Alina Coutinho Rodrigues Feitosa

**Avaliação do metabolismo de lípidos em diabéticos tipo 1,
normolipidêmicos e sem complicações microvasculares e
macrovasculares significativas através de nanoemulsão
lipídica artificial**

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

Área de concentração: Endocrinologia
Orientador: Prof. Dr. Bernardo Léo
Wajchenberg

São Paulo
2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às quatro pessoas mais importantes da minha vida:

Gilson Soares Feitosa Filho, meu esposo, companheiro na vida afetiva, forte exemplo e incentivo na profissional.

Soraia Coutinho Rodrigues, irmã querida, irmanada também na profissão, meu ponto de apoio.

Aos meus queridos e dedicados pais, *Daniel Rodrigues e Altair Ribeiro Coutinho*, pela vida, por seus ensinamentos cotidianos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, luz infinita que abençoa meu caminho, agradeço todas as graças de minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Bernardo Léo Wajchenberg, por seu invejável ritmo de trabalho e produção científica, sua força e estilo ímpares, profissional que faz história na endocrinologia nacional e internacional, agradeço a honra de tê-lo como orientador e amigo.

Ao Prof. Dr. Raul Maranhão, pela oportunidade em conhecer o “mágico” mundo dos lípides através de seus experientes olhos e por expor-me ao universo da pesquisa básica, meu obrigada pelas orientações, conselhos, amizade e seu imprescindível auxílio na execução deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do INCOR pelo auxílio e apoio, pelos ensinamentos, eterna simpatia e aceitação.

Ao grupo do Núcleo de Excelência em Diabetes, destacando a Profa. Dra. Márcia Nery, pelo auxílio, disponibilidade, amizade e conhecimento.

À minha família pelo incentivo e força.

Aos meus cunhados e sogros, Sra. Ana Lúcia Freitas Feitosa e ao Prof. Dr. Gilson Feitosa, pelo apoio, orientações e exemplo de vida.

Especial agradecimento à madrinha Glória Fernandes, tia Fernandina Coutinho Coelho, tio Nilson Ribeiro Coutinho e primos.

Aos pacientes e voluntários colaboradores, minha gratidão, pois sem eles jamais seria possível a realização deste trabalho.

“Deus, dá-me a serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar, a coragem para mudar as coisas que posso mudar, e a sabedoria, para ver a diferença”.

Reinhold Niebuhr

“Ainda que eu ande pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, porque Tu estás comigo, e Tua vara e Teu cajado dão-me coragem”.

Salmo 23:4

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Diabetes Mellitus tipo 1, risco cardiovascular e lípidos plasmáticos	19
1.2 Metabolismo lipídico: enfoque nas lipoproteínas LDL e HDL e proteínas de transferência de lípidos em indivíduos não-diabéticos ...	20
1.3 Metabolismo lipídico em diabéticos tipo 1: anormalidades quantitativas e qualitativas das Lipoproteínas	28
1.3.1 Alterações quantitativas nas Lipoproteínas	28
1.3.2 Alterações qualitativas nas Lipoproteínas	31
1.3.2.1 Enriquecimento com Ésteres de Colesterol	31
1.3.2.2 Alterações no tamanho das Lipoproteínas	32
1.3.2.3 Lipoxidação, glicação e outras alterações qualitativas nas Lipoproteínas	33
1.3.3 Insulinoterapia e metabolismo lipídico em DM1	34
1.4 Resistência à insulina e perfil lipídico em diabetes tipo 1	36
1.5 Nanoemulsão lipídica artificial livre de proteína (LDE) para estudo do metabolismo lipídico	38
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	42
4 MÉTODOS	43
4.1 Local da pesquisa	43
4.2 Casuística	44
4.3 Avaliação dos participantes	46
4.3.1 Avaliação de complicações relacionadas à doença	46
4.3.2 Determinações bioquímicas	48
4.3.3 Avaliação da resistência à insulina nos DM tipo 1	49
4.3.4 Avaliação da cinética da nanoemulsão	50
4.3.4.1 Preparação da nanoemulsão lipídica artificial	50
4.3.4.2 Cinética plasmática do ³ H-colesterol e ¹⁴ C-éster de colesterol	51
4.3.4.3 Análise compartimental da curva de decaimento plasmático dos lípidos radioativos	52
4.4 Avaliação da taxa de esterificação da emulsão ³ H-colesterol	54
4.4.1 Descrição do procedimento	54
4.5 Avaliação qualitativa da HDL	56

4.5.1 Determinação do tamanho HDL	56
4.5.2 Transferência de lípidos radioativos das nanoemulsões para as HDL	57
4.6 Segurança radiológica	58
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
6 RESULTADOS	61
6.1 Características clínicas, determinações bioquímicas e transferência de lípidos da população	61
6.2 Cinética plasmática da nanoemulsão (LDE) em homens	62
6.3 Esterificação do ³ H-colesterol em 24 Horas	63
6.4 Correlações	64
6.4.1 Correlações da cinética de lípidos e transferência de lípidos para HDL com os índices de resistência à insulina e controle glicêmico	64
6.4.2 Correlações das transferências de lípidos para as HDL e cinética de acordo com o perfil lipídico e parâmetros clínicos	64
6.4.3 Correlações entre o tratamento insulinoterápico e cinéticas das nanoemulsões, transferência de lípidos para as HDL e esterificação	65
6.4.4 Correlações da esterificação do colesterol livre	65
6.4.5 Correlações do tamanho da HDL	65
7 DISCUSSÃO	66
7.1 Metabolismo lipídico em DM1 avaliado pela remoção da nanoemulsão com ¹⁴ C-éster de colesterol e ³ H-colesterol	67
7.2 Tamanho das partículas HDL	71
7.3 Transferências de lípidos da nanoemulsão (LDE) para as HDL ...	72
7.4 Esterificação do colesterol livre	77
7.5 Resistência à insulina e Metabolismo lipídico	78
7.6 Insulinização e Metabolismo lipídico	80
7.7 Considerações finais	81
8 CONCLUSÃO	82
9 ANEXOS	83
10 TABELAS E FIGURAS	87
11 REFERÊNCIAS	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Apo	Apolipoproteína
ATPIII	<i>Adult treatment panel III</i>
AACE	<i>American Association of Clinical Endocrinologists</i>
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CA	Circunferência abdominal
CE	Colesterol esterificado
CL	Colesterol livre
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
EGIR	<i>European Group for the study of Insulin Resistance</i>
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assesement insulin resistance</i>
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermediária
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IMC	Índice de massa corpórea
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LLP	Lipase lipoproteica

LH	Lipase hepática
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
MA	Microalbuminúria
PL	Fosfolípidos
PON	Paraoxonase
PAF-AH	Fator ativador de plaquetas acetilhidrolase
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípidos
PEG	Polietilenoglicol
QM	Quilomícrons
RCQ	Relação cintura-quadril
SR-BI	Receptores <i>scavenger</i> 1
TG	Triglicérides
TCGe	Estimativa de taxa de captação da glicose
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	<i>World Health Organization</i>
¹⁴ C-CE	Éster de colesterol marcado com carbono 14
¹⁴ C-PL	Fosfatidilcolina marcada com carbono 14
³ H-TG	Triglicérides marcados com trício
³ H-CL	Colesterol livre marcado com trício

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características antropométricas e clínicas, lípides e lipoproteínas plasmáticas, tamanho da partícula HDL e variáveis do metabolismo de carboidratos em diabéticos e não-diabéticos	87
Tabela 2 - Dados sobre tratamento insulínico	88
Tabela 3 - Avaliação de complicações microvasculares em diabéticos	88
Tabela 4 - Taxas de transferência de lípides da nanoemulsão para as partículas HDL em diabéticos e não-diabéticos	89
Tabela 5 - Características antropométricas e clínicas, lípides e lipoproteínas plasmáticas, tamanho da partícula HDL e variáveis do metabolismo de carboidratos em mulheres e homens diabéticos	90
Tabela 6 - Taxas de transferência de lípides da nanoemulsão para as partículas HDL em mulheres e homens diabéticos	91
Tabela 7 - Comparação de características antropométricas e clínicas, lípides e lipoproteínas plasmáticas, tamanho da partícula HDL e variáveis do metabolismo de carboidratos em mulheres diabéticas e não-diabéticas	91
Tabela 8 - Taxas de transferência de lípides da nanoemulsão para as partículas HDL em mulheres diabéticas e não-diabéticas	92

Tabela 9	- Comparação de características antropométricas e clínicas, lípides e lipoproteínas plasmáticas, tamanho da partícula HDL e variáveis do metabolismo de carboidratos em homens diabéticos e não-diabéticos	92
Tabela 10	- Taxas de transferência de lípidos da nanoemulsão para as partículas HDL em homens diabéticos e não-diabéticos	93
Tabela 11	- Taxas de remoção fracional (TRF em h-1) e taxas de transferência da nanoemulsão com marcação CE e CL em indivíduos com e sem diabetes	93
Tabela 12	- Taxa de esterificação (%) do ^3H -colesterol em 24 horas em homens diabéticos e não-diabéticos	94
Tabela 13	- Correlações entre cinética de lípidos, transferência de lípidos para HDL, variáveis clínicas, bioquímicas em diabéticos com índice de resistência à insulina	94
Tabela 14	- Correlação entre cinética de lípidos e transferência de lípidos em não-diabéticos com índices de resistência à insulina, variáveis clínicas e bioquímicas	95
Tabela 15	- Correlações entre a cinética de lípidos, transferência de lípidos para as HDL e esterificação do colesterol com o controle glicêmico em diabéticos	96

