormônio-sensível
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária

IκB	Inibidor kappa B
IKK	Quinase do inibidor kappa B
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JNK	c-Jun N-terminal quinase
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LDL-c	Colesterol da lipoproteína de densidade baixa
LDLR	Receptor da lipoproteína de densidade baixa
LPL	Lipoproteína lipase
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
PDH	Piruvato Desidrogenase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLD1	Fosfolipase D1
PLTP	Proteína de transferência de fosfolipídeos
PON1	Paraoxonase-1
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
SOCS	Supressor da sinalização de citocinas
SR-BI	Receptor de varredura classe B tipo I
SREBP-1c	Proteína ligadora dos elementos regulados por esteróis
TG	Triglicerídeos
TLR	Receptor do tipo Toll

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das principais lipoproteínas	3
Tabela 2 - Funções das principais apolipoproteínas	4
Tabela 3 - Características clínicas e físicas dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA _{1c} m6,5% e com HbA _{1c} > 6,5%	31
Tabela 4 - Dados laboratoriais dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA _{1c} m6,5% e com HbA _{1c} > 6,5%	33
Tabela 5 - Diâmetro e composição lipídica da HDL dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA _{1c} m6,5% e com HbA _{1c} > 6,5%	34
Tabela 6 . Dados laboratoriais dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA _{1c} m6% e com HbA _{1c} ⁻ 8%	36
Tabela 7 - Diâmetro e composição lipídica da HDL e transferência lipídica para HDL dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA _{1c} m6% e com HbA _{1c} ⁻ 8%	37
Tabela 8 - Dados clínicos e laboratoriais dos 72 pacientes com diabetes tipo 2 com AGL m0,45 mEq/L e dos 71 pacientes com AGL > 0,45 mEq/L	38
Tabela 9 . Diâmetro e composição lipídica da HDL e transferência lipídica para HDL dos 72 pacientes com diabetes tipo 2 com AGL m0,45 mEq/L e dos 71 pacientes com AGL > 0,45 mEq/L	39
Tabela 10 . Metas lipídicas dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA _{1c} m6,5% e com HbA _{1c} > 6,5%, conforme estabelecido pela <i>American Diabetes Association</i> ...	40

Tabela 11 - Dados laboratoriais dos pacientes com diabetes tipo 2 com e sem uso de insulina 41

Tabela 12 - Diâmetro e composição lipídica da HDL e transferência lipídica para HDL dos pacientes com diabetes tipo 2 com e sem uso de insulina..... 42

Tabela 13 - Dados laboratoriais e das transferências lipídicas *in vitro* da nanoemulsão para a HDL de pacientes com diabetes tipo 2 com e sem uso de insulina pareados para glicemia de jejum e HbA_{1c} 43

Tabela 14 - Diâmetro e composição lipídica da HDL e transferência lipídica para HDL dos pacientes com diabetes tipo 2 com e sem uso de insulina pareados para glicemia de jejum e HbA_{1c} 44

Tabela 15 - Correlações entre HbA_{1c} e as características clínicas e os parâmetros glicêmicos e lipídicos dos pacientes com diabetes tipo 2 45-46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Patogênese da dislipidemia do <i>diabetes mellitus</i> tipo 2 (DM2)	2
Figura 2 . Comparação da lipoproteína de densidade baixa (LDL) com a nanopartícula lipídica artificial (LDE)	19
Figura 3 . Ensaio de transferência lipídica para HDL <i>in vitro</i>	29
Figura 4 . Transferências <i>in vitro</i> de colesterol não esterificado e esterificado, fosfolípidios e triglicerídeos da nanoemulsão lipídica para a HDL no grupo HbA _{1c} m 6,5% (n=62) e no grupo HbA _{1c} > 6,5% (n=81)	35

RESUMO

Laverdy Neto OG. *Efeitos do controle glicêmico sobre os lípides séricos e na transferência lipídica para a HDL em pacientes com diabetes mellitus tipo 2: novos achados no status do colesterol não esterificado* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Uma das causas da doença cardiovascular do diabético é a dislipidemia associada ao *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), caracterizada basicamente por hipertrigliceridemia e baixa concentração de HDL-colesterol. O bom controle da glicemia geralmente resulta em diminuição dos triglicerídeos plasmáticos, mas há controvérsia na literatura quanto aos níveis de HDL-colesterol e outros parâmetros lipídicos. As transferências lipídicas para a HDL têm importante função na sua formação e remodelamento e no seu papel antiaterogênico do transporte reverso do colesterol. A transferência de lípidos entre as lipoproteínas é bidirecional e depende da estrutura e concentração da lipoproteína doadora e receptora, assim como da ação das proteínas de transferências, CETP e PLTP. **Objetivo:** Investigar as relações dos níveis glicêmicos com as transferências lipídicas para a HDL e com outros parâmetros do metabolismo lipídico em pacientes com DM2. **Métodos:** 143 pacientes com DM2, que não estavam usando drogas hipolipemiantes, foram selecionados e separados em dois grupos: grupo com hemoglobina glicada (HbA_{1c}) $\leq 6,5\%$ ($n=62$) e grupo com $HbA_{1c} > 6,5\%$ ($n=81$). O método *in vitro* de transferência lipídica para a HDL foi realizado através da incubação sob agitação, por 1 hora, de uma nanoemulsão doadora contendo colesterol esterificado e não esterificado, fosfolípidios e triglicerídeos, marcados radioativamente, com o plasma do paciente, seguido de precipitação química e contagem dos lípidios radiomarcados transferidos para HDL. Outras determinações plasmáticas do metabolismo lipídico também foram realizadas. Foi também verificado o percentual de pacientes nos dois grupos com o perfil lipídico dentro das metas estabelecidas pela *American Diabetes Association*. Pacientes com ou sem uso de insulina e com níveis maiores e menores de ácidos graxos livres (AGL) foram comparados quanto aos parâmetros estudados. **Resultados:** O grupo $HbA_{1c} > 6,5\%$ apresentou maior trigliceridemia (205 ± 115 vs

140±54mg/dl; $p<0,0001$) e colesterol não esterificado (36,4±7,6 vs 33,7±5,7mg/dl; $p<0,05$), além de apresentar maior concentração de triglicerídeos na partícula de HDL (9,2±2,8 vs 8,1±2,3%; $p<0,05$), do que o grupo HbA_{1c}≤6,5%. As concentrações de triglicerídeos, colesterol total e não esterificado e também o colesterol da fração não-HDL correlacionaram-se positivamente com a HbA_{1c} ($r=0,25$, $r=0,19$, $r=0,18$, $r=0,17$, respectivamente, $p<0,05$). A concentração de colesterol esterificado da HDL correlacionou-se negativamente com a HbA_{1c} ($r=-0,19$, $p<0,05$). Os pacientes com HbA_{1c}≤6,5% atingiram mais a meta trigliceridêmica do que os com HbA_{1c}>6,5% (66 vs 37%; $p<0,001$). Os pacientes com maiores níveis de AGL tiveram maior trigliceridemia (196±105 vs 153±81 mg/dl; $p<0,01$) e atividade de LCAT (1,36±0,10 vs 1,29±0,10 470/390nm; $p<0,01$), além de uma maior concentração de triglicerídeos na partícula de HDL (9,4±2,9 vs 7,8±2,0%; $p<0,001$), em relação aos pacientes com menores níveis de AGL. A transferência dos quatro lipídios da nanoemulsão para a HDL foi igual na comparação de todos os grupos deste estudo. **Conclusão:** Os resultados deste estudo mostraram pela primeira vez que junto com os triglicerídeos, o colesterol não esterificado é também um marcador de pobre controle glicêmico em pacientes com DM2.

Descritores: Diabetes Mellitus tipo 2; Dislipidemias; Metabolismo dos Lipídeos; Lipoproteínas HDL; Doenças cardiovasculares; Colesterol.

ABSTRACT

Laverdy Neto OG. *Effects of glycemic control upon serum lipids and lipid transfers to HDL in patients with type 2 diabetes mellitus: novel findings in unesterified cholesterol status* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introduction: One cause of cardiovascular disease (CVD) of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) is diabetic dyslipidemia, characterized primarily by hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol. Good blood glucose control usually results in decreased plasma triglycerides, but there is controversy in the literature as to the levels of HDL-cholesterol and other lipid parameters. Lipid transfers to HDL play an important role in the formation and remodeling of HDL and on its antiatherogenic role of reverse cholesterol transport. The transfer of lipids between lipoproteins is bidirectional and depends on the structure and concentration of the donor and acceptor lipoprotein as well as the action of the transfer proteins, PLTP and CETP. **Objective:** Investigate the relationship of blood glucose levels with lipid transfers to HDL and other parameters of lipid metabolism in patients with T2DM. **Methods:** 143 patients with T2DM, who were not using lipid-lowering drugs, were selected and divided into two groups: group with glycated hemoglobin (HbA_{1c}) $\leq 6.5\%$ (n=62) and group with HbA_{1c} $> 6.5\%$ (n=81). In vitro lipid transfers to HDL was performed by 1 hour incubation under stirring of a donor nanoemulsion containing radioactively labeled unesterified and esterified cholesterol, phospholipids and triglycerides with whole patient plasma, followed by chemical precipitation and counting of radiolabeled lipids transferred to HDL. Other determinations of plasma lipid metabolism were also performed. It was also checked the percentage of patients in both groups with lipid profile within the targets set by the American Diabetes Association criteria. Patients with or without insulin use and with higher and lower free fatty acids (FFA) levels were also compared for the studied parameters. **Results:** HbA_{1c} $> 6.5\%$ group had higher triglyceridemia (205 ± 115 vs 140 ± 54 mg/dl, $p < 0.0001$) and unesterified cholesterol (36.4 ± 7.6 vs 33.7 ± 5.7 mg/dl, $p < 0.05$) than the HbA_{1c} $\leq 6.5\%$ group. The concentrations of triglycerides, total and unesterified

cholesterol and also non-HDL cholesterol was positively correlated with HbA_{1c} ($r=0.25$, $r=0.19$, $r=0.18$, $r=0.17$, respectively, $p<0.05$). The concentration of esterified cholesterol from HDL was negatively correlated with HbA_{1c} ($r = -0.19$, $p<0.05$). Patients with HbA_{1c} $\leq 6.5\%$ achieved more the triglyceridemic target than the patients with HbA_{1c} $>6.5\%$ (66 vs 37%, $p<0.001$). Patients with higher levels of FFA had higher triglycerides levels (196 ± 105 vs 153 ± 81 mg/dl, $P<0.01$) and LCAT activity (1.36 ± 0.10 vs 1.29 ± 0.10 470/390nm, $p<0.01$), in addition to a higher concentration of triglycerides in the HDL particle (9.4 ± 2.9 vs $7.8 \pm 2.0\%$, $p <0.001$). The transfer of the four lipid of the nanoemulsion to HDL was equal in the comparison of all the studied groups. **Conclusion:** The results of this study showed for the first time that unesterified cholesterol, along with triglycerides, is also a marker of poor glycemic control in patients with T2DM.

Descriptors: Diabetes Mellitus, type 2; Dyslipidemias; Lipid metabolism; Lipoproteins, HDL; Cardiovascular disease; Cholesterol.

1. INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) é uma das doenças crônicas mais prevalentes na atualidade, representando até 95% de todos os tipos de diabetes. É considerado uma epidemia global, afetando mais de 340 milhões pessoas no mundo, atualmente. A incidência do DM2 vem aumentando ao longo dos anos - estima-se que em 2035 esta doença atinja mais de 530 milhões de indivíduos- com morbimortalidade crescente relacionada, principalmente, a causas macrovasculares (International Diabetes Federation, 2013).

Neste cenário, a doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de óbito em pacientes com DM2, sendo responsável por mais de 60% desses óbitos. A incidência da DCV em pacientes diabéticos é 2 a 4 vezes maior do que em pacientes não diabéticos (Legato et al., 2006; Emerging Risk Factors Collaboration, 2010; American Diabetes Association, 2013a,b; Go et al., 2013;). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o DM2 é um fator de risco independente para a DCV e que ele amplifica os efeitos de outros fatores de riscos, como o tabagismo, a hipertensão arterial e a hipercolesterolemia (Stamler et al., 1993; Almdal et al., 2004). Além disso, o risco de mortalidade em pacientes diabéticos sem doença arterial coronariana (DAC) é similar àqueles com infarto agudo do miocárdio prévio, mas sem diabetes (Haffner et al., 1998). Assim, a DCV em pacientes com DM2 cursa com maior gravidade do que a DCV em não-diabéticos, tanto pela intensidade e frequência das complicações, quanto pela maior taxa de mortalidade (Saydah et al., 2002).

O processo aterogênico no DM2 não difere substancialmente do que ocorre em indivíduos não diabéticos. Envolve disfunção endotelial, processos de natureza inflamatório-proliferativa, depósito lipídico na parede arterial, alterações de coagulação e formação de espécies reativas de oxigênio. No entanto, devido às mudanças na composição e metabolismo das lipoproteínas no DM2, os pacientes diabéticos possuem um perfil lipidômico mais aterogênico (Hansson, 2005; Orasanu, Plutzky, 2009).

Muito dessa aterogenicidade do DM2 deriva de uma complexa interação do metabolismo de lípidos com a resistência e deficiência dos níveis de insulina, que é a base fisiopatológica do DM2, sendo que o risco de DCV nos pacientes com diabetes tipo 2, apesar de controvérsias, parece estar associado ao controle glicêmico (Pistrosch et al., 2011). Essas alterações no metabolismo das lipoproteínas são uma das principais razões para a aterogenicidade e alta morbimortalidade cardiovascular do diabetes tipo 2 e levam à dislipidemia diabética caracterizada basicamente pela tríade: hipertrigliceridemia, baixa concentração de HDL-colesterol e por uma LDL pequena e densa (Hseuh et al, 1998; Ginsberg, Huang, 2000; Orasanu, Plutzky, 2009). As alterações que ocorrem na dislipidemia do diabetes tipo 2 estão resumidas na Figura 1 e serão melhor caracterizadas posteriormente.

Figura 1. Patogênese da dislipidemia do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2). O aumento das vias de sinalização inflamatória intracelular provocado por AGL e citocinas inflamatórias leva à resistência insulínica, uma das principais causas das alterações do metabolismo de lípidos no DM2, culminando com a tríade: hipertrigliceridemia, baixo HDL-colesterol e LDL pequena e densa. A hipertrigliceridemia estimula, através da CETP, a transferência de ésteres de colesterol da HDL e da LDL para a VLDL e de triglicerídeos da VLDL para a HDL e LDL. A HDL e a LDL rica em triglicerídeos sofrem ação da HL e da LPL. A LDL pequena e densa é mais aterogênica e a HDL pequena e densa é mais facilmente degradada nos rins. Abreviaturas: HDL, lipoproteína de densidade alta; LDL, lipoproteína de densidade baixa; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; AGL, ácidos graxos livres; ApoB, apolipoproteína B; ApoA1, apolipoproteína A1; TG, triglicerídeos; CE, ésteres de colesterol; CETP, proteína transportadora de ésteres de colesterol; LPL, lipoproteína lipase; HL, lipase hepática; PD, pequena e densa. Adaptado de Chehade et al., 2013.

1.1. Características dos lipídios e das lipoproteínas

As lipoproteínas são complexos macromoleculares que carregam proteínas e lipídios. Sua principal função é o transporte dos triglicerídeos e colesterol.

As lipoproteínas têm sido caracterizadas pelo seu tamanho, densidade e composição, sendo divididas em cinco principais classes: quilomícrons, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de densidade baixa (LDL) e lipoproteína de densidade alta (HDL). As características físicas e químicas das lipoproteínas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características das principais lipoproteínas

Lipoproteína	Densidade (g/dL)	M (daltons)	Diâmetro (nm)	Lipídios (%)*		
				TG	COL	FL
Quilomícrons	0,95	400x10 ⁶	75-1200	80-95	2-7	3-9
VLDL	0,95 . 1,006	10-80x10 ⁶	30-80	55-80	5-15	10-20
IDL	1,006 . 1,019	5-10x10 ⁶	25-35	20-50	20-40	15-25
LDL	1,019 . 1,063	2,3x10 ⁶	18-25	5-15	40-50	20-25
HDL	1,063 . 1,21	1,7-3,6-10 ⁶	5-12	5-10	15-25	20-30

VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; LDL, lipoproteína de densidade baixa; HDL, lipoproteína de densidade alta; M, peso molecular; TG, triglicerídeos; COL, colesterol; FL, fosfolípidios. * Porcentagem da composição de lipídios em cada lipoproteína (as apolipoproteínas compõem a maior parte do restante das lipoproteínas).

As proteínas presentes na superfície das lipoproteínas são chamadas de apolipoproteínas. Estas proteínas especializadas promovem estabilidade às lipoproteínas e são importantes reguladoras das suas funções, pois agem como ligantes de vários de seus receptores, assim como podem inibir ou ativar várias enzimas responsáveis pelo seu metabolismo. Das cinco principais classes de apolipoproteínas (apoA, apoB, apoC, apoD e apoE), duas apolipoproteínas se destacam: apoA-I e apoB. A apoB se apresenta em uma forma completa sintetizada no fígado (apoB-100) e em uma forma truncada sintetizada no intestino (apoB-48). A apoB-48 está presente nos quilomícrons e seus remanescentes e a apoB-100 está presente na VLDL, IDL e LDL. Todas essas lipoproteínas que contêm a apoB têm o

potencial de penetrar a parede arterial e entrar no espaço subendotelial, onde são oxidadas, iniciando o processo de aterosclerose. A apoA-I é sintetizada no fígado e intestino delgado e está presente principalmente na HDL, que é considerada uma lipoproteína anti-aterogênica (Ginsberg, 1991). Sendo assim, as concentrações de apoB e de apoA-I são bons correspondentes do número de lipoproteínas que contém apoB (quilomícrons, VLDL, IDL e LDL) e que contém apoA-I (HDL, principalmente), respectivamente. As funções das principais apolipoproteínas estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Funções das principais apolipoproteínas

Apolipoproteína	Lipoproteína	Funções
apoA-I	HDL, quilomícrons	Componente estrutural da HDL; ativadora da LCAT.
apoA-II	HDL, quilomícrons	Componente estrutural da HDL; inibe a lipase hepática.
apoA-IV	HDL, quilomícrons	Possivelmente facilita a absorção intestinal lipídica e ajuda na regulação da saciedade.
apoA-V	HDL	Inibe a produção da VLDL e estimula a LPL.
apoB-48	Quilomícrons	Necessária para a formação e secreção de quilomícrons no intestino delgado.
apoB-100	VLDL, IDL, LDL	Necessária para a formação e secreção da VLDL no fígado; ligante para o receptor de LDL.
apoC-I	Quilomícrons, VLDL, IDL, HDL	Ativa a LCAT; inibe a CETP; inibe a captação hepática de quilomícrom e VLDL remanescente.
apoC-II	Quilomícrons, VLDL, IDL, HDL	Cofator essencial para a ativação da LPL.
apoC-III	Quilomícrons, VLDL, IDL, HDL	Inibe a LPL e a captação hepática de quilomícrom e VLDL remanescente.
apoD	Principalmente HDL	Modula a atividade de LCAT; protege contra o estresse oxidativo.
Apõe	Quilomícrons, VLDL, IDL, HDL	Ligante para o receptor de LDL; ligante para o receptor hepático de quilomícrom e VLDL remanescente.
apo(a)	Lp(a)	Componente estrutural da Lp(a); inibidora da ativação de plasminogênio na Lp(a); preditor independente de DAC.