Tabela 16 - Correlações entre as transferências de lípidos das nanoemulsões para as HDL com parâmetros bioquímicos e antropométricos em indivíduos diabéticos	97
Tabela 17 - Correlações entre as transferências de lípidos da nanoemulsão para as HDL com parâmetros bioquímicos e antropométricos em indivíduos não-diabéticos	98
Tabela 18 - Correlações entre a cinética de lípidos, transferência de lípidos para as HDL e esterificação do colesterol com a insulino-terapia	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura básica de uma Lipoproteína	21
Figura 2	- Resumo do metabolismo lipídico: formação e metabolização das HDL e remoção das LDL	22
Figura 3	- HDL e sua composição	25
Figura 4	- Espectro de alterações lipídicas em vários graus de controle glicêmico e comparação com o indivíduo não-diabético	30
Figura 5	- Modelo compartimental utilizado para analisar a cinética plasmática do éster de colesterol da LDE	54
Figura 6	- Nanoemulsões com lípidos radiomarcados para avaliação da transferência de lípidos das nanoemulsões para as HDL	58
Figura 7	- Transferência de lípidos da nanoemulsão para as partículas HDL em diabéticos e não-diabéticos	100
Figura 8	- Curva da remoção plasmática (em h^{-1}) da emulsão ^{14}C -éster de colesterol em diabéticos e não-diabéticos em 24h.....	101

Figura 9	- Curva de remoção plasmática (h^{-1}) da nanoemulsão ^3H - colesterol em diabéticos e não-diabéticos em 24 horas	102
Figura 10	- Taxa de esterificação (%) do ^3H -colesterol em 24 horas em diabéticos e não-diabéticos	103

RESUMO

Feitosa, AC. *Avaliação do metabolismo de lípidos em diabéticos tipo 1, normolipidêmicos e sem complicações microvasculares e macrovasculares significativas através de nanoemulsão lipídica artificial* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2008.

INTRODUÇÃO: portadores de diabetes mellitus tipo 1 (DM1) apresentam, progressivamente, complicações vâsculo-neurais. Os fatores que aumentam o risco de coronariopatia - hipertensão, dislipidemia e idade avançada - explicam, em parte, a alta mortalidade cardiovascular, entretanto diabéticos tipo 1 podem morrer de coronariopatia precoce e não apresentar os fatores de risco clássicos para aterosclerose. Modificações estruturais e funcionais nas lipoproteínas, alterando a sua composição e trocas lipídicas poderiam justificar o aumento de eventos vasculares, entretanto estas alterações podem não ser detectadas através das dosagens rotineiras de lípidos plasmáticos.

OBJETIVOS: através de nanoemulsão lipídica artificial (LDE) que simula a estrutura lipídica da LDL avaliamos, em portadores de DM1, normolipidêmicos, intensivamente tratados e sem complicações significativas da doença, a taxa de esterificação do colesterol, a remoção da nanoemulsão da circulação, o tamanho da partícula HDL e as transferências de lípidos entre a nanoemulsão e as partículas HDL. Secundariamente, determinamos a influência do controle glicêmico, resistência à insulina (RI) e insulinização no metabolismo lipídico.

MÉTODOS: estudamos 36 indivíduos diabéticos e 37 controles não-diabéticos pareados para idade, sexo e índice de massa corpórea. Nanoemulsão lipídica artificial com marcação radioativa nos lípidos éster de colesterol (CE), colesterol livre (CL), triglicérides (TG) e fosfolípidos (PL) foi utilizada para os estudos. Nanoemulsão com marcação ^{14}C -CE e ^3H -CL foi injetada nos participantes e amostras de sangue foram coletadas durante 24 horas para mensuração da radioatividade. Remoção dos lípidos da circulação foi calculada por análise compartimental. A taxa da esterificação do colesterol livre foi calculada após extração e separação de lípidos do plasma por cromatografia em camada delgada. Para estudo da transferência de lípidos, nanoemulsões com marcação ^{14}C -CE e ^3H -CL ou ^{14}C -PL e ^3H -TG foram incubadas com plasma e a radioatividade dos lípidos transferidos para as HDL foi contada após a precipitação de lipoproteínas contendo apoB. O diâmetro da HDL foi mensurado por método de dispersão da luz. A RI nos diabéticos foi mensurada por fórmula que estima a taxa de captação da glicose.

RESULTADOS: hemoglobina glicada foi de $8,8 \pm 1,3$ mg/dl e concentrações de LDLc foram menores nos diabéticos (85 ± 22 vs. 98 ± 26 mg/dl), $p=0,035$. Não houve diferenças em relação às taxas de esterificação, transferências de lípidos da nanoemulsão para as HDL e tamanho da partícula HDL entre os grupos. Não encontramos relação entre as análises cinéticas e HbA1c, glicemia, índices de RI e dose de insulina. A taxa de remoção do ^{14}C -CE foi mais rápida em diabéticos tipo 1 que nos controles ($0,059 \pm 0,022$ vs. $0,039 \pm 0,022$ h^{-1}), $p=0,019$.

CONCLUSÕES: apesar de controle glicêmico ruim nos DM1, as transferências de lípidos da nanoemulsão para as HDL, a taxa de esterificação e a remoção da ^3H -CL são semelhantes às dos controles. O controle glicêmico, perfil lipídico, índices de RI e dose de insulina não influenciaram nas transferências de lípidos e na taxa de esterificação. A remoção do ^{14}C -CE é mais rápida em indivíduos diabéticos, o que poderia justificar as concentrações de LDLc mais baixas encontradas nesta população. Acreditamos que a terapia insulínica intensiva pode justificar estes achados.

Descritores: diabetes mellitus tipo 1, insulina, lipoproteínas, colesterol LDL, colesterol HDL, cinética, aterosclerose.

SUMMARY

Feitosa, AC. *Evaluation of lipid metabolism in normolipidemic type 1 diabetes individuals without significant clinical microvascular and macrovascular complications through artificial lipid nanoemulsion* São Paulo: University of São Paulo Medical School; 2008

INTRODUCTION: people with type 1 diabetes mellitus (DM1) have progressively neuro-vascular complications. Factors that increase the risk of coronary artery disease – hypertension, dislipidemia and advanced age – explains part of increased cardiovascular mortality, however some DM1 died of early coronary artery disease and often do not have atherosclerosis classical risk factors. Structural and functional changes in lipoproteins, altering their composition and activities of lipid exchange could justify the increase in vascular events but these changes are generally not detected by routine clinical laboratory plasma lipid exams. **OBJETIVES:** in normolipidemic DM1, intensively treated and without significant complications of disease we evaluated, by an artificial lipid nanoemulsion that resembles the lipid structure of LDL, rates of cholesterol esterification, nanoemulsion removal of the circulation, HDL particle size and lipid transfer from nanoemulsion to HDL. Secondly, we determine the influence of glycemic control, insulin resistance (IR) and insulinization on lipid metabolism. **METHODS:** we studied 36 diabetics and 37 non-diabetic controls paired by age, sex and body mass index. Artificial lipid nanoemulsion labeled with radioactive lipids cholesterol ester (CE), cholesterol (CL), phospholipids (PL) and triglycerides (TG) was used for studies. Intravenous infusion of nanoemulsion ^{14}C -CE e ^3H -CL was injected in participants and blood was sampled over 24 hours for radioactivity measurement. Circulation lipid removal was calculated through compartmental analysis. Rate of cholesterol esterification was calculated after lipid extraction and separation by thin-layer chromatography. Nanoemulsion was incubated with plasma and radioactivity of lipids ^{14}C -EC, ^3H -CL, ^{14}C -PL and ^3H -TG transferred to the HDL was quantified after the precipitation of other apoB lipoproteins. The HDL diameter was measured by laser light scattering. The insulin resistance in diabetic patients was measured by formula that estimates the rate of uptake of glucose. **RESULTS:** glycated hemoglobin was $8,8 \pm 1,3$ mg/dl and LDL concentrations were lower in diabetic patients (85 ± 22 vs. 98 ± 26 mg / dl), $p = 0,035$. There were no differences between groups regarding rates of cholesterol esterification, lipids transfer from nanoemulsion to HDL and HDL particle size. We found no relationship between the kinetic analyses and HbA1c, blood glucose, measures of IR and dose of insulin. The rate of removal of ^{14}C -EC was faster in diabetics type 1 than controls ($0,059 \pm 0,022$ vs. $0,039 \pm 0,022$ h $^{-1}$), $p = 0,019$. **CONCLUSIONS:** despite suboptimal glycemic control in diabetics, lipids transfer from nanoemulsion to HDL, rate of cholesterol esterification and removal of ^3H -CL are similar to those of non-diabetic individuals. Glycemic control, lipid profile, measures of IR and dose of insulin did not influence lipids transfer and rate of cholesterol esterification. Removal of ^{14}C -EC from diabetic circulation is faster than controls which could justify the

lower LDL concentration found in this population. We believe that intensive insulin therapy could explain these findings.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, insulin, lipoprotein, LDL cholesterol, HDL cholesterol, kinetic, atherosclerosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus tipo 1, risco cardiovascular e lípides plasmáticos

O diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) é causado por destruição das células beta pancreáticas, na maioria das vezes auto-imune, resultando em insulinopenia¹.

Em contraste com portadores de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) que frequentemente apresentam perfil lipídico pró-aterogênico caracterizado por hipertriglicemia, baixas concentrações de HDL colesterol (HDLc) e subfração LDL pequena e densa^{2, 3}, os portadores de DMT1 podem não apresentar dislipidemia. Quando submetidos a tratamento insulínico intensivo são encontradas concentrações de LDLc reduzidas e HDLc normais e até elevadas^{4, 5} comparados aos indivíduos pré-tratamento^{6, 7} e aos não-diabéticos^{8, 9}. Entretanto, a despeito do perfil lipídico e da menor freqüência de comorbidades associadas à aterosclerose como obesidade e hipertensão, os DMT1 são expostos a doença cardiovascular de forma semelhantes ou maior que os DMT2¹⁰.

As concentrações das lipoproteínas dependem de balanço entre produção e remoção¹¹ e, mesmo quando as concentrações estão normais, modificações estruturais alterando a composição e função de lipoproteínas podem torná-las mais aterogênicas ou reduzir o seu potencial antiaterogênico (HDL). Em DMT1 o metabolismo de lípidos é essencialmente dependente da insulinopenia¹² e variável conforme o grau¹³ e forma de insulinização¹³⁻¹⁶. A

insulina regula os níveis glicêmicos, atua em proteínas de transferência, nas lipases, no substrato de formação das lipoproteínas modificando concentrações e a composição dos lípides¹². Estes mecanismos relacionados com o status dos lípides plasmáticos não são aparentes na avaliação laboratorial usual, mas podem ser causa da acelerada aterogênese.

1.2 Metabolismo lipídico: enfoque nas lipoproteínas LDL e HDL e proteínas de transferência de lípidos em indivíduos não-diabéticos

Lipoproteínas são moléculas esféricas, insolúveis em água compostas de lípidos e proteínas, chamadas de apoproteínas. As lipoproteínas funcionam como veículos para transporte dos lípidos triglicérides, fosfolípidos, éster de colesterol e colesterol não-esterificado ou livre (figura 1). As moléculas hidrofóbicas de triglicérides e éster de colesterol estão contidas no centro da partícula e são envolvidas por uma monocamada de moléculas anfipáticas de fosfolípidos, colesterol livre e apoproteínas que formam um invólucro. As lipoproteínas exercem uma variedade de funções nas células como a manutenção de gradientes eletroquímicos, sinalização celular, estoque energético, trânsito de proteínas e ancoragem da membrana celular.

Figura 1. Estrutura básica de uma Lipoproteína

As lipoproteínas são geralmente caracterizadas em relação à sua densidade em quatro classes: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), LDL e lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Quilomícrons são os veículos de transporte das gorduras provindas da dieta. As VLDL são as carreadoras dos triglicérides endogenamente produzidos e são secretadas pelo fígado. As LDL são o produto catabólico das VLDL e geralmente são as principais carreadoras do colesterol. As HDL são as mais densas das lipoproteínas devido ao seu alto conteúdo protéico.

remodelação das HDL no espaço intravascular acontece através de lipases e proteínas de transferência de lípidos. A CETP promove a heterotroca de triglicérides de LRT por éster de colesterol (CE) das HDL, resultando em depleção de CE e enriquecimento de TG nas HDL. A PLTP medeia a transferência de PL para as HDL e promove a conversão HDL3 em HDL2 (modulação do tamanho e composição). A lipase hepática modifica as HDL ricas em TG liberando apoA-I pobre em lípidos e HDL remanescentes. Remanescentes de HDL (α -migrantes, lipoliticamente modificadas) podem ligar-se a receptores hepáticos que medeiam a captação, internalização e degradação da holopartícula. O receptor SR-BI pode contribuir para a modificação das partículas circulantes promovendo sua captação e degradação. QM, quilomícrons; LLP, lipase lipoproteica; HDL-R, receptor da holopartícula HDL; LDL-R, receptor de LDL; LH, lipase hepática; LE, lipase endotelial; PLTP, proteína de transferência de fosfolípidos; SR-BI, receptor *scavenger* tipo BI; CETP, proteína de transferência de éster de colesterol; LCAT, lecitina colesterol acil transferase.

Metabolismo das LDL

A LDL é o principal transportador de colesterol no plasma humano e contém a maior parte do colesterol circulante no sangue. Funciona como o transportador deste lípido no sangue para o fígado e para vários tecidos periféricos, onde é utilizado em diversos processos metabólicos, como síntese de hormônios e membranas celulares.

A LDL é o produto final de degradação da VLDL. O fígado secreta as VLDL ricas em triglicérides no plasma, onde adquirem apoC-II das HDL. Ao interagir com a lipase lipoproteica no endotélio capilar os triglicérides são

hidrolisados a ácidos graxos e glicerol. Cerca de metade dos remanescentes do catabolismo das VLDL - as IDL - serão captadas pelos receptores hepáticos que se ligam às apoE, para a degradação. A outra metade – partículas contendo apolipoproteína (apo) B-100, depletadas em triglicérides em relação ao éster de colesterol, são convertidas a LDL, rica em colesterol.

A LDL é uma partícula esférica, constituída de um núcleo apolar de ésteres de colesterol (aproximadamente 45-50% do peso lipídico total) e um resíduo de triglicérides estabilizado por uma monocamada de fosfolípidos, onde há também colesterol livre. A apoB-100 constitui a parte protéica da LDL e é o componente que liga as partículas da LDL a receptores específicos, os chamados receptores B, E, situados na superfície da membrana plasmática celular (figura 2). Depois da ligação, a LDL é internalizada e, após hidrólise dos lípidos do centro, o colesterol livre é usado pelas células¹⁷.

A regulação do receptor de LDL é o principal fator que controla as concentrações plasmáticas do colesterol de LDL. Defeitos no receptor ou na apo B-100 dificultam a captação celular da partícula, resultando na remoção plasmática deficiente da mesma e conseqüente aumento da concentração plasmática de colesterol de LDL.

A infiltração e retenção de LDL na íntima da parede arterial iniciam uma resposta inflamatória que culmina com a formação da placa aterosclerótica.

Metabolismo das HDL

As HDL são partículas que fazem parte de uma classe heterogênea de lipoproteínas de alta densidade e pequeno diâmetro¹⁸. São constituídas por lípidos e proteínas, sendo a apoA-I (apoA-I) o seu maior componente (figura). Faz parte de sua constituição ainda a apoA-II, a apoC, apoE, apoIV, apoD,

apoJ, apoL-I, apoM¹⁹⁻²¹, proteínas amilóide²², ceruloplasmina, transferrina, e enzimas: LCAT, paraoxonase (PON) e fator ativador das plaquetas acetilhidrolase (PAF-AH)²³.

Figura 3. HDL e sua composição
Adaptado de: Forti N, 2006²⁴.

HDL nascentes surgem de partículas pobres em lípidos ou a partir de apoproteínas livres de lípidos. ApoA-I é secretada predominantemente pelo fígado²⁵ e intestino²⁶ como apoA-I pobres em lípidos e partículas HDL nascentes, ricas em fosfolípidos e pobres em colesterol. Os precursores das HDL surgem também da interconversão das HDL2 e HDL3 pela proteína de transferência de CETP, PLTP e lipase hepática e dissociam-se dos quilomícrons e VLDL durante a hidrólise de triglicérides²⁷⁻³⁰. A maturação das HDL ocorre através da aquisição de fosfolípidos e colesterol não esterificado dos hepatócitos e células não hepáticas³¹. Este colesterol, em forma livre, é esterificado nas HDL pela LCAT. Desta forma, enriquecidas com ésteres de colesterol tornam-se partículas maiores (HDL2 e HDL3) que sofrerão ação de inúmeras proteínas e enzimas que propiciam sua remodelação. O colesterol é

retirado da circulação diretamente, por interação das HDL com receptores SR-BI³², ou indiretamente, através de lipoproteínas contendo apoB, que recebem os ésteres de colesterol das HDL mediados pela CETP (figura 2).

A HDL desempenha papel central no metabolismo lipídico. A sua concentração no plasma tem relação inversa com doença cardiovascular, mostrando ser protetora deste conjunto de doenças³³. A ateroproteção é frequentemente explicada pela capacidade única destas lipoproteínas em remover o colesterol dos tecidos periféricos, incluindo a parede arterial, e transportá-lo para o fígado para excreção – o denominado transporte reverso do colesterol^{34, 35}. A maior parte deste transporte é feito pelas HDL. As propriedades antiaterogênicas das HDL relacionam-se também a sua funcionalidade, assegurada pelas propriedades antioxidante, antitrombótica e antiinflamatória^{36, 37}.