HDL, lipoproteína de densidade alta; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; IDL, lipoproteína de densidade intermediária; LDL, lipoproteína de densidade baixa; Lp(a), lipoproteína(a); LCAT, lecitina-colesterol aciltransferase; LPL, lipoproteína lipase; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; DAC, doença arterial coronariana.

Os quatro principais lipídios são: fosfolipídios, triglicerídeos e colesterol não esterificado e esterificado. Os fosfolipídios compõem a maior parte da superfície das lipoproteínas e são anfipáticos, permitindo a solubilização dos lipídios hidrofóbicos. Os triglicerídeos estão presentes no núcleo das lipoproteínas e são importantes fontes de energia para o fígado e tecidos periféricos, principalmente músculo, sendo o principal lipídio dos quilomícrons e da VLDL. O colesterol é o principal componente da HDL e LDL e serve como componente estrutural das membranas celulares e como precursor para hormônios esteróides e sais biliares. O colesterol não esterificado, também chamado de livre, é um lipídio anfipático e está localizado na superfície das lipoproteínas, podendo difundir-se facilmente no plasma. O colesterol esterificado é hidrofóbico e mais estável, localizando-se no núcleo das lipoproteínas (Ginsberg, 1991).

1.2. A via da sinalização da insulina e a resistência insulínica

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células beta pancreáticas, cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. Sua ação ocorre em vários tecidos periféricos, incluindo fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo; aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio; bloqueio da produção hepática de glicose e lipólise (Aronoff et al., 2004).

A sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína com atividade quinase intrínseca, denominado receptor de insulina (IR). A ativação do IR resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2). A fosforilação dos IRS cria sítios de ligação para outra proteína citosólica, denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), promovendo sua ativação. A ativação da PI3K induz a transformação do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), aumentando a fosforilação em serina da

proteína quinase B (Akt), o que permite a translocação da proteína GLUT4 para a membrana celular, promovendo a entrada de glicose por difusão facilitada (Siddle, 2011).

A presença de elevados níveis de ácidos graxos livres (AGL) circulantes está associada a uma menor fosforilação em sítios específicos e à menor ativação de proteínas-chave da via da insulina (IRS/PI3K). Evidências apontam uma relação direta entre AGL e resistência à insulina decorrente do acúmulo de triglicerídeos e metabólitos derivados de ácidos graxos (diacilglicerol, acetil-CoA e ceramidas) no músculo e fígado. O aumento desses metabólitos provenientes da oxidação lipídica no músculo é capaz de provocar a ativação da proteína quinase C (PKC) e da quinase do inibidor kappa B (IKK), enzimas que inibem o sinal da insulina através da fosforilação do IRS-1 em serina (DeFronzo, 2010).

A origem das citocinas inflamatórias na obesidade decorre da migração de macrófagos para os adipócitos; em paralelo, ácidos graxos provenientes da dieta são capazes de ativar proteínas de membrana celulares denominadas TLR-4, tipo de Receptor do Tipo Toll (TLR), que funcionam como mediadores da via inflamatória com consequências negativas para ações da insulina em tecidos metabólicos. Esses receptores desempenham importante atividade proinflamatória e são sensíveis também aos ácidos graxos. Ao se ligarem a esse receptor de membrana celular, alguns ácidos graxos acionam vias de resposta inflamatória associadas à JNK (c-Jun N-terminal quinase), I B (inibidor kappa B) e NF B (fator nuclear kappa B), que bloqueiam a ação da insulina (Fröjdö et al., 2009; DeFronzo, 2010).

Em condições basais, o NF B está associado com o I B no citoplasma. Quando ocorre a ativação desta via por fatores inflamatórios (ex.: TNF- α , citocinas, ácidos graxos) a IKK fosforila o I B, causando a poliubiquitinação do I B e sua posterior degradação. O NF B livre transloca-se para o núcleo, onde se liga a genes-alvo, estimulando mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1B, IL-6, PKC). A TNF- α , IL-6 e PKC, bem como a IKK e JNK, levam à fosforilação de serina do IRS-1, inibindo a sinalização da insulina (Fröjdö et al., 2009; DeFronzo, 2010).

O óxido nítrico (NO) é um importante sinalizador intracelular capaz de modificar a função proteica por diversos mecanismos em etapas pós-transcricionais, incluindo nitrosilação, nitratação e S-nitrosação. A S-nitrosação é

capaz de modificar a função de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina. Em modelos de resistência à insulina foi observado a ativação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), proteína responsável pela produção de NO. Nesses modelos, a sinalização da insulina pela via IR/IRS-1/Akt estava diminuída, e os níveis de S-nitrosação dessas proteínas encontravam-se aumentados no músculo esquelético. Concluiu-se, assim, que a S-nitrosação de proteínas envolvidas na transmissão do sinal da insulina seria um novo mecanismo molecular de resistência à insulina associado à indução da iNOS (Carvalho-Filho et al., 2005, 2006).

Existem também outros reguladores negativos da via de transdução do sinal de insulina que estão estreitamente relacionados ao aumento do programa próinflamatório, incluindo a proteína mTOR (Alvo da Rapamicina em Mamíferos) que é capaz de fosforilar o IRS-1 em serina. A SOCS (Supressor da Sinalização de Citocinas), cujos genes são alvos das vias da JNK e IKK, também está implicada na resistência à insulina promovida pelo TNF- α . Isso mostra que diversas proteínas pró-inflamatórias estão elevadas na obesidade e trazem como consequência a resistência à ação da insulina e outras alterações metabólicas (Fröjdö et al., 2009).

Portanto, a ativação dessas proteínas na obesidade, especialmente IKK, JNK e iNOS, ressalta a sobreposição das vias metabólicas e inflamatórias. Fica evidente que diversos fatores, atuando conjuntamente ou de forma independente, podem regular negativamente a ação da insulina, agindo tanto no receptor quanto em moléculas pós-receptor. Na obesidade inúmeras moléculas bioquímicas provenientes dos adipócitos ou dos macrófagos podem provocar a ativação de serina-quinases e outras moléculas capazes de fosforilar moléculas em resíduos de serina ou causar nitrosilação em proteínas como o IRS-1 e IRS-2, inibindo a sinalização da insulina.

1.3. A Hipertrigliceridemia no *diabetes mellitus* tipo 2

A alteração lipídica mais comum na dislipidemia do DM2 é a hipertrigliceridemia. A importância do seu controle no DM2 deve-se ao fato da

hipertrigliceridemia estar associada como fator de risco independente e bem estabelecido de DAC (Murad et al., 2012).

O metabolismo dos triglicerídeos está relacionado com a ação insulínica, como na síntese e ação da lipoproteína lipase (LPL), enzima que catalisa a degradação de triglicerídeos nas lipoproteínas ricas em triglicerídeos (VLDL e quilomícrons); e da lipase hormônio-sensível (HSL), que hidrolisa triglicerídeos e libera ácidos graxos dos tecidos como músculo e tecido adiposo. A insulina tem ação anti-lipolítica, inibindo a ação da HSL no tecido adiposo e estimulando a atividade da LPL. Assim, a resistência e o déficit de insulina, características do DM2, levam à intensificação da lipólise, ocasionada pelo aumento da ação da HSL, promovendo, portanto, maior liberação do tecido adiposo e aumento da circulação plasmática de AGL; além de aumentar a sua captação no fígado. Esse incremento do aporte hepático de ácidos graxos promove à intensificação da síntese hepática de triglicerídeos e formação da VLDL, que aliada à diminuição da degradação de triglicerídeos da VLDL e quilomícrons pela LPL, leva à hipertrigliceridemia (Ginsberg, 1991; Taskinen, 2003; Vergès, 2010).

A VLDL é uma lipoproteína rica em triglicerídeos cuja síntese e secreção estão aumentadas no DM2. Sua síntese é realizada no fígado e inicia-se no retículo endoplasmático rugoso, onde a apoB-100, principal apolipoproteína estrutural da VLDL, recebe lipídios pela ação da Proteína de Transferência Microsomal (MTP), levando a formação da pré-VLDL. Após aquisição de novos lipídios, a pré-VLDL transforma-se em VLDL₂, subfração pequena e pobre em triglicerídeos. A VLDL₂ sai do retículo endoplasmático para o Complexo de Golgi regulada pelo Fator 1 de Ribosilação do ADP (ARF-1). No Complexo de Golgi a Fosfolipase D1 (PLD1) e a Quinase Regulada por Sinal Extracelular 2 (ERK2) promovem a adição de novos lipídios à VLDL₂, que é convertida em uma lipoproteína maior, a VLDL₁. A resistência insulínica no DM2 está associada a maiores quantidades de ácidos graxos livres na circulação e no fígado e a maior produção de VLDL₁ (Vergès, 2010).

Estudos mostram que a insulina tem um efeito inibitório na secreção e síntese e estimula a degradação da apoB, além de reduzir diretamente a produção e secreção da VLDL pelos hepatócitos. A ativação da via PI3K/AKT pela insulina estimula a expressão da cisteína protease ER60, que promove a degradação da

apoB. A insulina também inibe os fatores de transcrição FoxO1 e FoxA2, que estimulam a expressão da MTP, proteína responsável pela lipidação da apoB na formação da VLDL. Ainda, a insulina, também através do estímulo da PI3K, inibe a PLD1 e o ARF-1, fatores envolvidos na formação da VLDL₁, e inibe a secreção da apoB. Assim, independente do efeito da insulina nos ácidos graxos livres, a resistência insulínica intensifica o aumento da síntese e secreção da VLDL e apoB, assim como diminui a sua degradação (Ginsberg, 1991; Goldberg, 1996; Taskinen, 2003; Vergès, 2010).

A hiperinsulinemia e hiperglicemia do DM2 estimulam a lipogênese ~~de novo~~ ^{de novo}, na qual a glicose serve como precursora e a acetil-CoA como substrato imediato para a síntese de ácidos graxos no fígado. A acetil-CoA é produzida na mitocôndria a partir do piruvato, produto da degradação da glicose (glicólise), por ação da Piruvato Desidrogenase (PDH). A síntese de ácidos graxos ocorre a partir da adição sucessiva de dois carbonos a uma acetil-CoA inicial, que é convertida a malonil-CoA por ação da enzima Acetil-CoA Carboxilase (ACC) e posteriormente a ácido graxo por ação da enzima Ácido Graxo Sintetase (FAS). A hiperinsulinemia aumenta as atividades da PDH e ACC e estimula a expressão da Proteína Ligadora dos Elementos Regulados por Esteróis (SREBP-1c), fator de transcrição de genes envolvidos na síntese de ácido graxo, como ACC e FAS. Já a hiperglicemia estimula a expressão da Proteína Ligadora dos Elementos Responsivos a Carboidratos (ChREBP), fator de transcrição que promove a síntese da PDH, ACC e FAS. Esse excesso de ácidos graxos no fígado, tanto pelo aumento da lipogênese “de novo” quanto pelo aumento da lipólise no DM2, na presença de níveis adequados de glicogênio, é usado na formação de novas moléculas de triglicerídeos. (Taskinen, 2003; Vergès, 2010).

O fluxo aumentado de ácidos graxos livres no fígado resulta em diminuição da captação hepática de insulina através da inibição da sua ligação ao receptor, reduzindo sua degradação hepática e causando hiperinsulinemia sistêmica. Os ácidos graxos livres em excesso também levam ao comprometimento funcional das células pancreáticas, como parte do processo de lipotoxicidade. O excesso de ceramidas (metabólitos derivados da oxidação dos AGL), o estresse do retículo endoplasmático e o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio,

provocados pelo excesso de AGL e também por outras citocinas inflamatórias derivadas do tecido adiposo, são responsáveis pela apoptose das células pancreáticas. O aumento de AGL nas células também regulam negativamente a expressão do gene da insulina através da ativação da JNK e ERK 1 e 2, diminuindo a sua biossíntese. Além disso, a diminuição da secreção da insulina pelo pâncreas também está relacionado com o excesso de AGL (Boden, Shulman, 2002; Yang, Li, 2012).

O processo de resistência insulínica e o excesso de ácidos graxos livres apresentam, portanto, uma relação direta bidirecional e mostram-se como importantes fatores precursores da dislipidemia do DM2.

1.4. Metabolismo e funções da HDL

A HDL compreende uma classe heterogênea de lipoproteínas com densidade > 1.063 g/ml e com tamanho variável de 7 a 14 nm. É formada no compartimento intravascular pela aquisição de lipídios (fosfolipídios e colesterol não esterificado), provenientes da lipólise das lipoproteínas ricas em triglicérides, na apoA-I, originando, inicialmente, partículas de HDL em forma de discos (HDL nascente ou pré-HDL). HDLs nascentes pobres em lipídios, contendo a apoA-I, também são secretadas pelo fígado e intestino. Essas partículas captam o excesso de colesterol não esterificado das células dos tecidos periféricos e da superfície das lipoproteínas ricas em triglicérides, sendo convertidas a partículas menores, as HDL3. As HDL3, então, são progressivamente transformadas em partículas de forma esférica, as HDL2, através da aquisição de lípidos e da esterificação do colesterol pela ação da enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), que usa a apoA-I como cofator (Ginsberg, 1991).

A LCAT controla o efluxo de colesterol através da criação de um gradiente de colesterol não esterificado da membrana celular para HDL, além de inibir a sua recaptação pelas células. A aquisição de lípidos e esterificação do colesterol

ocorrem de forma contínua e tem como produto final a HDL madura ou -HDL (Wang et al., 2004; Ballantyne, 2009).

Há uma troca contínua de lipídios entre a HDL e as outras lipoproteínas, que é promovida pelas proteínas de transferência de lípidos. Essas proteínas transferem lípidos -colesterol esterificado e não esterificado, triglicerídeos e fosfolípidos- de uma classe de lipoproteínas para outra, sendo as principais: a proteína transportadora de éster de colesterol (CETP), que transfere colesterol esterificado e triglicerídeos entre as lipoproteínas, e a proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP), que transfere fosfolípidos e colesterol não esterificado, além de outros compostos anfipáticos (Lyons, Jenkins, 1997; Dullaart et al., 2004). A transferência de lípidos entre as lipoproteínas é bidirecional e depende da concentração e da estrutura da lipoproteína doadora e receptora, assim como da ação das proteínas de transferências CETP e PLTP (Lamarche et al, 1999; Rashid et al., 2003; Ferretti et al., 2006; Norata et al., 2006;). A HDL é, portanto, constantemente remodelada e a esterificação do colesterol associada à transferência de lípidos é essencial para o papel dessa lipoproteína no transporte reverso do colesterol.

A principal função da HDL é a de promover o transporte reverso do colesterol, que é considerado um importante determinante do papel antiaterogênico dessa lipoproteína. Neste processo, o colesterol não esterificado das células periféricas é transferido para as partículas de HDL através da ligação da apoA-I ao transportador cassete de ligação de ATP A1 (ABCA1) e G1 (ABCG1) das células. A transferência de colesterol não esterificado para a HDL nascente é feito através do ABCA1 e para a HDL madura pelo ABCG1. O efluxo de colesterol das células para as partículas de HDLs maduras pode também ser realizado através de difusão passiva pelo receptor de varredura classe B tipo I (SR-BI), que tem a capacidade de promover o transporte de colesterol não esterificado tanto para dentro como para fora das células, dependendo do gradiente de concentração de colesterol entre a HDL e a célula receptora/doadora. O SR-BI também promove a captação seletiva do colesterol esterificado da HDL pelas células periféricas, sendo que esse processo é unidirecional e ocorre sem a endocitose de toda partícula da HDL. A colisão das moléculas de colesterol não esterificado com as partículas de HDL no meio aquoso extracelular também provoca a captação de colesterol pela HDL. Na HDL, o

colesterol não esterificado é esterificado sob a ação da LCAT, como já citado anteriormente. O colesterol na sua forma esterificada é capturado pelo fígado, através dos receptores SR-BI, ou transferidos para outras lipoproteínas, através da CETP, as quais também serão captadas pelo fígado, onde o colesterol é convertido em ácidos biliares e excretado pelas fezes. Nesse processo, portanto, o transporte reverso do colesterol controla o excesso de colesterol no nosso organismo (Ballantyne, 2009; Rosenson et al., 2012).

Estudos têm mostrado que a HDL tem papel protetor na secreção de insulina e aumenta a captação de glicose no músculo esquelético. A HDL pode reverter os efeitos deletérios da LDL oxidada sobre a secreção de insulina, assim como o ABCA1 tem capacidade de modular a secreção de insulina. A apo-AI é capaz de estimular a fosforilação da AMPK, enzima regulatória metabólica, promovendo maior absorção de glicose em miócitos (Brunham et al., 2007; Drew et al., 2009; Siebel et al., 2013). Além disso, há evidências que a baixa concentração de HDL está relacionada com o agravamento do diabetes. A célula pancreática expressa receptores SR-BI que captam a HDL. A HDL, por sua vez, protege essa célula do estresse induzido pela hiperinsulinemia e hiperglicemia, diminuindo a inflamação e o acúmulo de colesterol nas Ilhotas de Langerhans e evitando, assim, a apoptose dessas células. Esse mecanismo de proteção da HDL nas células pancreáticas estaria relacionado com a ativação da via antiapoptótica da Akt e inibição da caspase-3, proteína com papel central na fase de execução da apoptose celular, além da inibição da apoptose induzida pela IL-1 (Abderrahmani et al., 2007; Fryirs et al., 2010; Pétremand et al., 2012).