Proteínas de transferência e de metabolização de lípidos

A concentração e a composição das lipoproteínas LDL e HDL são influenciadas por inúmeros fatores. Proteínas de transferência e metabolização de lípidos participam da remodelação, alteram a composição e até funcionalidade das lipoproteínas. São elas a lipase lipoproteica (LLP), a lipase hepática, a lipase endotelial, a LCAT, a CETP e a PLTP³⁸⁻⁴⁰.

A CETP circula no plasma ligada a lipoproteínas²⁰. Ela promove a redistribuição dos ésteres de colesterol e triglicérides hidrofóbicos entre as HDL e lipoproteínas contendo apoB (LDL, IDL e VLDL, QM e remanescentes). Esta troca resulta em HDL enriquecidas com triglicérides e depletadas em

ésteres de colesterol, com redução no tamanho da partícula e promove o enriquecimento das LDL com ésteres de colesterol.

A lipase hepática, produzida pelo fígado, hidrolisa os triglicérides e fosfolípidos da superfície das HDL ricas em triglicérides, reduzindo o seu tamanho.

A PLTP medeia a transferência de fosfolípidos de partículas ricas em triglicérides para as HDL durante a lipólise de triglicérides²⁰, medeia também a transferência do colesterol livre²⁰, lipopolissacarídeos⁴¹, diacilglicerol⁴² e alfa-tocoferol⁴³ e promove a conversão de HDL3 pequenas em partículas maiores HDL2⁴⁴ remodelando estas partículas por fusão com liberação de apoA-I delipídada⁴⁵

A LCAT é uma enzima chave para o metabolismo extracelular do colesterol. Esterifica o colesterol das HDL⁴⁶, maturando esta lipoproteína⁴⁷. Pode facilitar a captação do colesterol dos tecidos periféricos em partículas HDL pela manutenção de gradiente de concentração para o efluxo do colesterol livre.

Alterações na composição HDL podem modificar a sua funcionalidade. Formação de partículas HDL com atividade antiaterogênica atenuada está mecanicamente relacionada a enriquecimento do núcleo lipídico com triglicérides e depleção de ésteres de colesterol, alterações na conformação da apoA-I pelo amiloide sérico A e a modificação covalente dos componentes protéicos HDL por oxidação⁴⁸ e glicação^{49, 50}.

1.3 Metabolismo lipídico em diabéticos tipo 1: anormalidades quantitativas e qualitativas das Lipoproteínas

1.3.1 Alterações quantitativas nas Lipoproteínas

O metabolismo das lipoproteínas no diabético tipo 1 é obrigatoriamente influenciado pelo requerimento de insulina. Espectro de situações compreende desde a ausência total de insulina no estado de cetoacidose com grande elevação de glicose, ácidos graxos livres, cetonas e hormônios lipolíticos; à situação de administração contínua de insulina subcutânea, resultando em hiperinsulinemia periférica e concentrações normais a quase normais de glicose e ácidos graxos livres^{12, 51} (figura 4).

Estados de deficiência severa de insulina: durante cetoacidose, quando há severa deficiência de insulina, hipertrigliceridemia pode ser encontrada e é causada primariamente pela deficiência da atividade da lipase lipoproteica com redução da metabolização de lipoproteínas ricas em triglicérides⁵². O aumento da lipólise leva a mobilização e influxo de ácidos graxos livres para o fígado e excessiva produção de VLDL. Como resultado, a concentração de triglicérides pode ficar bastante elevada, pela associação dos dois fenômenos mencionados¹².

A LDL pode estar aumentada pela redução da remoção fracional, pois a insulina parece potencializar a ligação com o receptor. O aumento da LDL pode dever-se também a maior produção da VLDL precursora. A HDL pode estar reduzida devido a deficiência da LLP⁵³.

Insulinização subótima e controle glicêmico moderado: mesmo com o controle glicêmico moderado e insulinização subótima pode ainda existir elevação de VLDL devido à persistência de reduzida remoção da partícula e aumento da produção por maior disponibilidade de substrato (ácidos graxos livres) para o fígado. Desta forma, LDL também pode elevar-se. A HDL pode estar normal ou aumentada por aumento da atividade da LLP⁵³ e PLTP⁴⁵.

Insulinoterapia intensiva e controle glicêmico rigoroso: com grandes quantidades de insulina na circulação periférica a remoção das VLDL é normal. As taxas de produção das VLDL podem cair a concentrações subnormais devido ao excesso de insulina que pode suprimir a formação de VLDL hepática. Nesta situação diabéticos podem ter concentrações normais ou reduzidas de VLDLc. Conforme melhora o controle glicêmico, o metabolismo da LDL retorna ao normal podendo ser encontradas concentrações reduzidas de LDLc. As concentrações de HDL podem estar normais e freqüentemente encontram-se elevadas¹². O aumento do HDLc é atribuído ao aumento das partículas de HDL2⁵⁴⁻⁵⁶, pois insulina, em concentrações periféricas elevadas, superativa a PLTP e pode levar a fusão de partículas HDL, aumentando as HDL2 e, adicionalmente, coexiste diminuição da lipase hepática, que está associada a maior taxa HDL2/HDL3, e o aumento da atividade da LLP, que promove a hidrólise de triglicérides de partículas ricas e a dissociação da apoA-I, principal componente HDL.

Figura 4. Espectro de alterações lipídicas em vários graus de controle glicêmico e comparação com o indivíduo não-diabético
Adaptado de Howard B, 1987¹².

Na deficiência extrema de insulina como a cetoacidose diabética, a atividade da lipase lipoproteica é mínima e hipertrigliceridemia extrema pode ocorrer devido à redução da depuração da VLDL. Pode haver diminuição das concentrações das HDL por redução da transferência de lípidos das VLDL para as HDL. Em indivíduos pobre ou moderadamente controlados, as concentrações de VLDL podem ser elevadas devido a LLP subótima e superprodução de VLDL induzida pelo substrato hepático excessivo de AGL e glicose. LDL pode elevar-se devido ao aumento da VLDL, seu precursor, além de inadequada insulina para a depuração. Nos indivíduos em insulino-terapia intensiva, a produção de VLDL reduz-se provavelmente devido a diminuição dos AGL ao fígado. Nesta situação as concentrações de HDL podem ser

elevadas devido a aumento de sua produção. AGL = ácidos graxos livres; LLP = lipase lipoproteica; ↓ = redução da atividade; ↑ = aumento da atividade.

1.3.2 Alterações qualitativas nas Lipoproteínas

A ausência de anormalidades nas concentrações de lipoproteínas em DM1 com controle glicêmico razoável a bom não exclui a possibilidade de anormalidades qualitativas nestas lipoproteínas. Alterações na composição das lipoproteínas, tamanho e propriedades são encontradas em DM1. Diversas modificações podem acometer as lipoproteínas como o enriquecimento com ésteres de colesterol, alterações no tamanho das lipoproteínas, lipoxidação, glicação e alterações induzidas pela insulino-terapia.

1.3.2.1 Enriquecimento com Ésteres de Colesterol

A taxa de lípidos e proteínas entre as lipoproteínas varia determinando a sua heterogeneidade. Os ésteres de colesterol e triglicérides estão contidos no centro da partícula e podem ser trocados entre as subclasses de lipoproteínas através da CETP. A CETP realiza a troca de triglicérides das partículas contendo apoB por ésteres de colesterol das HDL e, sob a ação das lipases plasmáticas, principalmente a lipase hepática⁵⁷, os triglicérides podem ser hidrolisados a ácidos graxos livres. No DM1, a atividade da CETP pode estar aumentada⁵⁸, enriquecendo as partículas HDL com triglicérides⁵⁸. Pode haver aumento da razão colesterol: apoB nas VLDL e LDL^{17, 58}.

Partículas enriquecidas em triglicérides podem sofrer a ação da lipase hepática, que está aumentada, especialmente em DM1 com aumento de obesidade visceral⁵⁹ originando partículas menores e mais densas (ricas em colesterol e pobre em triglicérides)^{12, 55, 56}, prejudicadas em funcionalidade.

1.3.2.2 Alterações no tamanho das Lipoproteínas

O tamanho e distribuição das subfrações das lipoproteínas podem estar alterados no DM1. Pode haver menor quantidade de partículas VLDL a custas de menor número de VLDL de tamanho médio. Pode haver menos LDL grandes, maior quantidade de LDL pequenas e também redução do tamanho médio das lipoproteínas LDL⁶⁰. O tamanho médio das partículas HDL é, em geral, maior que nos indivíduos não diabéticos e a custa de maior número de HDL2 e menos HDL3⁶⁰

Estas anormalidades no tamanho das lipoproteínas são mais evidentes em diabéticos pobremente controlados e com morbidades relacionadas aos órgãos alvo (retinopatia, nefropatia). A presença de calcificação coronariana, marcador de doença aterosclerótica está associada a maiores concentrações de VLDL, sem alterações nas outras subclasses de partículas e tamanho das partículas⁶⁰.

1.3.2.3 Lipoxidação, glicação e outras alterações qualitativas nas Lipoproteínas

Processos de lipoxidação e glicação (modificação química por produtos da peroxidação lipídica e por glicose, respectivamente), podem contribuir para o surgimento de alterações qualitativas nas lipoproteínas dos diabéticos. Lipoproteínas LDL modificadas por oxidação participam dos eventos precoces que desencadeiam aterosclerose⁶¹. A glicação acelera a oxidação das LDL⁶², e LDL glico-oxidadas são mais facilmente captadas pelos macrófagos (receptores *scavengers*) induzindo a captação de ésteres de colesterol nestas células⁶².

Apesar de estarem em concentrações normais a elevadas nos DM1, as partículas HDL também sofrem glicação⁶³, o que pode levar a anormalidades na função das HDL como redução da atividade da paraoxonase e não inibição da adesão de monócitos às células endoteliais⁵⁰. A paraoxonase é uma enzima sérica que possui ação antioxidante, protegendo a lipoproteína LDL de modificações lipídicas. As HDL de diabéticos podem estar depletadas em triglicérides⁶⁴ e ter menores concentrações de paraoxonase⁶⁵ com redução de sua atividade^{66, 67}. Estas alterações da qualidade e função das HDL podem interferir com sua ação antiaterogênica e contribuir para a aceleração da aterosclerose nos DM 1.

Além disso, a atividade da proteína de transferência do éster de colesterol pode estar aumentada em diabéticos tipo 1⁵⁸. A aceleração da transferência de éster de colesterol pode ser deletéria, pois sobrecarrega em ésteres de colesterol as lipoproteínas contendo apo B transformando-as em

partículas ricas em colesterol, mais densas e mais aterogênicas. Estas lipoproteínas enriquecidas são mais susceptíveis a oxidação e glicação e podem ser direcionadas a sítio de catabolismo não-hepático como os macrófagos da parede arterial⁵⁷.

1.3.3 Insulinoterapia e metabolismo lipídico em DM1

Após o estudo DCCT, que verificou a superioridade da insulinoterapia intensiva no tratamento do diabetes mellitus tipo 1, recomenda-se o uso de terapia insulínica intensiva para todos os diabéticos tipo 1 objetivando redução da hemoglobina glicada para menos que 7%⁶⁸. Insulinoterapia intensiva, no DCCT, foi definida como administração de insulina três ou mais vezes ao dia por injeção ou bomba subcutânea⁶⁸ com dose ajustada de acordo com a automonitorização da glicemia capilar realizada pelo menos quatro vezes ao dia. A insulinoterapia visa mimetizar a natureza, limitando a hiperglicemia pós-prandial e prevenindo hipoglicemia entre as refeições.

O controle da glicemia depende de balanço entre a produção de glicose pelo fígado e a utilização da glicose pelos tecidos dependentes de glicose como músculo e tecido adiposo e os independentes de glicose como o cérebro. Apesar dos períodos de jejum e pós prandial, os níveis de glicemia mantêm-se, em indivíduos não-diabéticos, entre estreita faixa de 70 a 120mg/dl. A insulina é um hormônio anabólico e promove estoque de substratos no tecido adiposo, fígado e músculo estimulando a lipogênese, síntese protéica e de glicogênio, inibindo a lipólise, glicogenólise e quebra de proteínas além de estimular o crescimento e diferenciação celular. A insulina é

a responsável pela captação de glicose nos tecidos dependentes de insulina: fígado, músculo e tecido adiposo⁶⁹. O objetivo da insulinização intensiva é adequadamente substituir os variáveis requerimentos de insulina ao longo do dia através de apropriada combinação de insulinas de ação curta e intermediária, mimetizando a natureza na limitação da hiperglicemia pós-prandial e prevenção da hipoglicemia interprandial⁷⁰

Tanto hiperglicemia e insulinopenia desempenham papéis importantes na promoção de alterações quantitativas e qualitativas nas lipoproteínas dos diabéticos. Variáveis situações são encontradas desde a ausência total de insulina no estado de cetoacidose diabética, com grande elevação da glicose, ácidos graxos livres, cetonas e hormônios lipolíticos, à situação de administração de insulina sob infusão contínua resultando em excesso de insulina plasmática periférica com glicemia e ácidos graxos livres quase normais.

Os diversos graus de insulinização alteram as quantidades das lipoproteínas e concentrações de colesterolemia (figura 4) e também a composição. A insulina exerce ações sobre as proteínas e enzimas que atuam na remodelação. É capaz de hiperativar a lipase lipoproteica¹⁵, a PLTP⁷¹ e a CETP^{15, 57} e atividade da lipase hepática¹⁴. Desta forma a insulinização normaliza a hidrólise das partículas ricas em triglicérides, reduzindo a trigliceridemia e restaurando as concentrações das HDL, e ainda promove o aumento das HDL2 por fusão induzida pela PLTP. O aumento da atividade da CETP enriquece as partículas com triglicérides.

A forma de administração da insulina também interfere com na produção, depuração e qualidade das lipoproteínas. Todos os graus de

insulinização resultam em distribuição não fisiológica de insulina, com maiores concentrações na circulação periférica que na circulação portal^{12, 72, 73}. A injeção subcutânea da insulina é absorvida e drena para a circulação periférica e não para a portal. Desta forma, para atingir adequadas concentrações portais para controle glicêmico, necessariamente existirá hiperinsulinemia periférica^{72, 73}.

Administração intraperitonal, mimetizando secreção fisiológica de insulina é capaz de restaurar atividade de CETP, da lipase lipoproteica, diminuir conteúdo de triglicérides das LDL e HDL e normalizar razão HDL2/HDL3^{14, 15}.

1.4 Resistência à insulina e perfil lipídico em diabetes tipo 1

Alterações no perfil e composição dos lípidos são encontradas nos estados de resistência à insulina. Caracteristicamente predomina a hipertrigliceridemia pós-prandial, formação de LDL, VLDL e HDL ricas em triglicérides, formação de partículas LDL pequenas e densas e redução das concentrações das HDL. Para a determinação dos estados de resistência à insulina utilizam-se critérios clínicos e laboratoriais. Características fenotípicas e laboratoriais como redução das concentrações das HDL, hipertrigliceridemia, hipertensão arterial sistêmica, obesidade visceral sugerem a presença de resistência à insulina. O padrão ouro para determinação da resistência à insulina é a mensuração da taxa de captação de glicose mediante infusão de insulina e glicose através do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico.

A presença de resistência à insulina está associada a alterações qualitativas das lipoproteínas. Está relacionada com menor tamanho das LDL, maiores concentrações desta partícula, maior número de LDL pequenas e intermediárias e menor número de LDL grandes. A resistência à insulina associa-se também a alterações nas HDL e triglicérides. São encontrados números reduzidos de HDL grandes e reduções no tamanho das HDL, além de aumento das concentrações de triglicérides e VLDL, principalmente das menores partículas⁷⁴.

Apesar de insulinoopenia ser a causa do diabetes tipo 1, resistência à insulina também pode estar presente nestes indivíduos^{75, 76}. O próprio tratamento, insulino terapêutico intensivo tem sido responsabilizado como fator adjuvante no desenvolvimento da resistência à insulina na medida em que promove ganho de peso em deletéria distribuição visceral⁵⁹. Quando presente no diabético do tipo 1 a denominação “double diabetes” tem sido usada⁷⁷. Está relacionada a perfil lipídico desfavorável como concentrações aumentadas de triglicérides, LDLc e apoB com aumento de LDL pequena e densa e redução de HDL2 e com calcificação coronariana⁷⁸ e doença cardiovascular⁷⁹.

A estimativa de resistência à insulina em DM1 é difícil pois as formas mais simples como o modelo de homeostase não é aplicável para este grupo de pacientes⁸⁰. O uso de técnicas de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico impõe a dificuldade do trabalho e invasibilidade na mensuração. Clinicamente, a RI pode ser reconhecida através de grandes requerimentos de insulina, entretanto a TCGe foi desenvolvida⁸¹ e validada para estimar RI em DM1. A prática e clínica para síndrome metabólica do International Diabetes Federation (IDF) parece ter pouca utilidade clínica para distinguir diabéticos

tipo 1 com maior probabilidade de desenvolver doença micro e macrovascular⁷⁹.

1.5 Nanoemulsão lipídica artificial livre de proteína (LDE) para estudo do metabolismo lipídico

Mensuração das concentrações de lípidos e lipoproteínas plasmáticas são estimativas estáticas, tradicionalmente empregadas para caracterizar distúrbios lipídicos. O metabolismo de lipoproteínas é complexo e concentrações plasmáticas anormais podem resultar de alterações nas taxas de produção, conversão ou catabolismo de várias partículas. Estudos da cinética plasmática da LDL em humanos são úteis para o entendimento do metabolismo destas lipoproteínas, porém estudos cinéticos são trabalhosos devido às dificuldades de isolamento, marcação radioativa da LDL natural e a necessidade do uso da lipoproteína autóloga carrega consigo o risco de contaminação.

O laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração (INCOR HCFMUSP) reproduziu o metabolismo da LDL através de nanoemulsão rica em colesterol denominada LDE que se assemelha LDL natural em sua estrutura lipídica. A nanoemulsão lipídica artificial tem sido utilizada para investigação do metabolismo lipídico e dislipidemias. A nanoemulsão é desprovida de proteína e ao ser injetada na circulação plasmática, em contato com as lipoproteínas naturais, adquire várias apolipoproteínas de baixo peso molecular incluindo a apoE⁸². A aquisição da apoE permite que as partículas da nanoemulsão se liguem aos receptores de

LDL, podendo ser captadas pelas células⁸². Estudos de competição em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com a LDE pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico, presumidamente o receptor de LDL (LDLR)⁸³ sendo que a LDE apresenta, mais afinidade pelos receptores da LDL que a própria LDL natural⁸⁴.