A HDL também tem atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitrombótica e vasodilatadora, que contribuem para a ação antiaterogênica dessa lipoproteína (Meyers et al., 2004; Wang et al., 2004).

1.5. Mudanças na HDL provocadas pelo *diabetes mellitus* tipo 2

Como já bem estabelecido na literatura, o HDL-colesterol correlaciona-se inversamente com a incidência de doença cardiovascular, sendo um fator de risco independente para o desenvolvimento de DCV (Gordon et al., 1977, 1989; Genest et al., 1991; Manninen et al., 1992). Na dislipidemia diabética não apenas a concentração da HDL-colesterol está reduzida, mas também a sua composição está alterada.

O HDL-colesterol está diminuído no DM2, em parte, devido ao aumento dos triglicerídeos. A hipertrigliceridemia favorece a transferência, mediada pela CETP, de éster de colesterol da HDL para lipoproteínas ricas em triglicérides, como os quilomícrons e VLDL, e de triglicerídeos dessas lipoproteínas para a HDL. Com isso há a formação de uma HDL rica em triglicerídeos, que se torna suscetível à ação da lipase hepática (HL), enzima responsável pela hidrólise de triglicerídeos e cuja expressão está aumentada no DM2. Desse processo resulta uma HDL pequena e densa, que se dissocia da apoA-I e é degradada nas células tubulares renais, consequentemente, diminuindo sua concentração (Ginsberg, 1991, 1996; Goldberg, 2001; Taskinen, 2003). O aumento da ação da CETP, nesse contexto, parece estar relacionado com a hipertrigliceridemia e ser independente da ação ou concentração da insulina (Maclean et al., 2001; Dullaart et al., 2004).

No DM2, as concentrações diminuídas de HDL se refletem em decréscimo nas subfrações da HDL constituídas por partículas maiores, principalmente a HDL2. Não apenas a concentração do HDL-colesterol está alterada no DM2, mas também aspectos funcionais e metabólicos da HDL que são importantes para sua ação antiaterogênica. Essas alterações funcionais da HDL no DM2 devem-se, em parte, a alterações na própria composição da HDL, relacionadas aos efeitos da doença sobre enzimas, cofatores enzimáticos, receptores e outras proteínas envolvidas no metabolismo desta lipoproteína (Goldberg, 2001; Taskinen 2003).

O DM2 está associado com o aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) na HDL (Sorrentino et al., 2010). Zheng et al. (2004) demonstraram que a

MPO catalisa a oxidação da HDL e da apoA-I, resultando na inibição seletiva do efluxo de colesterol dependente do ABCA1. Além disso, a LDL minimamente oxidada, que está aumentada no DM2, tem demonstrado ser um potente inibidor da atividade de LCAT (Bielicki et al., 1996). Além da sua importância no transporte reverso de colesterol, a LCAT também tem atividade antioxidante ao promover a hidrolisação do fator ativado de plaqueta (PAF) e das fosfatidilcolinas truncadas, gerados durante a oxidação das lipoproteínas, resultando na supressão dos seus efeitos proinflamatórios e citotóxicos (Liu; Huang, 2001). A LCAT também tem impacto positivo sobre a concentração das enzimas antioxidantes paraoxonase-1 (PON1) e PAF-acetilhidrolase (Forte et al., 1999). Isto sugere que a redução da atividade de LCAT no DM2 não só pode afetar o transporte reverso de colesterol, mas também conduzir a uma diminuição da capacidade antioxidante da HDL.

Produtos finais de glicação avançada (AGE)-modificações irreversíveis de proteínas ou lipídios não enzimaticamente glicosados e oxidados após o contato com aldoses- estão elevados no diabetes. A glicação não enzimática da HDL a torna altamente suscetível a oxidação. A HDL glicada-oxidada perde o seu efeito ateroprotetor contra a peroxidação lipídica e contra os efeitos tóxicos da LDL oxidada, além de promover diretamente danos na célula endotelial (Hoang et al., 2007). A glicação da apoA-I promove alterações no seu grupo carbonila, o que diminui a estabilidade da interação lipídio-apolipoproteína, afetando a coesão estrutural das partículas de HDL (Calvo et al., 1988). A glicação da apoA-1 também prejudica a conexão do ABCA-I e SR-BI com a HDL, diminuindo o efluxo de colesterol para esta lipoproteína (Hoang et al., 2007). Ainda, no DM2 há uma diminuição da expressão do ABCA1, que parece estar relacionada com o aumento dos AGEs e ácidos graxos, hiperinsulinemia e com a própria inflamação gerada pelo DM2 (Uehara et al., 2002; McGillicuddy et al., 2005; Passarelli et al., 2005; Iborra et al., 2011; Park et al., 2012). O excesso de AGEs também leva a diminuição da expressão e função do ABCG1 (Ohgami et al., 2003; Mauldin et al., 2006, 2008; Gantman et al., 2010; Iborra et al., 2011).

Todas essas alterações levam a alterações na concentração e composição da HDL, reduzindo o importante papel da HDL no transporte reverso do colesterol,

influenciando de maneira negativa a homeostase do colesterol e favorecendo a aterogênese.

1.6. Alterações na LDL provocadas pelo *diabetes mellitus* tipo 2

Os níveis plasmáticos do LDL-colesterol são, geralmente, similares entre diabéticos e não diabéticos. Apesar de não haver alterações quantitativas nas concentrações do LDL-colesterol no DM2, o acúmulo de VLDL, refletido em hipertrigliceridemia, provoca alterações estruturais na partícula de LDL, levando ao aumento da subfração pequena e densa da LDL (Goldberg, 2001; Taskinen, 2003).

As partículas de LDL são o produto final da degradação da VLDL e são compostas por uma grande quantidade de ésteres de colesterol no seu núcleo e têm, essencialmente, a apoB-100 na sua superfície. A maioria das LDLs são removidas do plasma pela sua interação com o receptor de LDL, presente principalmente no fígado, que é o principal responsável pela regulação dos seus níveis plasmáticos (Ginsberg, 1991).

A LDL e a VLDL estão relacionadas com a disfunção das células β pancreáticas. Roehrich et al. (2003) foram os primeiros a demonstrar que as células β pancreáticas expressam receptores de LDL e VLDL, podendo se ligar e internalizar essas lipoproteínas. Além disso, eles mostraram que as partículas de VLDL e LDL reduziram a expressão de insulina e a proliferação das células β pancreáticas, além de ter uma relação direta com o aumento da taxa de apoptose dessas células.

Uma característica comum da dislipidemia diabética é a presença de uma LDL pequena e densa, também chamada de *padrão B+*. O acúmulo de VLDL, refletido em hipertrigliceridemia, provoca um aumento da transferência de triglicerídeos da VLDL para a LDL e de colesterol da LDL para a VLDL, mediado pela CETP, assim como ocorre com a HDL. Essa partícula de LDL rica em triglicerídeos é mais suscetível à ação da lipase hepática, que hidrolisa os triglicerídeos dessa lipoproteína, levando à formação da subfração pequena e densa

da LDL. Essa subfração da LDL penetra mais facilmente na íntima das artérias, além de oxidar-se com maior facilidade. A LDL pequena e densa é, portanto, mais aterogênica que suas outras subfrações, como a LDL grande e flutuante, chamada de padrão A+ (Taskinen, 2003).

Estudos também sugerem que pacientes diabéticos tendem a secretar partículas de VLDL grandes e flutuantes, que, devido a sua grande quantidade de triglicerídeos, durante a sua degradação são mais propensas a formarem LDL ricas em triglicerídeos, os quais serão hidrolisados, também gerando LDL pequenas e densas (Krauss; Siri, 2004).

A LDL pequena e densa é mais suscetível à glicação do que as LDLs maiores e menos densas. A glicação da LDL é um processo também comum no DM2, gerando alterações estruturais dessa lipoproteína e prolongando a sua meia-vida. Neste processo, modificações dos resíduos de lisina e arginina da apoB fazem com que a LDL formada não seja reconhecida pelos receptores clássicos da LDL, mas sim por receptores scavenger+ (removedores) de macrófagos (Soran, Durrington, 2011; Younis et al., 2013).

A LDL pequena e densa e a LDL glicosilada, são mais eletronegativas e, assim, mais suscetíveis à oxidação. A LDL oxidada é uma partícula imunogênica, sofrendo ação de auto-anticorpos e produzindo imunocomplexos. Essas LDLs são internalizadas nos macrófagos, que têm mais afinidade por essas partículas do que pelas não oxidadas, induzindo a formação de células espumosas, características da lesão aterosclerótica precoce. A LDL oxidada também estimula a adesão, ativação e migração dos monócitos, que junto com a célula espumosa são responsáveis pela intensa atividade inflamatória no subendotélio dos vasos sanguíneos, levando à formação da placa aterosclerótica (Mitra et al., 2011; Bardini et al., 2012).

A expressão dos receptores da LDL (LDLR) é regulada pela insulina. Sendo assim, pacientes com DM2 e significativa deficiência insulínica possuem uma menor expressão de LDLR e menor captação de LDL pelo fígado, havendo, assim, redução do clearance+ da LDL (Duvillard et al., 2003). Além disso, os níveis de colesterol contido em cada partícula de LDL são menores na subfração pequena e densa, como explicado acima, mas o número absoluto dessa subfração está aumentado em pacientes diabéticos (Taskinen, 2003). Sabendo-se, então, que todas as

lipoproteínas contendo apoB, exceto os quilomícrons nascentes, são pró-aterogênicos, a avaliação da concentração da apolipoproteína B parece ser mais crítica em termos de risco aterogênico, do que a simples avaliação dos níveis de colesterol.

1.7. A transferência de lípides para HDL

Os primeiros estudos da transferência de fosfolipídios e colesterol entre as lipoproteínas foram realizadas por Hagerman e Gould em 1951, durante investigações de transferências lipídicas entre membranas. As transferências de ésteres de colesterol da HDL para a LDL foi primeiramente documentada por Rehnborg e Nichols, em 1964. Zilversmith et al. (1975) reportaram a natureza das proteínas nas transferências lipídicas, descrevendo uma glicoproteína de alto peso molecular que promovia a transferência de ésteres de colesterol entre todas as classes de lipoproteínas no plasma humano. Em 1980, Ihm et al. descobriram uma outra glicoproteína que mediava a transferência de fosfolipídios entre as lipoproteínas. Atualmente, essas proteínas envolvidas no transporte de lipídios são conhecidas como CETP e PLTP (descritas em tópico anterior).

A HDL foi primeiramente caracterizada usando a ultracentrifugação do plasma para separação das lipoproteínas de diferentes densidades, em 1950. Na década de 1970 vários estudos foram publicados mostrando uma relação inversa entre o HDL-colesterol plasmático e a DCV, o que depois foi confirmado por numerosos estudos ao redor do mundo. No entanto, o HDL-colesterol só foi reconhecido como um fator de risco independente para DAC na década de 1980 e desde então colocado como um dos poucos fatores de riscos ~~6~~adicionais+ usados para avaliar o risco cardiovascular na população (Kingwell et al., 2014). Apesar de haver uma forte correlação entre o HDL-colesterol e a incidência de DCV, a simples dosagem do HDL-colesterol não é suficiente para estabelecer a grande variedade de funções antiaterogênicas da HDL. Sabe-se que altas concentrações de partículas da HDL na circulação aumentam a extração de colesterol das células periféricas e a sua

esterificação. Altas concentrações da HDL também dispõem um maior campo para várias proteínas exercerem suas funções protetoras relacionadas com essa lipoproteína. Além disso, muitos outros fatores intervenientes podem alterar o paradigma da concentração do HDL-colesterol.

O fato das transferências lipídicas desempenharem um papel fundamental na composição, concentração, metabolismo e, conseqüentemente, no perfil das subclasses da HDL no plasma, o que pode afetar o seu papel ateroprotetor, sugere a oportunidade de estabelecer novos marcadores da função da HDL, observando sua participação em diversos processos patológicos.

O fenômeno de transferências lipídicas entre as diferentes classes de lipoproteínas tem sido extensivamente explorado e vários de seus aspectos já foram estudados em diversas condições clínicas. No entanto, uma visão mais abrangente das trocas de lipídios envolvendo a HDL está faltando e pode ser de grande interesse. A HDL é o principal local de esterificação do colesterol no plasma e o principal condutor do transporte reverso de colesterol, que é, essencialmente, um fenômeno de transferência de lipídios.

Uma abordagem da transferência de lipídios para HDL mostra-se necessária; com o objetivo de estudar sistematicamente o fenômeno em grandes populações. Como requisito, a nova abordagem deve ser prática e padronizada o suficiente para adequar-se como um procedimento de rotina em um laboratório. Uma avaliação integrada das principais espécies de lipídios envolvidos nas transferências seria também de grande interesse, uma vez que a troca de uma determinada espécie de lipídio muitas vezes ocorre em conjunto com os outros, sendo que todas essas trocas de lipídios influenciam o metabolismo e a função da HDL. Com o objetivo de atingir essas metas, foi desenvolvido um ensaio *in vitro* que tenta cumprir esses requisitos e está atualmente sendo estudado quanto às relações clínicas decorrentes da mensuração dos parâmetros de transferência obtidos neste ensaio.

O ensaio consiste na incubação de uma nanoemulsão lipídica doadora com o plasma total. A nanoemulsão possui nanopartículas lipídicas artificiais que mimetizam a LDL, chamadas de LDE (Figura 2), e é preparada a partir da mistura de fosfatidilcolina e oleato de colesterol, com pequenas quantidades de trioleína e colesterol não esterificado. Após a incubação da nanoemulsão, com os lipídios

marcados radioativamente, com o plasma do indivíduo a ser estudado, em um banho de agitação durante 1 h a 37 °C, as lipoproteínas contendo apoB e a nanoemulsão são precipitadas. A radioatividade do sobrenadante (HDL) é então medida e os dados são calculados como porcentagem da radioatividade dos lipídios transferidos para HDL. Este ensaio será explicado com maiores detalhes posteriormente no tópico de Métodos.

Figura 2. Comparação da lipoproteína de densidade baixa (LDL) com a nanopartícula lipídica artificial (LDE).

Nas amostras de plasma a maioria dos componentes que fisiologicamente influenciam as transferências estão presentes, como o CETP, PLTP e LCAT. Os dados gerados pelo ensaio de transferência lipídica para HDL são dependentes da ação das proteínas de transferência, LCAT, composição e concentração da HDL e das lipoproteínas que contêm apoB. O método de ensaio de transferência foi validado para a precisão e reprodutibilidade. As amostras de plasma são armazenadas a -80 °C e podem ser utilizadas neste ensaio por até 1 ano sem alterações nos resultados.

Estudos realizados até hoje com este ensaio mostram uma diminuição da transferência de colesterol não esterificado para HDL na presença de DAC. Isto foi encontrado em dois estudos usando pacientes não diabéticos e em um estudo usando pacientes com DM2. Os dois estudos sem pacientes diabéticos compararam: pacientes com DAC precoce *versus* pacientes sem DAC (Azevedo et al., 2011); e pacientes idosos com DAC *versus* pacientes idosos sem DAC (Couto et al., 2007). O estudo usando pacientes diabéticos comparou pacientes com DM2 e DAC *versus* pacientes com DM2 sem DAC (Sprandel et al., 2012). Na DAC em pacientes não diabéticos, a transferência de triglicerídeos também foi diminuída em relação aos controles (Couto et al., 2007; Azevedo et al., 2011). No entanto, em diabéticos tipo 2 com DAC, apesar de não haver diferença na transferência de triglicérides, quando comparada com os diabéticos tipo 2 sem DAC, houve também diminuição da transferência de colesterol esterificado para HDL nos pacientes com DM2 e DAC (Sprandel et al., 2012). Em estudo comparando pacientes diabéticos tipo 2 com pacientes sem diabetes, foi observado aumento da transferência de triglicerídeos e ésteres de colesterol nos pacientes com DM2 (Oliveira et al., 2012). Também em outro estado relacionado com a resistência insulínica, a Síndrome do Ovário Policístico, foi observado uma correlação positiva entre a transferência de triglicerídeos para HDL e o Modelo de Avaliação da Homeostase de Resistência à Insulina (HOMA-IR) (Rocha et al., 2010). Já em outro estudo observou-se que pacientes com síndrome metabólica, uma importante condição de resistência insulínica, apresentaram uma menor transferência de colesterol esterificado e não esterificado e triglicerídeos, quando comparados com pacientes que não preenchem critérios para síndrome metabólica (Casella-Filho et al., 2011).

Portanto, o objetivo desse novo método é de revelar mudanças no perfil de transferência de lipídios para HDL, o que pode fornecer novos marcadores de doença ou pode ser utilizado para avaliação de drogas, de estilo de vida e de nutrição e seus efeitos sobre a função de HDL; ou, eventualmente, ajudar a elaborar novas ferramentas terapêuticas e de diagnóstico.

Apesar do metabolismo de lípidos no DM2 e sua relação com a aterosclerose ser complexo, com muitos aspectos ainda por serem desvendados, sabe-se que a dislipidemia do DM2 é consequência direta da resistência insulínica e da hiperglicemia. Pode-se esperar, assim, que um melhor controle glicêmico possa *per se* favorecer uma melhor regulação do metabolismo lipídico intravascular. Assim, com a oportunidade de usar esse novo método de ensaio de transferência lipídica para HDL com o plasma de pacientes com DM2, podemos analisar se o controle glicêmico no DM2 teria alguma influência na transferência de lipídios para HDL, podendo contribuir para um perfil mais ou menos aterogênico da HDL nesses pacientes. Desta maneira, procuramos de alguma forma colaborar com a controvérsia do impacto do controle glicêmico na DAC no paciente com DM2.