A nanoemulsão lipídica contendo LDE tem se mostrado um importante instrumento de pesquisas para detalhamento do metabolismo da LDL natural^{83, 85-87}. O estudo comportamento cinético plasmático da nanoemulsão marcada com oleato de colesterol radioativo (representando o éster de colesterol) fornece subsídios para avaliação do metabolismo de lipoproteínas, pois se comporta, cineticamente, como a LDL natural, refletindo, o estado do receptor desta lipoproteína⁸³. A avaliação da cinética da nanoemulsão marcada com colesterol radioativo (representando o colesterol livre) tem sugerido um mecanismo adicional no modelo de aterogênese visto que a dissociação do colesterol livre da partícula e captação pela parede vascular foi identificado na parede arterial portadores de doença arterial coronariana⁸⁸.

A utilidade da nanoemulsão lipídica artificial como ferramenta para testar os mecanismos da remoção da LDL do plasma tem sido demonstrada em vários estudos experimentais⁸⁴ e em humanos^{83, 87}, onde os resultados da cinética plasmática obtidas seriam os mesmos esperados para a LDL nativa. A remoção da nanoemulsão marcada com éster de colesterol foi mais lenta em hipercolesterolemia familiar⁸³, onde a função do receptor da LDL é defeituosa, e, acelerada em pacientes com leucemia mielóide aguda não tratada⁸⁷ devido a superexpressão dos receptores de LDL existente em células neoplásicas⁸⁹.

Por outro lado, após a remissão mediada pela quimioterapia, a remoção da nanoemulsão diminui devido a destruição das células neoplásicas com receptores superexpressos, com conseqüente aumento na concentração do colesterol LDL⁸⁷. A taxa de remoção fracional tem correlação inversa com a idade⁸⁵, corroborando a documentação de redução da expressão do receptor de LDL relacionada a idade⁹⁰. Em mulheres em uso de estrogênios⁹¹ e indivíduos portadores de lúpus em uso de cloroquina⁹², o encontro de concentrações menores de colesterol LDL foi compatível com a demonstração de aumento na taxa de remoção fracional.

As vantagens que a nanoemulsão oferece sobre a lipoproteína natural são: facilidade de preparo e marcação, possibilidade de estudar um grande número de indivíduos com uma única preparação e modificar a composição química das partículas para determinar o efeito de cada componente no metabolismo. É possível, adicionalmente, avaliar outros aspectos do metabolismo lipídico como a esterificação do CL, atividade de proteínas de transferência e mecanismo de captação celular.

Oferece uma adicional vantagem operacional: encurta o período de coletas de amostras de plasma para determinar a curva de decaimento radioativo, pois a nanoemulsão é removida mais rapidamente da circulação que a LDL natural pela maior afinidade da apoE pelo receptor⁸³.

2 JUSTIFICATIVA

Os estudos cinéticos das lipoproteínas têm servido, durante anos, para prover novos e importantes conhecimentos sobre o metabolismo lipídico. Dentre os vários métodos utilizados, a nanoemulsão lipídica artificial que simula o comportamento da LDL e funciona como doadora de lípidos revela-se um instrumento útil para estudar o metabolismo lipídico e nunca foi utilizada para avaliação do metabolismo em diabéticos tipo 1. Em diabéticos normolipidêmicos, alterações no metabolismo da LDL e HDL podem predispor à aterosclerose e não serem identificadas através de dosagens laboratoriais rotineiras. A avaliação da cinética das lipoproteínas LDL, transferências de lípidos para HDL, esterificação do colesterol livre e tamanho da partícula HDL em diabéticos tipo 1 possibilita verificar eventuais alterações na composição e função das lipoproteínas que podem auxiliar no esclarecimento de mecanismos de aterogênese nestes indivíduos.

3 OBJETIVOS

1. Avaliar a concentração, cinética plasmática e transferências de lípidos das lipoproteínas nos indivíduos diabéticos tipo 1 adultos, sem complicações significativas relacionadas ao diabetes, normolipidêmicos e em insulinização intensiva comparados a indivíduos controles não-diabéticos

Determinamos:

Concentração de lípidos (colesterol total e frações, triglicérides) e apolipoproteínas A1 e B.

Cinética plasmática da LDL através nanoemulsão lipídica artificial marcada com éster de colesterol e colesterol livre radioativos.

Tamanho das partículas HDL através do “*light laser scattering*”.

Capacidade aceptora da HDL através das transferências de éster de colesterol, colesterol livre, triglicérides e fosfolípidos radioativos da nanoemulsão para as partículas HDL.

Taxa de esterificação do colesterol livre.

2. Avaliar a influência da resistência à insulina, do controle glicêmico agudo e crônico e da insulinoterapia no perfil lipídico, cinética de lípidos, transferência de lípidos para as HDL e taxas de esterificação do colesterol livre.

4 MÉTODOS

O projeto de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A todos os participantes foi solicitado consentimento livre e esclarecido, por escrito, após detalhada explicação feita pessoalmente pelo pesquisador responsável.

O estudo realizado foi do tipo corte transversal, com indivíduos pareados para sexo, idade e índice de massa corpórea.

4.1 Local da pesquisa

Os indivíduos diabéticos foram recrutados do ambulatório de diabetes do Serviço de Diabetes da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e os controles, do hospital e da comunidade. As coletas de sangue e os estudos cinéticos foram realizados no laboratório de Metabolismo de Lípidos no Instituto do Coração (INCOR). Parte das amostras de sangue foi encaminhada ao Laboratório de Instituto Central do Hospital das Clínicas para determinação do perfil lipídico, glicemia de jejum e hemoglobina glicada. A insulinemia foi mensurada no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42 do HCFMUSP.

4.2 Casuística

Foram incluídos 36 indivíduos diabéticos tipo 1 adultos e 37 controles não-diabéticos. O diabetes tipo 1 foi definido como diabetes diagnosticado abaixo dos 25 anos e insulino-dependência em até 1 ano após diagnóstico ou diabetes insulino-dependente com qualquer idade e pelo menos um anticorpo positivo (anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico, anticorpo anti tirosina fosfatase, anti ilhotas) provenientes do ambulatório de diabetes do Serviço de Diabetes da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Os ambulatórios de diabetes são subdivididos quanto o tipo de diabetes (tipo 1, tipo 2 e outros tipos), pela presença ou ausência de complicações e por faixa etária (crianças e adultos) e todos os indivíduos recebem insumos para o seu tratamento. A partir de 131 pacientes acompanhados regularmente selecionamos os diabéticos tipo 1 do ambulatório de diabetes tipo 1 denominado de “sem complicações relacionadas à doença” com idade entre 18 a 42 anos. Reavaliamos as complicações e incluímos os indivíduos sem complicações macro e microvasculares e os com complicações mínimas microvasculares relacionadas à doença que foram definidas como: retinopatia não proliferativa leve, microalbuminúria entre 30 a 50mg em 24 horas e neuropatia periférica com teste do monofilamento revelando hipossensibilidade em pelo menos 2 de 06 pontos testados podendo apresentar teste da percepção da vibração alterado ou não, sem história de lesão não percebida, ulceração ou amputação. Todos os diabéticos são regularmente acompanhados e recebem insulinoterapia.

Foram excluídos indivíduos em uso de hipolipemiantes, inibidores de proteases, drogas imunossupressoras, doses altas de aspirina, corticóides, transplantados, cirróticos, portadores de neoplasias, doenças inflamatórias crônicas (como lúpus, doença inflamatória intestinal, artrite reumatóide), insuficiência renal com depuração de creatinina abaixo de 60ml/min, indivíduos em programa de diálise e diabéticos com as seguintes complicações relacionadas à doença: retinopatia diabética não-proliferativa moderada a severa, retinopatia proliferativa, nefropatia com redução da depuração da creatinina, microalbuminúria acima de 50mg/24 horas ou macroalbuminúria, neuropatia autonômica, neuropatia periférica com prévia amputação, lesão não percebida ou ulceração em pés e doença arterial periférica, carotídea e coronariana.

Os controles não-diabéticos foram recrutados através de convite verbal a indivíduos aparentemente saudáveis e com idade abaixo de 45 anos. Foram incluídos indivíduos sem história de diabetes mellitus, sem história de tolerância a glicose diminuída e glicemia de jejum alterada e com pelo menos uma glicemia de jejum no último ano menor que 100 mg/dl, não parentes dos casos e sem uso de medicações crônicas (inibidores de proteases, drogas imunossupressoras, doses altas de aspirina e corticóides).

A todos os participantes foi questionada a presença de dislipidemia e feita consulta a exame laboratorial de perfil lipídico realizado no último ano. Perfil lipídico e nova glicemia em jejum foram repetidos no laboratório que realizou as mensurações do estudo antes da inclusão dos controles nas análises.

4.3 Avaliação dos participantes

Todos os indivíduos foram submetidos à entrevista com questionário padronizado (anexo 1), exame físico direcionado a pesquisa de complicações (anexo 2), avaliação para presença de complicações relacionadas à doença (anexo 3), determinações bioquímicas e estudos cinéticos e funcionais das lipoproteínas.

4.3.1 Avaliação de complicações relacionadas à doença

Todos os dados foram extraídos dos prontuários dos pacientes que são acompanhados regularmente no ambulatório de diabetes do Hospital das Clínicas. A avaliação dos diabéticos segue as recomendações da Associação Americana de Diabetes⁹³

Retinopatia – relato escrito de avaliação fundoscópica em midríase por oftalmologista do Hospital das Clínicas no último ano que antecedeu o estudo.

Nefropatia – relato em prontuário eletrônico de microalbuminúria em urina de 24 horas no último ano, estimativa da depuração de creatinina estimado pela fórmula de Crockroft-Gault e excreção de creatinina em 24 horas corrigida pela área de superfície corpórea. Foram avaliados também concentrações de uréia e creatinina. Foi definido como microalbuminúria positiva a presença de 2 medidas em que a excreção de albumina estivesse entre 30 a 300 mg/24 horas (afastado descontrole glicêmico, insuficiência cardíaca descompensada, febre e infecção do trato urinário) e macroproteinúria quando acima deste valor. Alterações na depuração de

creatinina foram definidas como hiperfiltração quando acima de 100ml/min em mulheres e acima de 120 ml/min em homens e redução de depuração quando abaixo de 60ml/min.

Neuropatia periférica – avaliação de rastreamento feita através do teste do monofilamento de 10g que avalia integridade de fibras finas e o teste do vibração pelo diapásio 128hz.

Teste do monofilamento foi considerado alterado quando houve falta de percepção da sensação do toque na plantas dos pés em 2 dos seis pontos testados (1º, 3º e 5º pododáctilos e 1º, 3º e 5º cabeças dos metatarsos) em pelo menos um dos pés. Teste do diapásio foi considerado alterado quando o indivíduo não percebia o início da vibração em pelo menos 2 de quatro tentativas (2 em cada pé) em quaisquer dos pés.

Neuropatia autonômica: medidas da frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) em repouso (sentado) e após um minuto, em ortostase, foram avaliados de todos os pacientes. Neuropatia autonômica será definida quando houver queda da pressão arterial sistólica após ortostase em 20mmHg e na diastólica em 10mmHg associada à variabilidade menor do que 10% na frequência cardíaca, excluindo-se depleção volêmica.

Doença Macrovascular:

Coronariopatia: foi considerado como portador de doença arterial coronariana (DAC) o paciente que tivesse história prévia e documentada de angina ou infarto agudo do miocárdio ou intervenção cardíaca de revascularização ou exames invasivos ou não-invasivos que comprovassem DAC (cintilografia miocárdica de perfusão, testes de esforço, ecocardiografia de estress, eletrocardiograma, cateterismo cardíaco).

Doença arterial periférica de membros e carótidas: foi considerado como portador aterosclerose carotídea os pacientes que apresentem sopros carotídeos ao exame físico, relato de placas em carótidas ou exame de imagem que documente alteração. Consideramos como portadores de doença arterial periférica (DAP) de membros os indivíduos com história consistente com claudicação de membros inferiores, história de revascularização de membros, índice tornozelo-braquial $< 0,9$, pulsos periféricos diminuídos ou exame de imagem que confirme a DAP.

4.3.2 Determinações bioquímicas

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

As concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total, HDL, VLDL e glicemia foram mensuradas através do método enzimático colorimétrico automatizado e o colesterol de LDL foi mensurado pelo método cinético automatizado. As concentrações plasmáticas de apo A1 e B foram determinadas pela turbidimetria (Roche/ Hitachi – Roche Diagnostics – Mannheim).

Mensuramos a hemoglobina glicada, utilizando sangue total, pelo método HPLC, certificado pelo National Glyco Hemoglobin Standardization Program (NGSP-EUA), considerando como valor normal entre 4,1 a 6,0%.

Estes exames foram realizados na Divisão de laboratório central do HCFMUSP.

A determinação quantitativa da insulina no soro foi feita no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42 do HCFMUSP. Foi utilizado o sistema de imuno-ensaio automatizado autodelfia, da Perker-Elmer Life Science, Wallac, Oy, Finland. A sensibilidade analítica é tipicamente melhor que 0,5uU/ml (3 pmol/L), tem baixa reação cruzada com outras espécies de insulina e apresenta coeficiente de variação intra e interensaio de 1,5 e 2%, respectivamente.

4.3.3 Avaliação da resistência à insulina nos DM tipo 1

Avaliamos o grau de sensibilidade à insulina através da taxa de captação da glicose estimada (TCGe) por fórmula obtida a partir de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico⁸¹, que é o padrão ouro para determinação da resistência à insulina. Esta fórmula, criada por Willians KW e col⁸¹ estima a presença de resistência à insulina em diabéticos tipo 1 a partir de variáveis clínicas e laboratoriais: $24,31 - 12,22 \times (RCQ) - 3,29 \times (HAS) - 0,57 \times (HbA1)$, onde RCQ significa relação cintura-quadril em centímetros, HAS representa história de hipertensão ou uso de medicações antihipertensivas (0 = não e 1 = sim) e HbA1 é o concentração de hemoglobina glicada em %. No estudo de Williams e colaboradores⁸¹ a TCGe ($\text{mg} \times \text{Kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) foi estimada a partir de fórmula contendo hemoglobina glicada A1. Neste estudo foi mensurada a hemoglobina glicada A1c. Para conversão a hemoglobina glicada A1 utilizamos a fórmula: $HbA1 = 1,18 \times HbA1c + 1,67$ ⁹⁴. Análise de regressão linear mostra que estas duas variáveis estão altamente relacionadas, considerando a fórmula acima, com coeficiente de correlação de 0,97.

A opção pela utilização da TCGe foi devido a fácil aplicabilidade, boa correlação com o clamp e associação, com desfechos clínicos relacionados à aterosclerose e resistência à insulina^{79, 95}.

Para a avaliação do grau de resistência à insulina no grupo controle utilizamos o *homeostasis model assesement insulin resistance* (HOMA-IR)⁸⁰ e o TCGe⁷⁸

4.3.4 Avaliação da cinética da nanoemulsão

4.3.4.1 Preparação da nanoemulsão lipídica artificial

As nanoemulsões utilizadas neste estudo foram preparadas segundo a técnica descrita por Ginsberg e colaboradores⁹⁶ modificada por Maranhão e cols⁸² a partir de misturas lipídicas constituídas de 20mg de fosfatidilcolina, 40 mg de éster de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol (Sigma Chemical Co – St. Louis, EUA). À mistura são adicionados 70kBq de ¹⁴C-éster de colesterol e 70kBq ³H-colesterol (Amersham International, Reino Unido) para o preparo da nanoemulsão para o estudo da remoção do colesterol. Para o estudo das transferências de lípidos para as HDL utiliza-se a mistura acima e outra, na qual são adicionados 70kBq de ¹⁴C-fosfatidilcolina e 70kBq de ³H-triglicérides (Amersham International, Reino Unido). As misturas, a seguir, são secas sob fluxo de nitrogênio, em banho-maria a 37°C e mantidas em dessecação a vácuo a 4°C por 16 horas, para remoção dos solventes residuais. As misturas lipídicas são, posteriormente, ressuspensas em 10 ml de tampão-Tris HCl e a suspensão emulsificada por irradiação ultra-sônica de 125 Watts no modo de operação "contínuo", por um período de 3 horas, sob

atmosfera de nitrogênio. A temperatura é mantida entre 51 a 55°C e a temperatura de fusão do éster de colesterol é monitorada por um termômetro de ponta inserido nos frascos durante o procedimento. A suspensão de lípidos emulsificados é, então, transferida para tubos para duas etapas de ultracentrifugação, sendo a primeira a 195 000 x g (30 min), em um rotor TH 641 (Sorvall) de ultracentrífuga, a 4°C. Os 10% da solução da parte superior do tubo contendo partículas que flutuam em uma densidade de fundo de aproximadamente 1,006 g/ml são removidos e a densidade da solução restante é ajustada para 1,21 g/ml por adição de KBr sólido. Uma segunda etapa de ultracentrifugação é realizada a 195 000 x g (120 min) a 4°C. Após atingir a temperatura ambiente, 20 a 30% do topo do tubo são coletados. O KBr é removido por gel filtração em coluna de Sephadex G-25, equilibrada e eluída com solução fisiológica estéril. As preparações resultantes são ainda purificadas por 2 etapas de ultracentrifugação e filtrada através da passagem em filtro Millipore de 0,22µm.