2. OBJETIVOS

2.1. Primário:

- Investigar, em pacientes com DM2, como o controle glicêmico está relacionado com o ensaio *in vitro* das transferências simultâneas de lípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para a HDL.

2.2. Secundários:

- Investigar, em pacientes com DM2, a relação do controle glicêmico com outros parâmetros do status lipídico: concentração plasmática de colesterol total e frações, colesterol não esterificado, triglicérides, ácidos graxos livres, apolipoproteínas A-I e B, concentração e atividade de CETP, atividade de LCAT e tamanho e composição lipídica da HDL;

- Avaliar se o melhor controle glicêmico resulta em perfil lipídico plasmático mais adequado nos pacientes com DM2, segundo as metas lipídicas estabelecidas pela *American Diabetes Association* (ADA);

- Avaliar pacientes com maiores e menores níveis de ácidos graxos livres quanto aos parâmetros lipídicos mencionados acima;

- Analisar se o tratamento com insulina influencia os parâmetros de metabolismo lipídico mencionados acima.

3. MÉTODOS

3.1. Casuística

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsink. De acordo com as normas do HC-FMUSP, o termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os pacientes ou responsáveis antes que os procedimentos de pesquisa fossem iniciados. O protocolo de estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição (número de registro da pesquisa na CAPPesq: 9797).

Foram selecionados 143 pacientes com DM2 no Ambulatório do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes eram participantes do estudo MASS (Medicine, Angioplasty and Surgery Study), projeto criado em 1984 pelo Prof. Dr. Whady A. Hueb para estudo de seguimento clínico em longo prazo de pacientes portadores de obstruções coronarianas. Todos os pacientes do estudo foram submetidos à cineangiocoronariografia.

Os critérios de inclusão foram: pacientes de ambos os sexos, de idade entre 40 e 85 anos, com ou sem doença cardiovascular, com DM2 diagnosticada pela medida de glicemia ou hemoglobina glicada (HbA_{1c}), de acordo com os critérios da *American Diabetes Association* (ADA).

Os critérios de exclusão foram: hipertensão grave definida como pressão arterial $\geq 180/110$ mmHg, de acordo com os critérios do *World Joint International Committee*; trigliceridemia > 400 mg/dl; insuficiência renal (creatinina plasmática acima dos valores de referência); doença hepática (atividade da aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, gama glutamiltransferase e fosfatase alcalina acima dos valores de referência); doenças da tireóide; história prévia de acidente vascular cerebral hemorrágico; hemorragia recente (menos de 6 meses); trombocitopenia; punção de medula espinhal recente (menos de 6 meses); e cirurgia recente (menos de 6 meses).

Os pacientes participantes foram alocados em dois grupos de estudo, de acordo com o valor de corte de HbA_{1c} definido como meta (≤6,5%) pela *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) e pela *International Diabetes Federation* (IDF):

- 62 pacientes com HbA_{1c} ≤6,5%.
- 81 pacientes com HbA_{1c} > 6,5%.

A meta lipídica de colesterol HDL, LDL e não-HDL foi também avaliada: comparação da porcentagem de pacientes que atingiram essas metas nos 2 grupos citados acima.

Dois grupos extremos: HbA_{1c} ≤6% (n=37) vs HbA_{1c} ≥8% (n=36), foram também analisados quanto aos parâmetros lipídicos propostos.

Foram também estudados 2 grupos quanto ao uso de insulina: pacientes que estavam em uso de insulina (n=42) vs pacientes que não estavam em uso de insulina (n=101), e comparados os seus parâmetros glicêmicos e lipídicos medidos neste estudo.

Também foram analisados 2 grupos, separados pela mediana, quanto aos níveis de ácidos graxos livres: 72 pacientes com AGL ≤0,45 mEq/l e 71 pacientes com AGL > 0,45 mEq/l.

Análise de correlação foi feita entre a HbA_{1c} e todos os parâmetros laboratoriais realizados neste estudo.

Os pacientes que estavam em uso de drogas hipolipemiantes tiveram essas medicações suspensas por pelo menos 40 dias antes da coleta das amostras de sangue.

Foram registrados o peso, índice de massa corpórea (IMC), circunferência abdominal, tabagismo, tempo de diabetes, uso de hipoglicemiantes orais, uso de insulina e os parâmetros bioquímicos descritos abaixo.

3.2. Análise laboratorial

As amostras de sangue foram coletadas após 12 horas de jejum e colocadas em freezer a -80 °C. Todas as análises séricas/plasmáticas foram realizadas no máximo 1 ano após o seu congelamento.

A HbA_{1c} foi medida por método imunoturbidimétrico (certificada pela National Glycohemoglobin Standardization Program), que utiliza a ligação de antígeno e anticorpo para determinar diretamente a concentração da HbA_{1c} no sangue total. A concentração da glicose plasmática foi medida por método colorimétrico enzimático (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), através de reação catalisada pela hexoquinase.

A determinação dos triglicerídeos foi feita pelo método colorimétrico enzimático (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), onde a lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos, liberando glicerol; após várias reações enzimáticas, há a formação da quinoneína, que é o indicador colorimétrico gerado. O colesterol total também foi determinado por método colorimétrico enzimático (Labtest, Lagoa Santa, Brasil), onde os ésteres de colesterol são hidrolisados a colesterol não esterificado e ácidos graxos; o colesterol não esterificado sofre várias reações enzimáticas, gerando como produto final a antipirilquinonimina, a qual serve como indicador colorimétrico. O HDL-colesterol foi determinado pelo método colorimétrico enzimático do colesterol no sobrenadante após a precipitação química das lipoproteínas que contêm apolipoproteína B, utilizando-se reagente precipitante constituído por cloreto de magnésio e ácido fosfotungstico (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). A quantidade de colesterol LDL foi calculada pela fórmula Friedewald, sendo a diferença entre o colesterol total e a soma de colesterol HDL e do colesterol VLDL. O colesterol VLDL foi calculado dividindo os níveis de triglicérides no plasma por 5. O colesterol não-HDL foi calculado como o valor do colesterol total menos o do HDL-colesterol.

O colesterol não esterificado foi determinado pelo método colorimétrico enzimático (Wako Chemicals, Richmond, EUA), onde a reação 3,5-dimetoxi-N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)anilina sódica com a 4-aminoantipirina provoca uma condensação oxidativa na presença da peroxidase, gerando um produto que é quantificado por colorimetria. Os ácidos graxos livres foram também determinados

pelo método colorimétrico enzimático (Wako Chemicals, Richmond, EUA), baseando-se na acilação da coenzima A (CoA) pelos ácidos graxos, na presença da acil-CoA sintetase; a acil-CoA é peroxidada, dando origem ao peróxido de hidrogênio que favorece a reação N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-m-toluidina com a 4-aminoantipirina, formando um corante que mantém relação direta com a quantidade de AGL.

As concentrações plasmáticas das apolipoproteínas A-I e B foram determinadas pelo método imunoturbidimétrico (Roche, Mannheim, Alemanha). Nesse método os anticorpos anti-apolipoproteína reagem com o antígeno na amostra, formando complexos antígenos-anticorpos; após a aglutinação estes podem ser determinados por turbidimetria.

A concentração de CETP foi estabelecida pelo imunoensaio CETP ELISA (ALPCO Diagnostics, New Hampshire, EUA), onde a CETP presente no plasma reage com dois anticorpos monoclonais e a concentração da proteína é proporcional à absorbância da amostra. A atividade de CETP foi determinada por método fluorimétrico: esse método utiliza uma molécula doadora contendo um lipídio neutro fluorescente, que é transferido a uma molécula aceptora na presença de CETP; a transferência mediada pela CETP do lipídio neutro fluorescente para a molécula receptora resulta em um aumento na fluorescência (Abcam, Cambridge, Reino Unido). A atividade de LCAT foi definida por método imunofluorimétrico (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), utilizando espectrofotometria de fluorescência para obter resultados quantitativos à técnica fluorescente para anticorpo.

Para determinação das concentrações dos lípidos da HDL as partículas de HDL foram separadas por precipitação das lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextrano 0,2%/ MgCl₂ 3M). A mistura foi agitada por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. No sobrenadante foi determinada a concentração de colesterol não esterificado e fosfolípidos pelo método colorimétrico enzimático da Wako Chemicals (Richmond, EUA). Os triglicerídeos da HDL foram determinados pelo método enzimático Triglicérides GPO-ANA+ (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) através do sistema de medida colorimétrica. A concentração de colesterol esterificado foi obtida pela diferença entre a concentração de colesterol total e colesterol não esterificado da fração HDL multiplicado por 1,67.

O tamanho das lipoproteínas foi medido por espalhamento de luz (*light scattering*), utilizando o equipamento *Laser Light Scattering* (ZetaPALMS, Brookhaven Instruments Corporation, EUA). A HDL foi separada por precipitação química das partículas lipoprotéicas que contém apo B, através da adição de 500 μ L polietilenoglicol 8000 (200g/L). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em solução de NaCl (0,15M) e, em seguida, passado em filtro Millipore 0,22 μ m de diâmetro. A medida do diâmetro da HDL foi medido por espalhamento de luz, coletado em um ângulo de 90° e 658 nm e expresso pelos resultados médios obtidos em 5 corridas de 1 minuto e 30 segundos cada (Lima; Maranhao, 2004).

3.3. Preparo da nanoemulsão lipídica artificial

A nanoemulsão lipídica artificial possui nanopartículas que mimetizam a LDL, chamadas de LDE. Foi preparada segundo técnica descrita por MARANHÃO et al. (1993). Em um frasco foram pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio: metanol (2:1). Posteriormente, foram adicionados à mistura de lípidos os isótopos ^3H -éster de colesterol e ^{14}C -fosfatidilcolina ou ^3H -triglicerídeos e ^{14}C -colesterol não esterificado. Os solventes residuais foram, então, evaporados da mistura sob fluxo de nitrogênio e dissecação a vácuo por 16 horas a 4°C. Após a adição de 10 mL de tampão tris-HCl 0,01M, pH 8, a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultrassônica, utilizando-se equipamento Branson modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil), potência 125 watts, durante 3 horas sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55°C. Para obtenção da nanoemulsão lipídica artificial na faixa de diâmetro, tamanho e densidade desejados, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (ultracentrífuga, rotor Beckman SW-41). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a 200.000 x g por 30 minutos a 4°C, foi removido por aspiração (1 mL) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr), ajustando a densidade para 1,21 g/mL. Após a segunda centrifugação (200.000 x g

por 2 horas a 4°C), a nanoemulsão lipídica artificial, medindo em torno de 30 a 60 nm, foi recuperada na parte superior do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão tris-HCl 0,01M, pH 8. Finalmente, a emulsão foi esterilizada por filtração em membrana Milipore de 0,22 µm de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até 15 dias.

3.4. Ensaio de transferência dos 4 principais lípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para a HDL

O ensaio de transferência de lípidos foi realizado segundo descrito por Lo Prete et al. (2009) . Figura 3. As amostras da nanoemulsão lipídica foram preparadas 7 dias antes da realização do ensaio. Todas as amostras de plasma dos pacientes estavam armazenadas a -80 °C, sendo que as amostras mais antigas tinham sido coletadas 11 meses antes da realização do ensaio. Este ensaio foi realizado em uma só vez com todas as amostras de plasma dos pacientes.

Para a execução do ensaio, a fim de evitar a demora na separação de lipídios antes da contagem radioativa, dois conjuntos de nanoemulsões marcadas são produzidos, por exemplo, um com ³H-trioleína e ¹⁴C-colesterol não esterificado e o outro com ³H-oleato de colesterol e ¹⁴C-fosfatidilcolina.

Uma alíquota de 200 µL de plasma dos participantes foi incubada com 50 µL da nanoemulsão marcada com os lípidos radioativos a 37°C, sob agitação durante 1 hora. Após esse procedimento, foram adicionados 250 µL de reagente precipitante (0,2% dextrano / 0,3 mol/L MgCl₂) seguido de agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos, a 3000 rotações por minuto. O infranadante, contendo a nanoemulsão e as lipoproteínas plasmáticas que contém apoB, foi desprezado. O sobrenadante, contendo a HDL, foi submetido à contagem da radioatividade presente, que corresponde à transferência dos lípidos radioativos da nanoemulsão para as partículas de HDL do indivíduo. Foi calculada a porcentagem de transferência de cada um dos lípidos radioativos, considerando como 100% a radioatividade total utilizada na incubação. No final, foi efetuada a correção dos valores pelo HDL-colesterol do indivíduo e os resultados expressos em porcentagem de lípidos transferidos por mL de plasma por mg/dL de HDL-colesterol.

Figura 3. Ensaio de transferência lipídica para HDL *in vitro*. O ensaio é realizado utilizando uma nanopartícula doadora semelhante à estrutura da LDL. Dois conjuntos de nanoemulsões lipídicas são preparados, um com ^3H -trioleína e ^{14}C -colesterol não esterificado e o outro com ^3H -oleato de colesterol e ^{14}C -fosfatidilcolina. O plasma é incubado com a nanoemulsão marcada radioativamente, durante 1 hora a 37 °C, num agitador. Após a incubação as lipoproteínas contendo apoB e a nanoemulsão são quimicamente precipitadas. A radioatividade do sobrenadante que contém a fração de HDL é medida num analisador de cintilação líquida. Os dados são expressos como porcentagem (%) da radioatividade total incubada medida no sobrenadante (HDL). Abreviaturas: HDL, lipoproteína de densidade alta; LDL, lipoproteína de densidade baixa; VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; ^{14}C , carbono 14; ^3H , trítio; CE, colesterol esterificado; TG, triglicerídeos; PL, fosfolipídios; UC, colesterol não esterificado.

3.5. Análises estatísticas

Todos os dados obtidos nos grupos estudados foram comparados utilizando testes estatísticos apropriados, dependendo da sua distribuição. As médias e seus desvios-padrão foram comparados utilizando o teste t de Student não pareado e a correção de Welch foi aplicada quando os grupos não assumiram variâncias iguais. O teste de Fisher foi utilizado para comparar as porcentagens, analisando as suas tabelas de contingência. As análises de correlação simples entre variáveis foram realizadas através do teste de coeficiente de correlação linear de Pearson (r).

Foi realizada análise de regressão linear múltipla para avaliar a contribuição independente do controle glicêmico e dos parâmetros clínicos (idade, sexo, tempo de diabetes, circunferência abdominal, uso de insulina, tabagismo, hipertensão arterial e doença arterial coronariana) na concentração de triglicérides e colesterol não esterificado no plasma. O modelo foi baseado nas variáveis clínicas e físicas que tiveram correlação significativa ($p < 0,05$) com os triglicerídeos e com o colesterol não esterificado na análise bivariada.

Em todas as análises efetuadas, os parâmetros analisados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

Foi utilizado o software GraphPad InStat versão 3.10 para estas análises.

4. RESULTADOS

Conforme mostrado na Tabela 3, os grupos com HbA_{1c} ≤ 6,5% e com HbA_{1c} > 6,5% não diferiram em relação à idade, gênero e IMC. O grupo HbA_{1c} > 6,5% apresentou uma tendência não significativa para maior circunferência abdominal em relação ao grupo HbA_{1c} ≤ 6,5% (107 ± 14 vs 103 ± 13; p = 0,083). Os dois grupos também foram similares quanto à porcentagem de participantes tabagistas, com hipertensão arterial e com doença arterial coronariana. No entanto, a proporção de pacientes sob tratamento com insulina foi maior no grupo HbA_{1c} > 6,5% do que no grupo HbA_{1c} ≤ 6,5% (43% vs 11%; p < 0,0001). Além disso, o tempo de diagnóstico de diabetes também foi maior no grupo HbA_{1c} > 6,5% em relação ao grupo HbA_{1c} ≤ 6,5% (10,7 ± 7,9 vs 6,3 ± 5,4 anos; p < 0,001).

Tabela 3 - Características clínicas e físicas dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA_{1c} ≤ 6,5% e com HbA_{1c} > 6,5%.

Parâmetros	HbA _{1c} ≤ 6,5%	HbA _{1c} > 6,5%	p
Números de pacientes (M/F)	62 (34/28)	81 (41/40)	
Idade (anos)	64 ± 9	62 ± 8	0,163
Tempo de diabetes (anos)	6,3 ± 5,4	10,7 ± 7,9	< 0,001
IMC (kg/m ²)	30,1 ± 5,4	31,3 ± 7,5	0,288
Circunferência abdominal (cm)	103 ± 13	107 ± 14	0,083
Uso de insulina (%)	11%	43%	< 0,0001
Tabagismo (%)	6%	12%	0,272
Hipertensão arterial (%)	97%	89%	0,114
Doença arterial coronariana (%)	55%	53%	0,867

Dados expressos como média ± desvio padrão ou porcentagem (%). HbA_{1c}, hemoglobina glicada; M, sexo masculino; F, sexo feminino; IMC, índice de massa corpórea.

A Tabela 4 mostra os dados bioquímicos séricos dos pacientes com HBA_{1c} m 6,5% e com HBA_{1c} > 6,5%. Os níveis de hemoglobina glicada foram 30% maiores ($8,2 \pm 1,6$ vs $5,9 \pm 0,3\%$; $p < 0,0001$) e a glicemia de jejum 20% maior (141 ± 39 vs 111 ± 20 mg/dl; $p < 0,0001$) no grupo HBA_{1c} > 6,5% do que no grupo HBA_{1c} m 6,5%, indicando pior controle glicêmico nos pacientes do grupo HBA_{1c} > 6,5%.

O colesterol total, LDL, não-HDL e HDL foi similar em ambos os grupos. A concentração sérica do colesterol livre foi 7% maior no grupo HBA_{1c} > 6,5% do que no grupo HBA_{1c} m 6,5% ($36,4 \pm 7,6$ vs $33,7 \pm 5,7$ mg/dL; $p = 0,021$). A razão colesterol total/colesterol não esterificado mostrou-se igual nos dois grupos (Tabela 4).

A concentração de triglicerídeos foi aproximadamente 30% maior nos pacientes do grupo HBA_{1c} > 6,5% do que nos pacientes do HBA_{1c} m 6,5% (205 ± 115 vs 140 ± 54 mg/dl; $p < 0,0001$), porém a concentração de ácidos graxos livres estava igual em ambos os grupos. A razão triglicerídeos/HDL-colesterol, que tem valor preditivo na doença cardiovascular (Gaziano et al., 1997), foi maior no grupo HBA_{1c} > 6,5% comparado ao grupo HBA_{1c} m 6,5% ($5,91 \pm 4,85$ vs $4,36 \pm 4,32$; $p=0,049$), como pode ser visto na Tabela 4.

Houve também uma tendência não significativa para o aumento dos níveis de apolipoproteína B no grupo HBA_{1c} > 6,5% em relação ao grupo HBA_{1c} m 6,5% (103 ± 20 vs 97 ± 20 mg/dL; $p = 0,078$). Apolipoproteína A1, atividade de LCAT e atividade e concentração de CETP foram similares em ambos os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 É Dados laboratoriais dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA_{1c} ® 6,5% e com HbA_{1c} > 6,5%.

Parâmetros	HbA _{1c} m6,5%	HbA _{1c} > 6,5%	p
Glicemia de jejum (mg/dL)	111 ± 20	141 ± 39	< 0,0001
HbA _{1c} %	5,9 ± 0,3	8,2 ± 1,6	< 0,0001
Colesterol (mg/dL)			
Total	204 ± 34	211 ± 48	0,331
LDL-c	139 ± 32	135 ± 44	0,547
HDL-c	38 ± 9	38 ± 10	> 0,999
Não-HDL-c	166 ± 34	172 ± 50	0,418
CNE (mg/dl)	33,7 ± 5,7	36,4 ± 7,6	0,021
Triglicerídeos (mg/dL)	140 ± 54	205 ± 115	< 0,0001
Apolipoproteínas (mg/dL)			
B	97 ± 20	103 ± 20	0,078
A-I	133 ± 22	137 ± 28	0,356
Ácidos graxos livres (mEq/L)	0,46 ± 0,22	0,50 ± 0,20	0,258
CETP (µg/mL)	2,2 ± 0,9	2,4 ± 1,2	0,275
Atividade de CETP (pmol/µL.h)	67,8 ± 12,2	71,2 ± 15,9	0,164
Atividade de LCAT (470/390nm)	1,34 ± 0,12	1,33 ± 0,10	0,588
Colesterol total/CNE	6,15 ± 0,99	5,90 ± 1,08	0,157
Triglicerídeos/HDL-colesterol	4,36 ± 4,32	5,91 ± 4,85	0,049

Dados expressos como média ± desvio padrão. HbA_{1c}, hemoglobina glicada; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; CNE, colesterol não esterificado; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferase.

A Tabela 5 mostra que, em relação ao diâmetro da partícula de HDL, não houve diferença entre os grupos HbA_{1c} m6,5% e HbA_{1c} > 6,5%. Na mesma tabela pode ser visto a composição lipídica da HDL nesses dois grupos. A proporção de colesterol não esterificado e esterificado e fosfolipídios na HDL não diferiram entre os dois grupos. No entanto, a porcentagem de triglicérides na HDL do grupo HbA_{1c} > 6,5% foi maior do que no grupo HbA_{1c} m6,5% (9,2 ± 2,8 vs 8,1 ± 2,3%; p = 0,013).

Tabela 5 É Diâmetro e composição lipídica da HDL dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA_{1c} ≤6,5% e com HbA_{1c} > 6,5%.

Parâmetros	HbA _{1c} ≤6,5%	HbA _{1c} > 6,5%	p
Diâmetro da HDL (nm)	9,0 ± 0,9	8,8 ± 0,9	0,190
Composição lipídica da HDL (%)			
Colesterol não esterificado	6,1 ± 1,8	5,8 ± 1,8	0,325
Colesterol esterificado	34,7 ± 5,4	33,8 ± 7,3	0,417
Fosfolípidios	51,1 ± 5,8	51,3 ± 7,1	0,857
Triglicerídeos	8,1 ± 2,3	9,2 ± 2,8	0,013

Dados expressos como média ± desvio padrão. HbA_{1c}, hemoglobina glicada; HDL, lipoproteína de alta densidade.

Na Figura 4 mostra-se que as transferências lipídicas *in vitro* de colesterol não esterificado (8,1 ± 1,2 vs 8,0 ± 1,2%), colesterol esterificado (4,1 ± 0,6 vs 4,1 ± 0,8%), triglicerídeos (5,0 ± 0,6 vs 5,2 ± 0,7%) e fosfolípidios (26,4 ± 1,0 vs 26,4 ± 1,0%) da nanoemulsão lipídica doadora para a HDL foram similares nos grupos HbA_{1c} ≤6,5% e HbA_{1c} > 6,5%.

Figura 4. Transferências *in vitro* de colesterol não esterificado e esterificado, fosfolípidios e triglicerídeos da nanoemulsão lipídica para a HDL no grupo HbA_{1c} ≤ 6,5% (n=62) e no grupo HbA_{1c} > 6,5% (n=81).

Quando comparado 37 pacientes com HbA_{1c} ≤ 6,0% com 36 pacientes com HbA_{1c} > 8,0%, pacientes com extremos de hemoglobina glicada, as diferenças significativas nos níveis de triglicerídeos (144 ± 59 vs 202 ± 119 mg/dL; $p = 0,009$) e colesterol não esterificado ($33,1 \pm 5,4$ vs $37,3 \pm 5,9$ mg/dL; $p = 0,002$) permaneceram. À exceção dos níveis de glicemia de jejum e hemoglobina glicada, não houve diferença entre os dois grupos em relação aos outros parâmetros avaliados (Tabela 6).

Tabela 6 É Dados laboratoriais dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA_{1c} ® 6% e com HbA_{1c} 8%.

Parâmetros	HbA _{1c} m6%	HbA _{1c} 8%	p
Número de pacientes	37	36	
Glicemia de jejum (mg/dL)	109 ± 19	155 ± 45	< 0,0001
HbA _{1c} %	5,7 ± 0,2	9,7 ± 1,4	< 0,0001
Colesterol (mg/dL)			
Total	205 ± 32	220 ± 49	0,125
LDL-c	142 ± 30	143 ± 44	0,910
HDL-c	38 ± 10	39 ± 10	0,671
Não-HDL-c	167 ± 32	180 ± 52	0,201
CNE (mg/dL)	33,1 ± 5,4	37,3 ± 5,9	0,002
Triglicerídeos (mg/dL)	144 ± 59	202 ± 119	0,009
Apolipoproteínas (mg/dL)			
B	97 ± 21	104 ± 18	0,131
A-I	134 ± 22	141 ± 30	0,259
Ácidos graxos livres (mEq/L)	0,41 ± 0,17	0,48 ± 0,20	0,111
CETP (µg/mL)	2,3 ± 0,9	2,3 ± 1,1	> 0,999
Atividade de CETP (pmol/µL.h)	65,8 ± 9,1	68,8 ± 14,2	0,285
Atividade de LCAT (470/390nm)	1,32 ± 0,11	1,31 ± 0,12	0,712
Colesterol total/CNE	6,25 ± 0,88	5,93 ± 1,08	0,169
Triglicerídeos/HDL colesterol	4,88 ± 5,46	5,75 ± 4,71	0,469

Dados expressos como média ± desvio padrão. HbA_{1c}, hemoglobina glicada; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; CNE, colesterol não esterificado; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferase.

Em relação à composição lipídica da HDL nos grupos de extremos de HbA_{1c}, foi observada uma tendência, não significativa, para maior porcentagem de colesterol esterificado no grupo HbA_{1c} m6% (35,5 ± 5,6 vs 32,6 ± 8,5%; p = 0,089) e também uma tendência para maior porcentagem de triglicerídeos no grupo HbA_{1c} 8% (9,0 ± 2,9 vs 8,0 ± 2,1%; p= 0,095). Já em relação ao diâmetro e às transferências lipídicas para HDL, não houve diferença entre esses dois grupos (Tabela 7).

Tabela 7 É Diâmetro e composição lipídica da HDL e transferência lipídica para HDL dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA_{1c} ®6% e com HbA_{1c} ¯ 8%.

Parâmetros	HbA _{1c} m6%	HbA _{1c} ¯ 8%	p
Diâmetro da HDL (nm)	9,0 ± 0,9	8,9 ± 0,9	0,637
Composição lipídica da HDL (%)			
Colesterol não esterificado	6,4 ± 1,6	5,9 ± 1,9	0,228
Colesterol esterificado	35,5 ± 5,6	32,6 ± 8,5	0,089
Fosfolipídios	50,0 ± 5,8	52,6 ± 7,8	0,111
Triglicerídeos	8,0 ± 2,1	9,0 ± 2,9	0,095
Transferências lipídicas (%)			
Colesterol não esterificado	8,2 ± 1,1	8,1 ± 1,5	0,746
Colesterol esterificado	4,3 ± 0,5	4,2 ± 0,7	0,484
Fosfolipídios	26,5 ± 1,0	26,5 ± 1,1	> 0,999
Triglicerídeos	5,2 ± 0,6	5,2 ± 0,7	> 0,999

Dados expressos como média ± desvio padrão. HbA_{1c}, hemoglobina glicada; HDL, lipoproteína de alta densidade.

Quando nós comparamos os 71 pacientes com os níveis mais elevados de ácidos graxos livres (AGL > 0,45 mEq/L) com os 72 pacientes com os níveis menos elevados de ácidos graxos livres (AGL m 0,45 mEq/L), as concentrações de triglicerídeos estavam maiores no grupo com maiores níveis de AGL (196 ± 105 vs 153 ± 81 mg/dL; p = 0,007). Além disso, o grupo com maiores concentrações de AGL apresentava maior circunferência abdominal (107 ± 15 vs 102 ± 12 cm, p = 0,029), maior atividade de LCAT (1,36 ± 0,10 vs 1,29 ± 0,10 470/390nm; p < 0,0001) e maior relação triglicerídeos/HDL-colesterol (5,63 ± 4,59 vs 4,01 ± 2,75; p = 0,011). Também se verificou uma tendência, não significativa, para uma glicemia de jejum mais elevada (135 ± 36 vs 124 ± 35 mg/dL; p = 0,066) nos pacientes com maiores níveis comparado com os pacientes com menores níveis de AGL. Não houve diferença entre esses dois grupos em relação aos outros parâmetros avaliados (Tabela 8).

Tabela 8 É Dados clínicos e laboratoriais dos 72 pacientes com diabetes tipo 2 com AGL $\leq 0,45$ mEq/L e dos 71 pacientes com AGL $> 0,45$ mEq/L.

Parâmetros	AGL $\leq 0,45$	AGL $> 0,45$	p
Idade (anos)	63 $\pm$ 8	63 $\pm$ 9	$> 0,999$
Tempo de diabetes (anos)	8,3 $\pm$ 6,2	8,4 $\pm$ 7,6	0,931
IMC (kg/m ²)	29,7 $\pm$ 5,0	31,3 $\pm$ 6,8	0,111
Circunferência abdominal (cm)	102 $\pm$ 12	107 $\pm$ 15	0,029
Uso de insulina (%)	27%	26%	$> 0,999$
Tabagismo (%)	10%	13%	0,580
Hipertensão arterial (%)	92%	92%	$> 0,999$
Doença arterial coronariana (%)	57%	52%	0,718
Ácidos graxos livres (mEq/L)	0,32 $\pm$ 0,09	0,65 $\pm$ 0,17	$< 0,0001$
Glicemia de jejum (mg/dL)	124 $\pm$ 35	135 $\pm$ 36	0,066
HbA _{1c} %	7,3 $\pm$ 1,9	7,2 $\pm$ 1,6	0,734
Colesterol (mg/dL)			
Total	204 $\pm$ 44	212 $\pm$ 42	0,268
LDL-c	134 $\pm$ 39	140 $\pm$ 39	0,359
HDL-c	40 $\pm$ 8	38 $\pm$ 9	0,162
Não-HDL-c	163 $\pm$ 45	174 $\pm$ 43	0,137
CNE (mg/dL)	34,6 $\pm$ 6,7	35,7 $\pm$ 7,1	0,342
Triglicerídeos (mg/dL)	153 $\pm$ 81	196 $\pm$ 105	0,007
Apolipoproteínas (mg/dL)			
B	100 $\pm$ 21	102 $\pm$ 19	0,552
A-I	136 $\pm$ 27	134 $\pm$ 23	0,634
CETP (μ g/mL)	2,4 $\pm$ 1,1	2,2 $\pm$ 1,1	0,279
Atividade de CETP (pmol/ μ L.h)	69,7 $\pm$ 12,0	70,1 $\pm$ 16,7	0,869
Atividade de LCAT (470/390nm)	1,29 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,10	$< 0,0001$
Colesterol total/CNE	5,97 $\pm$ 1,07	6,05 $\pm$ 1,02	0,648
Triglicerídeos/HDL-colesterol	4,01 $\pm$ 2,75	5,63 $\pm$ 4,59	0,011

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. AGL, ácidos graxos livres; IMC, índice de massa corpórea; HbA_{1c}, hemoglobina glicada; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; CNE, colesterol não esterificado; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferase.

Quanto ao diâmetro da HDL e às transferências lipídicas para HDL, não houve diferença entre os grupos com maiores e menores níveis de ácidos graxos livres. A proporção de triglicerídeos na HDL foi maior no grupo com AGL > 0,45 mEq/l ($9,4 \pm 2,9$ vs $7,8 \pm 2,0\%$; $p < 0,001$) e foi observado uma tendência não significativa para uma maior porcentagem de colesterol não esterificado na HDL do grupo com AGL $\leq 0,45$ mEq/l ($6,1 \pm 2,0$ vs $5,6 \pm 1,5\%$; $p = 0,093$) (Tabela 9).

Tabela 9 É Diâmetro e composição lipídica da HDL e transferência lipídica para HDL dos 72 pacientes com diabetes tipo 2 com AGL $\leq 0,45$ mEq/L e dos 71 pacientes com AGL > 0,45 mEq/L.

Parâmetros	AGL $\leq 0,45$	AGL > 0,45	p
Diâmetro da HDL (nm)	$8,9 \pm 0,9$	$8,9 \pm 1,0$	> 0,999
Composição lipídica da HDL (%)			
Colesterol não esterificado	$6,1 \pm 2,0$	$5,6 \pm 1,5$	0,093
Colesterol esterificado	$34,6 \pm 5,5$	$34,5 \pm 7,5$	0,928
Fosfolipídios	$51,5 \pm 6,2$	$50,5 \pm 7,0$	0,367
Triglicerídeos	$7,8 \pm 2,0$	$9,4 \pm 2,9$	< 0,001
Transferências lipídicas (%)			
Colesterol não esterificado	$8,1 \pm 1,4$	$7,9 \pm 1,1$	0,344
Colesterol esterificado	$4,1 \pm 0,7$	$4,1 \pm 0,7$	> 0,999
Fosfolipídios	$26,4 \pm 1,0$	$26,4 \pm 1,0$	> 0,999
Triglicerídeos	$5,1 \pm 0,6$	$5,1 \pm 0,7$	> 0,999

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão. AGL, ácidos graxos livres; HDL, lipoproteína de alta densidade.

A Tabela 10 mostra a porcentagem de pacientes, em cada grupo, que atingiram as metas lipídicas para diabéticos recomendadas pela *American Diabetes Association* e pelo *American College of Cardiology* (Brunzel et al., 2008). A porcentagem de pacientes com os níveis recomendados de LDL-colesterol (<100 mg/dL) foi maior no grupo HbA_{1c} > 6,5% do que no grupo HbA_{1c} ≤ 6,5% (26% vs 10%; p = 0,016). No entanto, não houve diferença entre os dois grupos em relação à porcentagem de pacientes que atingiram os níveis recomendados de HDL-colesterol (>40 mg/dL) e não-HDL-colesterol (<130 mg/dL). Por outro lado, a porcentagem de pacientes com os níveis recomendados de triglicerídeos (<150 mg/dL) foi maior no grupo HbA_{1c} ≤ 6,5% do que no grupo HbA_{1c} > 6,5% (66% vs 37%; p < 0,001).

Tabela 10 É Metas lipídicas dos pacientes com diabetes tipo 2 com HbA_{1c} ≤ 6,5% e com HbA_{1c} > 6,5%, conforme estabelecido pela *American Diabetes Association*.

Metas lipídicas	HbA _{1c} ≤ 6,5%	HbA _{1c} > 6,5%	p
Colesterol			
LDL-c (< 100 mg/dL)	10%	26%	0,016
HDL-c (> 40 mg/dL)	44%	34%	0,290
Não-HDL-c (< 130 mg/dL)	13%	24%	0,131
Triglicerídeos (< 150 mg/dL)	66%	37%	< 0,001

Dados expressos como porcentagem de pacientes que atingiram a meta lipídica (em parênteses). HbA_{1c}, hemoglobina glicada; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade.

A Tabela 11 exhibe os dados bioquímicos dos pacientes tratados com insulina e dos não tratados com insulina. A glicemia de jejum (137 ± 40 vs 124 ± 33 mg/dL) e a HbA_{1c} (8,4 ± 1,9% vs 6,7 ± 1,3%) estavam maiores nos pacientes que estavam em uso de insulina do que nos não estavam em uso de insulina (p = 0,046 e p < 0,0001, respectivamente). Não houve diferença nos níveis de colesterol total, LDL, HDL, não-HDL e não esterificado, triglicerídeos e ácidos graxos livres entre os pacientes

tratados e não tratados com insulina. Também os resultados foram iguais em relação às apolipoproteínas A-I e B, concentração e atividade de CETP, atividade de LCAT e nas relações colesterol total/colesterol não esterificado e triglicerídeos/HDL-colesterol entre os pacientes desses dois grupos.

Tabela 11 - Dados laboratoriais dos pacientes com diabetes tipo 2 com e sem uso de insulina.

Parâmetros	Em uso de insulina	Sem uso de insulina	P
Número de pacientes	42	101	
Glicemia de jejum (mg/dL)	137 ± 40	124 ± 33	0,046
HbA _{1c} %	8,4 ± 1,9	6,7 ± 1,3	<0,0001
Colesterol (mg/dL)			
Total	210 ± 44	207 ± 42	0,702
LDL-c	137 ± 40	136 ± 39	0,890
HDL-c	37 ± 11	38 ± 9	0,572
Não-HDL-c	172 ± 43	168 ± 44	0,619
CNE (mg/dL)	36,0 ± 6,5	34,9 ± 7,1	0,388
Triglicerídeos (mg/dL)	197 ± 122	169 ± 87	0,124
Apolipoproteínas (mg/dL)			
B	98 ± 19	101 ± 21	0,425
A-I	136 ± 27	135 ± 25	0,832
Ácidos graxos livres (mEq/L)	0,48 ± 0,21	0,48 ± 0,21	>0,999
CETP (µg/mL)	2,4 ± 1,2	2,3 ± 1,0	0,609
Atividade de CETP (pmol/µL.h)	69,0 ± 12,4	70,0 ± 15,2	0,707
Atividade de LCAT(470/390nm)	1,33 ± 0,13	1,33 ± 0,10	>0,999
Colesterol total/CNE	5,88 ± 0,95	6,06 ± 1,08	0,349
Triglicerídeos/HDL-colesterol	5,49 ± 4,80	5,10 ± 4,63	0,651

Dados expressos como média ± desvio padrão. HbA_{1c}, hemoglobina glicada; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; CNE, colesterol não esterificado; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferase.

A Tabela 12 mostra que a composição e diâmetro da HDL e as transferências de lípidos para HDL não diferiram entre os pacientes que estavam e os que não estavam em uso de insulina.

Tabela 12 É Diâmetro e composição lipídica da HDL e transferência lipídica para HDL dos pacientes com diabetes tipo 2 com e sem uso de insulina.

Parâmetros	Em uso de insulina	Sem uso de insulina	p
Diâmetro da HDL (nm)	9,0 ± 1,1	8,8 ± 0,8	0,227
Composição lipídica da HDL (%)			
Colesterol não esterificado	6,1 ± 1,7	5,9 ± 1,8	0,540
Colesterol esterificado	33,4 ± 5,8	34,5 ± 6,8	0,360
Fosfolipídios	51,8 ± 6,7	51,0 ± 6,4	0,503
Triglicerídeos	8,7 ± 2,8	8,7 ± 2,6	>0,999
Transferências lipídicas (%)			
Colesterol não esterificado	8,0 ± 1,2	8,0 ± 1,2	>0,999
Colesterol esterificado	4,1 ± 0,7	4,1 ± 0,7	>0,999
Fosfolipídios	26,2 ± 0,9	26,4 ± 1,1	0,299
Triglicerídeos	5,2 ± 0,7	5,1 ± 0,6	0,389

Dados expressos como média ± desvio padrão. HDL, lipoproteína de alta densidade.

Foi também realizada uma comparação de subgrupos de pacientes que estavam em uso ou não de insulina, nos quais os pacientes foram pareados para os níveis de glicemia de jejum e hemoglobina glicada (n=31 em ambos os grupos). Novamente, nenhuma diferença foi observada entre os parâmetros lipídicos estudados entre esses dois grupos (Tabela 13 e 14).

Tabela 13 É Dados laboratoriais dos pacientes com diabetes tipo 2 com e sem uso de insulina pareados para glicemia de jejum e HbA_{1c}.

Parâmetros	Em uso de insulina	Sem uso de insulina	p
Número de pacientes	31	31	
Glicemia de jejum (mg/dL)	130 ± 37	139 ± 36	0,336
HbA _{1c} %	7,5 ± 1,1	7,5 ± 0,7	>0,999
Colesterol (mg/dL)			
Total	202 ± 43	198 ± 49	0,734
LDL-c	134 ± 37	123 ± 46	0,304
HDL-c	36 ± 11	39 ± 9	0,245
Não-HDL-c	166 ± 43	158 ± 51	0,507
CNE (mg/dL)	35,2 ± 7,0	35,1 ± 8,4	0,960
Triglicerídeos (mg/dL)	187 ± 120	197 ± 105	0,728
Apolipoproteínas (mg/dL)			
B	94 ± 19	102 ± 21	0,121
A-I	137 ± 29	140 ± 29	0,685
Ácidos graxos livres (mEq/L)	0,47 ± 0,23	0,49 ± 0,20	0,716
CETP (µg/mL)	2,4 ± 1,3	2,4 ± 1,3	>0,999
Atividade de CETP (pmol/µL.h)	67,6 ± 12,7	68,8 ± 15,2	0,737
Atividade de LCAT(470/390nm)	1,34 ± 0,12	1,32 ± 0,08	0,443
Colesterol total/CNE	5,80 ± 1,00	5,83 ± 1,14	0,913
Triglicerídeos/HDL-colesterol	5,32 ± 4,61	5,73 ± 5,03	0,739

Dados expressos como média ± desvio padrão. HbA_{1c}, hemoglobina glicada; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; CNE, colesterol não esterificado; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferase.

Tabela 14 É Diâmetro e composição lipídica da HDL e transferência lipídica para HDL dos pacientes com diabetes tipo 2 com e sem uso de insulina pareados para glicemia de jejum e HbA_{1c}.

Parâmetros	Em uso de insulina	Sem uso de insulina	p
Diâmetro da HDL (nm)	9,0 ± 1,2	8,7 ± 0,6	0,218
Composição lipídica da HDL (%)			
Colesterol não esterificado	6,1 ± 1,9	5,6 ± 1,7	0,279
Colesterol esterificado	33,3 ± 6,1	34,9 ± 5,5	0,282
Fosfolipídios	51,8 ± 6,6	50,0 ± 6,3	0,276
Triglicerídeos	8,8 ± 2,8	9,5 ± 2,7	0,320
Transferências lipídicas (%)			
Colesterol não esterificado	8,1 ± 1,3	8,2 ± 1,3	0,763
Colesterol esterificado	4,1 ± 0,8	4,2 ± 0,9	0,646
Fosfolipídios	26,1 ± 0,9	26,5 ± 1,2	0,143
Triglicerídeos	5,1 ± 0,7	5,0 ± 0,8	0,602

Dados expressos como média ± desvio padrão. HDL, lipoproteína de alta densidade.

Na análise de correlação simples realizada entre a HbA_{1c} e todos os outros parâmetros avaliados neste estudo foi achada uma correlação positiva entre a HbA_{1c} e tempo de diabetes ($r = 0,24$; $p = 0,006$), HbA_{1c} e glicemia de jejum ($r = 0,51$; $p < 0,0001$), HbA_{1c} e triglicerídeos ($r = 0,25$; $p = 0,002$), HbA_{1c} e colesterol total ($r = 0,19$; $p = 0,022$), HbA_{1c} e colesterol não-HDL ($r = 0,17$; $p = 0,049$) e HbA_{1c} e colesterol não esterificado ($r = 0,18$; $p = 0,036$). Também foi encontrado uma correlação negativa entre HbA_{1c} e colesterol esterificado da partícula de HDL ($r = -0,19$; $p = 0,038$). Ainda houve uma tendência, não significativa, para a correlação positiva entre HbA_{1c} e

apoB ($r = 0,16$, $p = 0,061$). Em relação aos outros parâmetros avaliados, não houve correlação com a HbA_{1c} (Tabela 15).

Tabela 15 Correlações entre HbA_{1c} e as características clínicas e os parâmetros glicêmicos e lipídicos dos pacientes com diabetes tipo 2.

Parâmetros	Coefficiente de Correlação (r)	p
Idade	0,01	0,898
Tempo de diabetes	0,24	0,006
IMC	0,00	0,971
Circunferência abdominal	- 0,02	0,858
Glicemia de jejum	0,51	< 0,0001
Colesterol		
Total	0,19	0,022
LDL-c	0,05	0,571
HDL-c	0,09	0,298
Não-HDL-c	0,17	0,049
Colesterol não esterificado	0,18	0,036
Triglicerídeos	0,25	0,002
Apolipoproteínas		
B	0,16	0,061
A-I	0,12	0,153
Ácidos graxos livres	0,03	0,760
CETP	0,05	0,575
Atividade de CETP	0,06	0,563
Atividade de LCAT	- 0,06	0,511
Colesterol total/CNE	- 0,01	0,893
Triglicerídeos/HDL-colesterol	0,12	0,179
Diâmetro da HDL	- 0,08	0,409

continua

Tabela 15 **Correlações entre HbA_{1c} e as características clínicas e os parâmetros glicêmicos e lipídicos dos pacientes com diabetes tipo 2 (conclusão).**

Parâmetros	Coeficiente de Correlação (r)	p
Composição lipídica da HDL		
Colesterol não esterificado	0,00	0,955
Colesterol esterificado	- 0,19	0,038
Fosfolipídios	0,14	0,130
Triglicerídeos	0,13	0,158
Transferências lipídicas para HDL		
Colesterol não esterificado	0,00	0,982
Colesterol esterificado	0,06	0,517
Fosfolipídios	0,01	0,876
Triglicerídeos	0,14	0,106

Coeficiente de correlação linear de Pearson (r). HbA_{1c}, hemoglobina glicada; IMC, índice de massa corpórea; LDL, lipoproteína de baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; LCAT, lecitina-colesterol aciltransferase; CNE, colesterol não esterificado.

Na análise de correlação bivariada dos triglicerídeos com todas os parâmetros clínicos e físicos mencionados anteriormente, apenas a idade foi correlacionada com a concentração de triglicerídeos ($r = - 0,17$; $p = 0,044$). Assim, na análise de regressão linear múltipla foram utilizados idade e bom e mau controle glicêmico (HbA_{1c} $\leq 6,5\%$ e HbA_{1c} $> 6,5\%$, respectivamente) como variáveis independentes e triglicerídeo como variável dependente. Mesmo após ajuste da idade, os pacientes com mau controle glicêmico apresentaram trigliceridemia média de 63 mg/dL maior do que os pacientes com bom controle glicêmico ($r^2 = 0,129$, $p < 0,001$). A idade não influenciou os níveis de triglicerídeos neste modelo (dados não mostrados em tabela).

Não foi realizada a análise de regressão múltipla utilizando o colesterol não esterificado como variável dependente, pois o mesmo não se correlacionou com nenhum parâmetro clínico ou físico deste estudo.

5. DISCUSSÃO

Como observado nos estudos UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*), ADVANCE (*Action in Diabetes and Vascular Disease*), ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*) e VADT (*Veterans Affairs Diabetes Trial*) (UKPDS Group, 1998; ACCORD Study Group, 2008; ADVANCE Collaborative Group, 2008; Duckworth et al., 2009) e em recentes meta-análises (Kelly et al., 2009; Ray et al., 2009; Turnbull et al., 2009; Boussageon et al., 2011), o tratamento intensivo do *diabetes mellitus* tipo 2 tem importante impacto no controle glicêmico, mas parece reduzir apenas de forma modesta o risco de eventos cardiovasculares. Desde o ensaio clínico UKPDS demonstrou-se que o fator de risco mais importante para eventos cardiovasculares em pacientes com DM2 está relacionado à dislipidemia, no caso maiores concentrações de LDL-colesterol (Turner et al., 1998). Em estudos de prevenção secundária de DCV, através do tratamento dos lipídios com estatinas (Pyorala et al., 1997; Goldberg et al., 1998), foi verificado em pacientes com DM2 redução da recorrência de eventos cardiovasculares agudos naqueles que atingiram os alvos mais rigorosos do LDL-colesterol. Lembrando-se que as estatinas têm também o efeito de aumentar o HDL-colesterol e diminuir os níveis de triglicerídeos no plasma, mesmo que de forma mais modesta (Blum et al., 2004), o que também tem impacto na mortalidade cardiovascular (Gaziano et al., 1997).

O baixo impacto do controle glicêmico na redução do risco da DCV ressalta a importância de entender melhor o metabolismo lipídico e outros fatores relacionados com a aterogênese em pacientes diabéticos com bom e mau controle glicêmico. Em nosso estudo, pacientes com melhor controle glicêmico, avaliados através da hemoglobina glicada, tinham uma menor trigliceridemia, concordando com vários outros estudos na literatura (Ahmad, 2007; Khan H et al., 2007; Sánchez-Quesada et al., 2012). Também se verificou uma menor concentração de colesterol não esterificado no plasma, o que é um novo achado, pois ainda não tinha sido investigado na literatura a sua relação com o controle glicêmico.

O catabolismo intravascular das partículas de VLDL e quilomícrons, lipoproteínas ricas em triglicerídeos sintetizadas no fígado e intestino, é dependente da LPL. Essa enzima está localizada na superfície endotelial dos capilares, onde se

liga a proteoglicanos e é estimulada pela apoC-II na superfície das lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Sua síntese e atividade são estimuladas pela ação da insulina. A diminuição da atividade da LPL em pacientes com DM2 resulta na redução da hidrólise dos triglicerídeos da VLDL e dos quilomícrons e consequente hipertrigliceridemia. No diabetes, a hipertrigliceridemia é consequência também da mobilização de ácidos graxos livres liberados do tecido adiposo e muscular através da ação da HSL, resultando numa maior síntese de VLDL (Taskinen, 2003; Vergès, 2010). No presente estudo, os pacientes com maiores concentrações de AGL tiveram maiores concentrações de triglicerídeos no plasma, maior relação de triglicerídeos/HDL-colesterol e uma tendência não significativa para maior glicemia de jejum. No entanto, não houve diferença das concentrações de AGL em relação aos grupos com melhor ou pior controle glicêmico. Há controvérsia na literatura em relação às concentrações de AGL e o controle glicêmico nos estudos que abordaram essa questão (Malmström et al., 1997; Morita et al., 2012; Sánchez-Quesada et al., 2012). Em conformidade com os nossos resultados, a maioria dos estudos na literatura mostram que uma menor trigliceridemia está relacionada com um melhor controle glicêmico (Ahmad, 2007; Khan H et al., 2007; Sánchez-Quesada et al., 2012); no entanto, alguns autores não encontraram essa relação (Bittolo Bon et al., 1984; Abaira et al., 1995). A hipertrigliceridemia, tanto em jejum (Gaziano et al., 1997; Austin et al., 1998; Sarwar et al., 2007) ou pós-prandial (Gaziano et al., 1997; Sposito et al., 2004), já foi estabelecida como um fator de risco independente para doença cardiovascular. Dessa forma, baixar os níveis de triglicerídeos através da melhora do controle glicêmico pode ser benéfico para a prevenção da DAC. Também vale ressaltar que a razão triglicerídeos/HDL-colesterol estava mais alta no grupo com pior controle glicêmico, indicando maior risco de doença cardiovascular nesse grupo (Gaziano et al., 1997).

Um novo e importante achado do presente estudo foi que pacientes com DM2 com pior controle glicêmico apresentaram maiores concentrações de colesterol não esterificado no plasma, assim como houve uma correlação positiva entre a HbA_{1c} e a concentração de colesterol não esterificado. Há duas formas de colesterol no plasma e nos tecidos: o colesterol esterificado e o não esterificado ou livre. O colesterol não esterificado está localizado na camada externa das lipoproteínas e difunde-se

facilmente no ambiente aquoso. O colesterol esterificado está localizado no núcleo das lipoproteínas, sendo mais estável do que o não esterificado. Na circulação plasmática, o colesterol é esterificado pela LCAT, que tem a apoA-I como principal co-fator. Esse processo ocorre, principalmente, na HDL, visto que a maior concentração de apoA-I é encontrado nessa lipoproteína, que também abriga a LCAT. A esterificação do colesterol é crucial para o transporte reverso do colesterol e estabiliza o acúmulo plasmático de colesterol. No nosso estudo, a atividade de LCAT foi similar entre os grupos com HbA_{1c} $\leq 6,5\%$ e $HbA_{1c} > 6,5$, assim como não apresentou correlação com a HbA_{1c} . No entanto, é importante ressaltar que Nakhjavani et al. (2008) mostraram em seu estudo haver uma correlação negativa entre a HbA_{1c} e a LCAT. Em estudo desenvolvido por Schernthaner et al. (1983), o colesterol não esterificado plasmático total não foi diferente em pacientes com DM2, quando comparados com pacientes sem DM2. Em outro estudo (Wang et al., 2012), pacientes com DM2 e intolerância à glicose tiveram maior conteúdo de colesterol não esterificado nas partículas de VLDL do que pacientes não diabéticos e sem intolerância à glicose. Nesse mesmo estudo, foi mostrado que a sensibilidade insulínica se correlacionou positivamente com o colesterol não esterificado nas subfrações da HDL. Vale ressaltar que a questão da relação do colesterol não esterificado plasmático com o controle glicêmico está sendo abordada de maneira inédita em nosso estudo.

O excesso de colesterol não esterificado no grupo com pior controle glicêmico pode representar uma menor esterificação do colesterol e maior risco aterosclerótico nesse grupo. O fato da concentração de colesterol não esterificado na HDL não estar diferente nos grupos analisados quanto ao controle glicêmico indica que este tipo de colesterol pode estar em maiores concentrações nas lipoproteínas que contêm apoB ou livre no plasma no grupo com pior controle glicêmico. Esse excesso de colesterol não esterificado representa uma sobrecarga de colesterol que não está sendo captado e esterificado pela HDL. A captação e esterificação do colesterol pela HDL são protetoras, pois o excesso de colesterol não esterificado na superfície das lipoproteínas pode difundir-se facilmente no plasma e eventualmente precipitar nas artérias. Isso foi sugerido em um estudo de cinética plasmática do colesterol, usando uma nanopartícula artificial mimética à LDL (LDE) que carregava o colesterol

esterificado e não esterificado marcados radioativamente, em pacientes com DAC e sem DAC. No grupo de pacientes com DAC, o colesterol não esterificado dissociou-se mais rapidamente das nanopartículas do que as moléculas de colesterol esterificado (Santos et al., 2003). Em outro estudo usando a mesma técnica, pacientes com DAC que foram submetidos à revascularização miocárdica apresentaram nas artérias maior conteúdo de colesterol não esterificado do que de colesterol esterificado radiomarcado (Couto et al., 2007), sugerindo que a deposição das moléculas de colesterol não esterificado mostrou-se independente da absorção arterial da nanopartícula artificial (LDE). Isso demonstra que o enriquecimento da artéria com o colesterol não esterificado plasmático, dissociado das lipoproteínas, pode alterar as funções antiateroscleróticas do endotélio arterial. Além disso, o excesso de colesterol não esterificado pode levar ao seu acúmulo nos macrófagos, promovendo eventos citotóxicos que podem levar a vários efeitos negativos, como o estresse oxidativo e a inflamação (Afonso et al., 2014).

Nossos resultados com a análise múltipla mostram que as associações do controle glicêmico com os triglicerídeos e com o colesterol não esterificado existem mesmo após ajustar para potenciais fatores confundidores.

Em relação à concentração do LDL-colesterol, cujo aumento não faz parte do quadro da dislipidemia diabética, há também controvérsia, mas a maioria dos trabalhos indica que o controle glicêmico não influencia os níveis plasmáticos do LDL-colesterol (Beylot et al., 1983; Schernthaner et al., 1983; Bittolo Bon et al., 1984; Al-Muhtaseb et al., 1991; Abaira et al., 1995;), corroborando com os achados encontrados em nosso estudo.

Os pacientes com DM2 possuem uma maior quantidade de LDL pequena e densa, subfração mais aterogênica da LDL. Apesar de neste estudo não ter sido realizado a análise da subfração pequena e densa da LDL, outros estudos mostraram uma relação direta da LDL pequena e densa com a trigliceridemia e com a relação triglicerídeos/HDL-colesterol (Austin et al., 1990; Chait et al., 1993; Boizel et al., 2000). Isso mostra que em nosso estudo, provavelmente, os pacientes com DM2 com pior controle glicêmico apresentavam maior quantidade de LDL pequena e densa, reforçando o mesmo achado encontrado em estudos prévios (Caixàs et al., 1997; Sánchez-Quesada et al., 2012).

Uma tendência, não estatisticamente significativa, para níveis elevados de apoB foi observada nos pacientes com pobre controle glicêmico. Apesar da maioria da apoB no plasma estar presente na fração LDL, o aumento das concentrações de VLDL e IDL, sugerido pela hipertrigliceridemia, pode ter contribuído para essa tendência. Outra interpretação para o aumento da apoB sem a elevação das concentrações de LDL-colesterol pode ser pelo fato da hipertrigliceridemia levar ao aumento da subfração de LDL pequena e densa (Taskinen, 2003; Vergès, 2010). O conteúdo de colesterol em cada partícula de LDL é menor nessa subfração, assim, há um aumento do número de partículas de LDL contendo apoB sem aumentar o LDL-colesterol. A hipertrigliceridemia sem o aumento significativo da apoB não implica necessariamente em mudanças na composição da VLDL, visto que a maioria da apoB está presente na fração LDL.

Há controvérsia na literatura em relação ao controle glicêmico e os níveis de HDL-colesterol. Vários estudos prévios mostraram, similarmente a este estudo, que o HDL-colesterol é independente da glicemia (Beylot et al., 1983; Bittolo Bon et al., 1984; Hollenbeck et al., 1986; Abaira et al., 1995; Sánchez-Quesada et al., 2012), embora em dois outros estudos o pobre controle glicêmico tenha determinado baixas concentrações de HDL-colesterol (Ahmad Khan, 2007; Gatti et al., 2009).

Em relação à composição lipídica da HDL, é interessante salientar que a HDL dos pacientes com $HbA_{1c} > 6,5\%$ apresentava maior concentração de triglicerídeos do que a dos pacientes com $HbA_{1c} \leq 6,5\%$. Isto é esperado porque o enriquecimento com triglicerídeos geralmente ocorre nas frações HDL de indivíduos hipertrigliceridêmicos e os níveis de triglicerídeos foram maiores no grupo com $HbA_{1c} > 6,5\%$, fato que pode estar relacionado com a maior transferência de triglicerídeos da VLDL e quilomícrons para HDL, mediado pela CETP. Em estudo realizado por Wang et al. (2012), mostrou-se que pacientes com DM2 e pacientes com intolerância à glicose mais glicemia de jejum alterada apresentavam maiores concentrações de triglicerídeos na subfração pequena da HDL, quando comparados com pacientes com glicemia de jejum e tolerância à glicose normais; além de também mostrarem que a concentração de triglicerídeos na HDL pequena correlacionou-se negativamente com a sensibilidade à insulina. Em nosso estudo, a HbA_{1c} correlacionou-se negativamente com o colesterol esterificado da HDL, mostrando

que os maiores níveis de HbA_{1c} podem estar relacionados com uma maior transferência de colesterol esterificado da HDL para as outras lipoproteínas, principalmente às ricas em triglicerídeos. Wang et al. (2012) encontraram uma correlação positiva entre a sensibilidade insulínica e a concentração de colesterol esterificado na HDL, além de demonstrarem que a concentração de colesterol esterificado na HDL estava menor em pacientes com DM2 em relação aos pacientes não diabéticos, indo de encontro com nosso achado.

Uma importante alteração na dislipidemia do DM2 é a redução da atividade de LCAT, enzima responsável pela esterificação do colesterol nas partículas de HDL, prejudicando um relevante passo no transporte reverso do colesterol. A hiperglicemia resulta na glicação não enzimática das proteínas plasmáticas, incluindo a apoA-I, principal e mais abundante apolipoproteína da HDL. A glicação altera a conformação da apoA-I em regiões críticas para a ativação da LCAT e para a ligação dos lipídios, além de diminuir o tamanho e a superfície da HDL discoide nascente, ou seja, nessa situação a HDL recebe e esterifica menos colesterol. A redução da atividade da LCAT é diretamente proporcional à extensão da glicação da apoA-I (Nobecourt et al., 2007). Embora não tenha havido diferença na atividade de LCAT entre os grupos com melhor ou pior controle glicêmico neste estudo, uma interessante linha de pesquisa seria a investigação do grau de glicosilação das lipoproteínas em relação ao controle glicêmico e à sensibilidade insulínica e seu impacto no metabolismo lipídico.

Foi observado neste estudo que o grupo de pacientes diabéticos com maior concentração de AGL possuía maior atividade de LCAT. Este achado aventa a hipótese de que o maior acúmulo de AGL em pacientes diabéticos aumenta a esterificação do colesterol na HDL. Lembrando que os pacientes com DM2 geralmente têm hipertrigliceridemia e, portanto, transferem maior quantidade de ésteres de colesterol da HDL, mediado pela CETP, para as lipoproteínas ricas em triglicérides (Taskinen, 2003).

O *diabetes mellitus* tipo 2 altera a atividade de CETP e PLTP, o que tem impacto na transferência lipídica entre as lipoproteínas (Borggreve et al., 2003). No entanto, a concentração e atividade de CETP não tiveram relação com o controle glicêmico neste estudo. Embora bem estabelecido, através de experimentos *in vitro*

e *in vivo* que, a transferência de ésteres de colesterol, colesterol não esterificado, triglicerídeos e fosfolípidios é amplamente dependente de proteínas de transferência (Quig; Zilversmit, 1990), a porcentagem da transferência lipídica não dependente de proteínas transportadoras, que ocorre por simples difusão ou por outros mecanismos, ainda não foi documentada.

Como reportado por Oliveira et al. (2012), pacientes com DM2 tem um aumento da transferência de triglicerídeos e ésteres de colesterol para a HDL, quando comparados com pacientes sem diabetes. Em outro estudo que avaliou a transferência de lípidos para a HDL em pacientes com Síndrome do Ovário Policístico, outro estado de resistência insulínica, houve uma correlação positiva entre a transferência de triglicerídeos para a HDL e a resistência insulínica, estimada pelo HOMA-IR (Rocha et al., 2010).

Em estudo prévio foi demonstrado que a transferência de colesterol não esterificado para a HDL estava diminuída em pacientes com DAC (Maranhão et al., 2012). Em outro estudo, pacientes com DM2 e DAC também tiveram redução da transferência de colesterol não esterificado para a HDL, quando comparados com pacientes com DM2 e sem DAC (Sprandel et al., 2012). Em nosso estudo, os pacientes com menores níveis de HbA_{1c} não se diferenciaram dos que tinham maiores níveis de HbA_{1c} em relação a transferência dos quatros principais lípidos, avaliada pelo ensaio de transferência *in vitro*. Portanto, as alterações das transferências lipídicas para a HDL, que aparentemente estão relacionadas com a presença de DAC em pacientes com DM2 (Sprandel et al., 2012), não estão relacionadas com o melhor ou pior controle glicêmico.

Em nosso estudo apenas um paciente estava tomando tiazolidinediona. Os outros pacientes estavam em uso de metformina ou sulfoniuréias, isolada ou em combinação, com ou sem uso de insulina. As tiazolidinedionas, as quais ativam os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR), são a única classe de droga usada que podem afetar diretamente o metabolismo das lipoproteínas. A metformina ou as sulfoniuréias podem afetar indiretamente as lipoproteínas plasmáticas através da redução da resistência insulínica ou através do estímulo da secreção da insulina, respectivamente (Nathan et al., 2006).

O controle glicêmico dos 42 pacientes participantes deste estudo (29%) que estavam sob o tratamento de insulina foi significativamente pior do que os dos 101 pacientes (71%) que não estavam usando insulina. Nenhuma diferença nas concentrações lipídicas plasmáticas, nas transferências lipídicas para a HDL ou nos outros parâmetros lipídicos avaliados neste estudo foi observada entre os pacientes que estavam ou não sob o uso de insulina. É notável que quando, em uma análise de subgrupo, os pacientes tratados ou não tratados com insulina foram pareados quanto aos níveis de hemoglobina glicada e glicemia de jejum, a ausência de diferença entre os dois grupos permaneceu. Em alguns estudos intervencionistas (Hollenbeck et al., 1986; Taskinen et al., 1988), a introdução da terapia insulínica melhorou o perfil lipídico dos pacientes, no entanto essa terapia concomitantemente melhorou o controle glicêmico desses pacientes. Esses achados sugerem que a terapia insulínica pode estar relacionada apenas com o controle glicêmico do diabetes e não ter influência direta no metabolismo dos lipídios.

Seguindo as metas lipídicas recomendadas pela ADA (Brunzell et al., 2008), a porcentagem de pacientes com HbA_{1c} $\leq 6,5\%$ que estavam dentro dos limites lipídicos normais foi maior apenas em relação à concentração de triglicerídeos, corroborando com os resultados que mostraram uma relação direta entre a trigliceridemia e o controle glicêmico neste estudo. Um achado intrigante e difícil de interpretar foi a maior porcentagem de pacientes no grupo com $HbA_{1c} > 6,5\%$ com níveis normais de LDL-colesterol comparados aos do grupo com $HbA_{1c} \leq 6,5\%$. No entanto, concentrações elevadas de LDL-colesterol não é uma característica da dislipidemia diabética, podendo isso ser considerado um achado ocasional.

Embora se tenha confirmado que o pobre controle glicêmico leva a uma maior trigliceridemia, nosso estudo mostra, pela primeira vez na literatura, que os altos níveis de glicemia e hemoglobina glicada são acompanhados por aumento do colesterol não esterificado nas lipoproteínas aterogênicas que contêm apoB e no plasma. Por outro lado, o HDL-colesterol e a transferência de lípidos para a HDL não foram associados com mau controle glicêmico. Os resultados descritos acima podem lançar novas luzes sobre o entendimento da dislipidemia diabética, com possíveis implicações terapêuticas, já que tanto a trigliceridemia quanto os níveis e função da HDL são alvos terapêuticos fundamentais na prevenção da aterosclerose.

6. CONCLUSÕES

1 - O controle glicêmico não se relacionou com a transferência de nenhum dos quatro lípidos da nanoemulsão artificial para a HDL.

2 - O melhor controle glicêmico relacionou-se com menores concentrações séricas de triglicerídeos, corroborando com os achados da literatura.

3 . Foi demonstrado, pela primeira vez, que o melhor controle glicêmico relacionou-se com menores concentrações séricas de colesterol não esterificado.

4 . Pacientes com $HbA_{1c} > 6,5\%$ apresentaram maior concentração de triglicerídeos na fração HDL.

5 . A hemoglobina glicada correlacionou-se negativamente com conteúdo de colesterol esterificado na HDL.

6 . Maiores concentrações de ácidos graxos livres estão relacionadas com uma maior atividade da enzima LCAT.

7 . O uso ou não uso de insulina não se relacionou com nenhum dos parâmetros lipídicos estudados.

7. REFERÊNCIAS

Abderrahmani A, Niederhauser G, Favre D, Abdelli S, Ferdaoussi M, Yang JY, Regazzi R, Widmann C, Waeber G. Human high-density lipoprotein particles prevent activation of the JNK pathway induced by human oxidised low-density lipoprotein particles in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2007;50:1304-14.

Abraira C, Colwell JA, Nuttall FQ, Sawin CT, Nagel NJ, Comstock JP, Emanuele NV, Levin SR, Henderson W, Lee HS. Veterans Affairs Cooperative Study on glycemic control and complications in type II diabetes (VA CSDM). Results of the feasibility trial. Veterans Affairs Cooperative Study in Type II Diabetes. *Diabetes Care*. 1995;18:1113-23.

Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group; Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DCJR, Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RHJR, Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358:2545-49.

Advance Collaborative Group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358:2560-2572.

Afonso Mda S, Castilho G, Lavrador MS, Passarelli M, Nakandakare ER, Lottenberg SA, Lottenberg AM. The impact of dietary fatty acids on macrophage cholesterol homeostasis. *J Nutr Biochem*. 2014;25:95-103.

Ahmad Khan H. Clinical significance of HbA1c as a marker of circulating lipids in male and female type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol*. 2007;44:193-200.

Al-Muhtaseb N, Al-Yuosuf AR, Bajaj JS. Plasma lipoproteins and apolipoproteins in insulin-dependent and young non-insulin-dependent Arab women. *Acta Diabetol Lat*. 1991;28:61-69.

Almdal T, Scharling H, Jensen JS, Vestergaard H. The independent effect of type 2 diabetes mellitus on ischemic heart disease, stroke, and death: a population based study of 13,000 men and women with 20 years of follow-up. *Arch Intern Med*. 2004;164:1422-26.

American Association of Clinical Endocrinologists. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan. *Endocr Pract*. 2011;17(Suppl 2):1-53.

American Diabetes Association. Diabetes statistics. Disponível em <<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/>>. Acesso: 28 set. 2013a.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes . 2013. *Diabetes Care*. 2013b;36(Suppl 1):S11-S66.

Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectrum*. 2004;17:183-190.

Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*. 1998;81(Suppl 1):7B-12B.

Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 1990;82:495-506.

Azevedo CH, Wajngarten M, Lo Prete AC, Diament J, Maranhao RC. Simultaneous transfer of cholesterol, triglycerides, and phospholipids to high-density lipoprotein in aging subjects with or without coronary artery disease. *Clinics*. 2011;66:1543. 8.

Buse JB, Ginsberg HN, Bakris GL, Clark NG, Costa F, Eckel R, Fonseca V, Gerstein HC, Grundy S, Nesto RW, Pignone MP, Plutzky J, Porte D, Redberg R, Stitzel KF, Stone NJ. American Heart Association; American Diabetes Association. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Circulation*. 2007;115:114-126.

Bakker SJ, Dekker JM, Heine RJ. Association between HbA1c and HDLcholesterol independent of fasting triglycerides in a Caucasian population: evidence for enhanced cholesterol ester transfer induced by in vivo glycation. *Diabetologia*. 1998; 41:1249-50.

Bardini G, Rotella CM, Giannini S. Dyslipidemia and diabetes: reciprocal impact of impaired lipid metabolism and Beta-cell dysfunction on micro- and macrovascular complications. *Rev Diabet Stud*. 2012;9:82-93.

Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis*. 2003;168:195-211.

Beylot M, Garcia I, Temori SA, Orgiazzi J, Revol A, Noel G. Serum lipids in diabetes mellitus. Relation to equilibration and microangiopathy. *Diabete Metab*. 1983;9:199-203.

Bielicki JK, Forte TM, McCall MR. Minimally oxidized LDL is a potent inhibitor of lecithin: cholesterol acyltransferase activity. *J Lipid Res*. 1996;37:1012-21.

Bittolo Bon G, Cazzolato G, Avogaro P. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Acta Diabetol Lat*. 1984;21:315-324.

Blum A, Simsolo C, Hasin Y. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins) atherosclerosis and coronary syndromes. *Atherosclerosis*. 2004;175:1-5.

Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(Suppl 3):14-23.

Ballantyne CM. *Clinical Lipidology: A Companion to Braunwald's Heart Disease*. 1st ed. Philadelphia: Elsevier; 2009.

Boizel R, Benhamou PY, Lardy B, Laporte F, Foulon T, Halimi S. Ratio of triglycerides to HDL cholesterol is an indicator of LDL particle size in patients with type 2 diabetes and normal HDL cholesterol levels. *Diabetes Care*. 2000;23:1679-85.

Borggreve SE, De Vries R, Dullaart PF. 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*. 2003;33:1051-69.

Boussageon R, Bejan-Angoulvant T, Saadatian-Elahi M, Lafont S, Bergeonneau C, Kassaï B, Erpeldinger S, Wright JM, Gueyffier F, Cornu C. Effect of intensive glucose lowering treatment on all cause mortality, cardiovascular death, and microvascular events in type 2 diabetes: meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ*. 2011;343:d4169.

Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, Vasanji Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, Hayden MR. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med*. 2007;13:340. 7.

Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, Goldberg RB, Howard BV, Stein JH, Witztum JL, American Diabetes Association, American College Of Cardiology Foundation. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: consensus statement from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. *Diabetes Care*. 2008;31:811-22.

Caixàs A, Ordóñez-Llanos J, De Leiva A, Payés A, Homs R, Pérez A. Optimization of glycemic control by insulin therapy decreases the proportion of small dense LDL particles in diabetic patients. *Diabetes*. 1997;46:1207-13.

Calvo C, Talussot G, Ponsin F, Berthezene F. Non enzymatic glycation of apolipoprotein A-I. Effects on its self-association and lipid binding properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988;153:1060. 7.

Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, Velloso LA, Curi R, Saad MJ. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*. 2005;54:959-67.

Carvalho-Filho MA¹, Ueno M, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291:E476-82.

Casella-Filho A, Chagas AC, Maranhão RC, Trombetta IC, Cesena FH, Silva VM, Tanus-Santos JE, Negrão CE, da Luz PL. Effect of exercise training on plasma levels and functional properties of high-density lipoprotein cholesterol in the metabolic syndrome, *Am J Cardiol*. 2011;107:1168. 72.

Chait A, Brazg RL, Tribble DL, Krauss RM. Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am J Med*. 1993;94:350-6.

Cehade JM, Gladysz M, Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes: prevalence, pathophysiology, and management. *Drugs*. 2013;73:327-89.

Couto RD, Dallan LA, Lisboa LA, Mesquita CH, Vinagre CG, Maranhão RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. *Lipids*. 2007;42:411. 8.

Daminelli EN, Spada C, Treitinger A, Oliveira TV, Latrilha MC, Maranhão RC. Alterations in lipid transfer to high-density lipoprotein (HDL) and activity of paraoxonase-1 in HIV+ patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50:223-7.

Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, Natoli AK, Henstridge DC, Penfold SA, Thomas WG, Mukhamedova N, De Courten B, Forbes JM, Yap FY, Kaye DM, Van Hall G, Febbraio MA, Kemp BE, Sviridov D, Steinberg GR, Kingwell BA. High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2009;119:2103-11.

Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, Mccarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD, VADT Investigators. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2009;360:129-39.

Dullaart RP, De Vries R, Scheek L, Borggreve SE, Van Gent T, Dallinga-Thie GM, Ito M, Nagano M, Sluiter WJ, Hattori H, Van Tol A. Type 2 diabetes mellitus is associated with differential effects on plasma cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein activities and concentrations. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64:205-15.

Duvillard L, Florentin E, Lizard G, Petit JM, Galland F, Monier S, Gambert P, Vergès B. Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy. *Diabetes Care*. 2003;26:1540-4.

Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375:2215-22.

Erdman DM, Cook CB, Greenlund KJ, Giles WH, El-Kebbi I, Ryan GJ, Gallina DL, Ziemer DC, Dunbar VG, Phillips LS. The impact of outpatient diabetes management on serum lipids in urban African-Americans with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25:9-15.

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

Forte TM, Oda MN, Knoff L, Frei B, Suh J, Harmony JA, Stuart WD, Rubin EM, Ng DS. Targeted disruption of the murine lecithin: cholesterol acyltransferase gene is associated with reductions in plasma paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities but not in apolipoprotein J concentration. *J Lipid Res*. 1999;40:1276-83.

Fröjdö S, Vidal H, Pirola L. Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:83-92.

Fryirs MA, Barter PJ, Appavoo M, Tuch BE, Tabet F, Heather AK, Rye KA. Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1642-48.

Gagliardi AC, Maranhão RC, Sousa HP, Schaefer EJ, Santos RD. Effects of margarines and butter consumption on lipid profiles, inflammation markers and lipid transfer to HDL particles in free-living subjects with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Nutr.* 2010;64:1141-9.

Gantman A, Fuhrman B, Aviram M, Hayek T. High glucose stimulates macrophage SR-BI expression and induces a switch in its activity from cholesterol efflux to cholesterol influx. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391:523-8.

Gaziano JM, Hennekens CH, O'donnell CJ, Breslow JL, Buring JE. Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. *Circulation.* 1997;96:2520-5.

Gatti A, Maranghi M, Bacci S, Carallo C, Gnasso A, Mandosi E, Fallarino M, Morano S, Trischitta V, Filetti S. Poor glycemic control is an independent risk factor for low HDL cholesterol in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32:1550-2.

Genest J, Mc Namara J, Salem DN, Schaefer EJ. Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1991;67:1185-9.

Ginsberg HN. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care.* 1991;14:839-55.

Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia: basic mechanisms underlying the common hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol levels. *Diabetes.* 1996;45(Suppl 3):S27-S30.

Ginsberg HN, Huang LS. The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk*. 2000;7:325-31.

Giribela AH, Melo NR, Latrilha MC, Baracat EC, Maranhão RC. HDL concentration, lipid transfer to HDL, and HDL size in normolipidemic nonobese menopausal women. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;104:117-20.

Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Mcguire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB, American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;127:e6-e245.

Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res*. 1996;37:693-707.

Goldberg IJ. Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:965-71.

Goldberg RB, Mellies MJ, Sacks FM, Moyé LA, Howard BV, Howard WJ, Davis BR, Cole TG, Pfeffer MA, Braunwald E. Cardiovascular events and their reduction with pravastatin in diabetic and glucose-intolerant myocardial infarction survivors with average cholesterol levels subgroup analyses in the Cholesterol And Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation*. 1998;98:2513-9.

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

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DRJR, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79:8-15.

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

Hagerman JS, Gould RG. The in vitro interchange of cholesterol between plasma and red cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1951;78:329. 32.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.

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

Hollenbeck CB, Chen YD, Greenfield MS, Lardinois CK, Reaven GM. Reduced plasma high density lipoprotein-cholesterol concentrations need not increase when hyperglycemia is controlled with insulin in non insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1986;62:605-8.

Hseuh WA, Law RE. Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *Am J Med*. 1998;105:4-14.

Iborra RT, Machado-Lima A, Castilho G, Nunes VS, Abdalla DS, Nakandakare ER, Passarelli M. Advanced glycation in macrophages induces intracellular accumulation of 7-ketocholesterol and total sterols by decreasing the expression of ABCA-1 and ABCG-1. *Lipids Health Dis*. 2011 Sep 29;10:172. doi: 10.1186/1476-511X-10-172.

International Diabetes Association. Global Guideline for Type 2 Diabetes: recommendations for standard, comprehensive, and minimal care. *Diabet Med.* 2006;23:579-93.

International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 6th. ed. Bruxelles: International Diabetes Federation, 2013. Disponível em <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso: 15 jul. 2014.

Ismail IS, Nazaimoon W, Mohamad W, Letchuman R, Singaraveloo M, Hew FL, Shuguna C, Khalid BA. Ethnicity and glycaemic control are major determinants of diabetic dyslipidaemia in Malaysia. *Diabet Med.* 2001;18:501-8.

Kelly TN, Bazzano LA, Fonseca VA, Thethi TK, Reynolds K, He J. Systematic review: glucose control and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Ann Intern Med.* 2009;151:394-403.

Khan HA, Sobki SH, Khan SA. Association between glycaemic control and serum lipids profile in type 2 diabetic patients: HbA1c predicts dyslipidaemia. *Clin Exp Med.* 2007;7:24-9.

Kingwell BA, Chapman MJ, Kontush A, Miller NE. HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:445-64.

Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006;58:342-74.

Laakso M, Voutilainen E, Sarlund H, Aro A, Pyörälä K, Penttilä I. Serum lipids and lipoproteins in middle-aged non-insulin-dependent diabetics. *Atherosclerosis.* 1985;56:271-83.

Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clin Chim Acta*. 1999;286:145-9.

Legato MJ, Gelzer A, Goland R, Ebner SA, Rajam S, Villagra V, Kosowski M. Gender-specific care of the patient with diabetes: review and recommendations. *Gend Med*. 2006;3:131-58.

Lima ES, Maranhao RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem*. 2004;50:1086-8.

Liu F, Huang L. Improving plasmid DNA-mediated liver gene transfer by prolonging its retention in the hepatic vasculature. *J Gene Med* 2001;3:569-76.

Lo Prete AC, Dina CH, Azevedo CH, Puk CG, Lopes NH, Hueb WA, et al. In vitro simultaneous transfer of lipids to HDL in coronary artery disease and in statin treatment. *Lipids*. 2009;44:917-24.

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

Maclean PS, Tanner CJ, Houmard JA, Barakat HA. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity is not linked to insulin sensitivity. *Metabolism*. 2001;50:783-8.

Malmström R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, Shepherd J, Taskinen MR. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia*. 1997;40:454-62.

Mauldin JP, Srinivasan S, Mulya A, Gebre A, Parks JS, Daugherty A, Hedrick CC. Reduction in ABCG1 in Type 2 diabetic mice increases macrophage foam cell formation. *J Biol Chem*. 2006;281:21216-24.

Mauldin JP, Nagelin MH, Wojcik AJ, Srinivasan S, Skaflen MD, Ayers CR, Mcnamara CA, Hedrick CC. Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2008;117:2785-92.

Mcgillicuddy FC, De La Llera M, Hinkle CC, Joshi MR, Chiquoine EH, Billheimer JT, Rothblat GH, Reilly MP. Inflammation impairs reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 2009;119:1135-45.

Morita S, Shimajiri Y, Sakagashira S, Furuta M, Sanke T. Effect of exposure to non-esterified fatty acid on progressive deterioration 2 diabetes: a long-term follow-up of insulin secretion in patients with Type study. *Diabet Med*. 2012;29:980-5.

Malmström, R, Packard CJ, Caslake M, Bedford D, Stewart P, Yki-Järvinen H, Shepherd J, Taskinen MR. Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia*. 1997;40:454-62.

Manninen V, Tenkanen L, Koskinen P, Huttunen JK, Mänttari M, Heinonen OP, Frick MH. Joint effects of serum triglycerides and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study: implications for treatment. *Circulation*. 1992;85:37-45.

Maranhão R.C, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirat, MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*. 1993;28:691-6.

Maranhão, RC, Freitas FR, Strunz CM, Santos RD, Mansur AJ, Mansur AP. Lipid transfers to HDL are predictors of precocious clinical coronary heart disease. *Clin Chim Acta*. 2012;413:502-5.

Meyers, C.D, Kashyap ML. Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection. *Curr Opin Cardiol*. 2004;19:366-73.

Mitra S, Goyal T, Mehta JL. Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011;25:419-29.

Murad MH, Hazem A, Coto-Yglesias F, Dzyubak S, Gupta S, Bancos I, Lane MA, Erwin PJ, Berglund L, Elraiyah T, Montori VM. The association of hypertriglyceridemia with cardiovascular events and pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr Disord*. 2012;12:2.

Nakhjavani M, Esteghamati A, Esfahanian F, Ghanei A, Rashidi A, Hashemi S. HbA1c negatively correlates with LCAT activity in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;81:38-41.

Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Heine RJ, Holman RR, Sherwin R, Zinman B, Professional Practice Committee, American Diabetes Association, European Association For The Study Of Diabetes. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29:1963-72.

Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: biological and physiopathological consequences. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16:371-7.

Nobecourt E, Davies MJ, Brown BE, Curtiss LK, Bonnet DJ, Charlton F, Januszewski AS, Jenkins AJ, Barter PJ, Rye KA. The impact of glycation on apolipoprotein A-I structure and its ability to activate lecithin:cholesterol acyl transferase. *Diabetologia*. 2007;50:643-53.

Ohgami N, Miyazaki A, Sakai M, Kuniyasu A, Nakayama H, Horiuchi S. Advanced glycation end products (AGE) inhibit scavenger receptor class B type I . mediated reverse cholesterol transport: a new crossroad of AGE to cholesterol metabolism. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10:1-6.

Oliveira CP, Maranhão RC, Bertato MP, Wajchenberg BL, Lerario AC. Removal from the plasma of the free and esterified forms of cholesterol and transfer of lipids to HDL in type 2 diabetes mellitus patients. *Lipids Health Dis*. 2012;11:65.

Orasanu G, Plutzky J. The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(Suppl 5):S53-S42.

Park YM, Kashyap S, Major J, Silverstein RL. Insulin promotes macrophage foam cell formation: potential implications in diabetes-related atherosclerosis. *Lab Invest*. 2012;92:1171-80.

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

Pétremand J, Puyal J, Chatton JY, Duprez J, Allagnat F, Frias M, James RW, Waeber G, Jonas JC, Widmann C. HDLs protect pancreatic β -cells against ER stress by restoring protein folding and trafficking. *Diabetes*. 2012;61:1100-11.

Pistrosch F, Natali A, Hanefeld M. Is hyperglycemia_a cardiovascular risk factor? *Diabetes care*. 2011;34(Suppl 2):S128-S131.

Pyörälä K, Pedersen TR, Kjekshus J, Faergeman O, Olsson AG, Thorgeirsson G. Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Diabetes Care*. 1997;20:614-20.

Puk CG, Bocchi EA, Lo Prete AC, Ferreira SM, Stolf NA, Maranhão RC. Transfer of cholesterol and other lipids from a lipid nanoemulsion to high-density lipoprotein in heart transplant patients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2009;28:1075-80.

Quig DW, Zilversmit DB. Plasma Lipid Transfer Activities. *Annu Rev Nutr*. 1990;10:169-93.

Rashid S, Watanabe T, Sakaue T. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem*. 2003;36:421-6.

Ray KK, Seshasai SR, Wijesuriya S, Sivakumaran R, Nethcott S, Preiss D, Erqou S, Sattar N. Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Lancet*. 2009;373:1765-72.

Rehnborg CS, Nichols AV. The fate of cholesteryl esters in human serum incubated in vitro at 38 degrees. *Biochim Biophys. Acta*. 1964;84:596. 603.

Rocha MP, Maranhão RC, Seydell TM, Barcellos CRG, Baracat EC, Hayashida SAY, Bydlowski SP, Marcondes JAM. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and transfer of lipids to high-density lipoprotein in young obese and normal weight patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2010;93:1948-56.

Roehrich ME, Mooser V, Lenain V, Herz J, Nimpf J, Azhar S, Bideau M, Capponi A, Nicod P, Haefliger JA, Waeber G.. Insulin-secreting beta-cell dysfunction induced by human lipoproteins. *J Biol Chem* 2003; 278: 18368-75.

Rosenson RS, Brewer HBJR, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang XC, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH, Tall

AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012;125:1905-19.

Sánchez-Quesada JL, Vinagre I, Juan-Franco ED, Sánchez-Hernández J, Blanco-Vaca F, Ordóñez-Llanos J, Pérez A. Effect of improving glycemic control in patients with Type 2 Diabetes Mellitus on low-density lipoprotein size, electronegative low-density lipoprotein and lipoprotein-associated phospholipase A2 distribution. *Am J Cardiol*. 2012;110:67-71.

Santos RD, Hueb W, Oliveira AA, Ramires JA, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in subjects with or without coronary artery disease. *J Lipid Res*. 2003;44:464-9.

.

Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007;115:450-8.

Saydah SH, Eberhardt MS, Loria CM, Brancati FL. Age and the burden of death attributable to diabetes in the United States. *Am J Epidemiol*. 2002;156:714-9.

Schernthaner G, Kostner GM, Dieplinger H, Prager R, Mühlhauser I. Apolipoproteins (A-I, A-II, B), Lp(a) lipoprotein and lecithin: cholesterol acyltransferase activity in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1983;49:277-93.

Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol*. 2011;47:R1-10.

Siebel AL, Natoli AK, Yap FY, Carey AL, Reddy-Luthmoodoo M, Sviridov D, Weber CI, Meneses-Lorente G, Maugeais C, Forbes JM, Kingwell BA. Effects of high-density lipoprotein elevation with cholesteryl ester transfer protein inhibition on insulin secretion. *Circ Res*. 2013;113:167-75.

Soran H, Durrington PN. Susceptibility of LDL and its subfraction to glycation. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22:254-61.

Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, Meyer M, Heinrich K, Bahlmann FH, Mueller M, Horváth T, Doerries C, Heinemann M, Flemmer S, Markowski A, Manes C, Bahr MJ, Haller H, Von Eckardstein A, Drexler H, Landmesser U. Endothelial-vasoprotective effects of high density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation*. 2010;122:110-22.

Sposito, AC, Ventura LI, Vinagre CG, Lemos PA, Quintella E, Santos RD, Carneiro O, Ramires JA, Maranhão RC. Delayed intravascular catabolism of chylomicron-like emulsions is an independent predictor of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2004;176:397-403.

Sprandel MCO, Hueb W, Casella-Filho A, Segre A, Rezende PC, Carvalho AL, Favarato D, Maranhão RC, Ramires J, Kalil-Filho R. Lipid transfer to high density lipoproteins in type 2 diabetic patients with and without coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(Suppl):1623.

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

Taskinen MR, Kuusi T, Helve E, Nikkilä EA, Yki-Järvinen H. Insulin therapy induces antiatherogenic changes of serum lipoproteins in noninsulin-dependent diabetes. *Arteriosclerosis*. 1988;8:168-77.

Taskinen M.R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*. 2003;46:733-49.

Turnbull FM, Abraira C, Anderson RJ, Byington RP, Chalmers JP, Duckworth WC, Evans GW, Gerstein HC, Holman RR, Moritz TE, Neal BC, Ninomiya T, Patel AA, Paul SK, Travert F, Woodward M. Intensive glucose control and macrovascular outcomes in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52:2288-98.

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*. 1988;316:823-8.

Uehara Y, Engel T, Li Z, Goepfert C, Rust S, Zhou X, Langer C, Schachtrup C, Wiekowski J, Lorkowski S, Assmann G, Von Eckardstein A. Polyunsaturated fatty acids and acetoacetate downregulate the expression of the ATP-binding cassette transporter A1. *Diabetes*. 2002;51:2922-8.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998;352:837-53.

Vergès B. Abnormal hepatic apolipoprotein B metabolism in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2010;211:353-60.

Wang CS, Briggs MR. HDL: the metabolism, function and therapeutic importance. *Chem Rev*. 2004;104:119-23.

Wang J, Stan áková A, Soininen P, Kangas AJ, Paananen J, Kuusisto J, Ala-Korpela M, Laakso M. Lipoprotein subclass profiles in individuals with varying degrees of glucose tolerance: a population-based study of 9399 Finnish men. *J Intern Med*. 2012;272:562-72.

Yang H, Li X. The role of fatty acid metabolism and lipotoxicity in pancreatic β -cell injury: Identification of potential therapeutic targets. *Acta Pharm Sin B*. 2012;2:396. 402.

Younis NN, Soran H, Pemberton P, Charlton-Menys V, Elseweidy MM, Durrington PN. Small dense LDL is more susceptible to glycation than more buoyant LDL in Type 2 diabetes. *Clin Sci*. 2013;124:343-9.

Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M, Hazen SL. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2004;114:529-41.

Zilversmit DB, Hughes LB, Balmer J, Stimulation of cholesterol ester exchange by lipoprotein-free rabbit plasma, *Biochim Biophys Acta*. 1975;409:393. 8.