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

4.3.4.2 Cinética plasmática do ³H-colesterol e ¹⁴C-éster de colesterol

Após coleta de sangue para determinações bioquímicas em jejum, os indivíduos do sexo masculino foram submetidos a injeção endovenosa de 100µl da nanoemulsão marcada com ³H-colesterol e ¹⁴C-éster de colesterol. A

seguir foram coletadas amostras de sangue (5 ml) em tubo de ensaio contendo 250UI de heparina sódica durante 24 horas nos intervalos de 5 minutos, 1 hora, 2, 4, 6, 8 e 24 horas depois da injeção da emulsão. Em seguida, à coleta, 5 minutos, oferecia-se café da manhã padronizado (balanceado em lípidos, carboidratos e gorduras). Entre a 5ª e 6ª coleta era oferecido almoço.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 r.p.m., durante 10 minutos, em centrífuga Sorvall (modelo RT7, Wilmington, EUA) para obtenção de plasma. Alíquotas de 1,0 mL de plasma foram pipetadas em frascos de cintilação. Foram acrescentados a esses frascos, 5,0 mL de solução Ultima Gold™ XR (Packard – Groningen, Holanda) para a determinação da radioatividade presente nas amostras, utilizando-se um contador Beta (Packard, modelo 1660 TR, EUA).

4.3.4.3 Análise compartimental da curva de decaimento plasmático dos lípidos radioativos

A radioatividade presente nas amostras de plasma dos participantes foi utilizada para a determinação das curvas de decaimento plasmático e cálculo dos parâmetros cinéticos dos componentes lipídicos radioativos da emulsão, através do programa computacional de análise compartimental, AnaComp® versão 4.1⁹⁷.

A curva de decaimento plasmático da LDE apresentou um perfil biexponencial com um rápido decaimento inicial, seguido de um decaimento mais lento. Esse perfil levou à adoção de um modelo com dois compartimentos a partir do qual foram calculados os parâmetros cinéticos (k). Os

compartimentos e os parâmetros cinéticos (figura 5) desse modelo foram definidos do seguinte modo:

- compartimento 1: emulsão LDE, introduzida no espaço intravascular, assim como foi injetada;
- compartimento 2: LDE após aquisição de apolipoproteínas, no plasma;
- $k_{1,0}$: remoção não específica da LDE;
- $k_{1,2}$: transformação da LDE pela aquisição de apolipoproteínas
- $k_{2,0}$: remoção de LDE do compartimento plasmático para espaço extravascular.

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

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

Figura 5. Modelo compartimental utilizado para analisar a cinética plasmática do éster de colesterol da LDE

4.4 Avaliação da taxa de esterificação da emulsão ^3H -colesterol

Avaliamos a velocidade da esterificação (%/hora) do ^3H -colesterol (colesterol livre) ao longo das 24 horas.

4.4.1 Descrição do procedimento

Alíquotas de 1500 μL de plasma dos participantes foram utilizadas para a extração dos lípides pelo método de Folch⁹⁸. As amostras foram extraídas com clorofórmio: metanol: água destilada (2:1: 1 v/v/v) em 12 horas a 4 °C⁸², o sobrenadante protéico foi aspirado e o infranadante, seco sob fluxo de nitrogênio, ressuspenso com 150 μL de solução de Folch e submetido à

separação por cromatografia em camada delgada (TLC) (sílica-gel 60H, 0,5mm de espessura).

Após a aplicação, as placas foram colocadas em sistema solvente, constituído de n-hexano/éter etílico/ácido acético glacial (70:30: 1 v/v/v), para separação das frações lipídicas. Separam-se as bandas correspondentes ao éster de colesterol e ao colesterol livre, após serem reveladas por vapores metálicos de iodo. A seguir, as bandas foram transferidas para “vials” de contagem contendo 5ml de solução cintiladora (PPO dimetil POPOP-Triton X-100-tolueno, 5g: 0,5g: 333ml: 667ml; v/v/v/v). A radioatividade foi contada usando o espectrofotômetro Packard 1660 TR (Meridien, CT). A taxa de esterificação foi calculada a partir da proporção de éster de colesterol em relação ao colesterol livre em cada tempo do experimento (5 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas). Dividiram-se a radioatividade de ^3H mensurada na banda colesterol livre, pela banda éster de colesterol.

$$\frac{{}^3\text{H-colesterol}_{\text{esterificado}}}{{}^3\text{H-colesterol}_{\text{esterificado}} + {}^3\text{H-colesterol}_{\text{livre}}} \times 100$$

Foram traçadas as curvas de esterificação do colesterol da emulsão nas 24 horas e calculadas a velocidade de esterificação.

4.5 Avaliação qualitativa da HDL

A partir, da amostra de plasma do paciente, foram realizados os testes qualitativos da HDL

4.5.1 Determinação do tamanho HDL

O tamanho da partícula HDL foi medido segundo a técnica descrita por Lima e Maranhão⁹⁹. Amostras dos pacientes foram coletadas em tubo contendo EDTA (1,5g/L), após jejum de 12 horas, e o plasma foi obtido após 10 minutos de centrifugação, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. A fração HDL foi separada do plasma por precipitação química das frações contendo apo B (VLDL, LDL), utilizando-se uma solução de polietilenoglicol (PEG) 8000 (400 g/L), na proporção, plasma/precipitante, 1:1 (v/v). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em uma solução de NaCl 10mmol/L e filtrado através de um filtro millipore® 0,22µm. O diâmetro HDL (nm) foi obtido por espalhamento de luz, coletada em um ângulo de 90°, utilizando-se o equipamento Laser Light Scattering (ZetaPALMS, Brookhaven Instr. Corp., USA) e o software Big Particle Sizing, versão 2.34 (Brookhaven Instr. Corp., Holtsville, NY, USA). Após cinco leituras com duração de 2 minutos cada, o resultado da mensuração do tamanho foi expresso em média $\pm$ desvio padrão.

4.5.2 Transferência de lípides radioativos das nanoemulsões para as HDL

Amostras dos pacientes foram coletadas, após jejum de 12 horas, em tubos contendo EDTA (1,5g/L) e o plasma foi obtido após 10 minutos de centrifugação, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. Utilizou-se para este experimento 400 μ L de plasma de cada participante: 200 μ L foram incubados com 50 μ L da nanoemulsão com marcação ^{14}C -éster de colesterol (^{14}C -CE) e ^3H -colesterol (^3H -CL) e a outra alíquota de 200 μ L de plasma incubada com 50 μ L da nanoemulsão com marcação ^3H -triglicérides (^3H -TG) e ^{14}C -fosfatidilcolina (^{14}C -PL) (figura 6) por 60 minutos, a 37°C, em agitador orbital Gyromax 706R, sob agitação de 40 rpm. Após incubação, foram adicionados à mistura 250 μ L de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2%/ MgCl₂ 3M, v/v). A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. A fração HDL foi obtida após precipitação das lipoproteínas contendo apoB e da nanoemulsão. Alíquotas de 250 μ L do sobrenadante, foram pipetadas em frascos de cintilação. Foram acrescentados a esses frascos, 5,0 mL de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA) e, a radioatividade presente nas amostras quantificada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA) com a utilização do software Plus Vers. 5.01 da Diamond Computers, para determinação das contagens de ^{14}C e ^3H das amostras. O branco para este experimento consistia na mistura de 200 μ L de solução tampão TRIS-HCl e 50 μ L de nanoemulsão com as marcações. O valor de radioatividade total presente na amostra foi determinado pela incubação de 200 μ L de plasma com 50 μ L de LDE, porém sem adição de reagente de precipitação. A quantificação dos lípides transferidos da

nanoemulsão para HDL plasmática foi expressa como porcentagem (%) em relação à radioatividade total no branco.

Figura 6. Nanoemulsões com lípides radiomarcados para avaliação da transferência de lípides das nanoemulsões para as HDL

4.6 Segurança radiológica

A dose radiológica injetada foi avaliada de acordo com as normas da "International Commission on Radiological Protection" (ICRP)¹⁰⁰. O parâmetro "Annual Limit for Intake" (ALI) de radionuclídeo é definido como a quantidade de radioisótopo que induz a uma dose equivalente de 50 mSv. Para componentes orgânicos marcados com ^{14}C ou ^3H , os valores de ALI são 9×10^7 e 3×10^9 Bq, respectivamente. No presente estudo, a dose injetada de ^{14}C foi de $22,2 \times 10^4$ Bq, o que equivale a: $(22,2 \times 10^4 \text{ Bq} / 9 \times 10^7 \text{ Bq}) \times 50\text{mSv} = 0,1233\text{mSv}$. Para o ^3H , a dose injetada foi de $44,4 \times 10^4$ Bq, portanto a dose

equivalente: $(44,4 \times 10^4 \text{ Bq} / 3 \times 10^9 \text{ Bq}) \times 50 \text{ mSv} = 0,0075 \text{ mSv}$. A dose equivalente incorporada no corpo inteiro, em consequência da exposição aos lípides radioativos, foi estimada em 0,04 mSv, conforme avaliado pelo método MIRD - Medical Internal Radiological Dosimetry¹⁰¹. Os dados descritos para ratos pesando 0,4 kg foram ajustados para seres humanos, estimando-se um peso médio de 70 kg, utilizando-se um fator de correção com a equação seguinte:

$$KHomen = kRato \times (70\text{kg} / 0,4\text{kg})^{1-x}$$

O valor exponencial X representa uma escala de variações interespecies da farmacocinética, levando em consideração o tempo biológico de cada espécie, que varia de 0,65 a 0,95. Considerando o valor de $X=0,86$, estima-se para os seres humanos, um concentração plasmática total de 204 mg/dL e uma excreção diária de colesterol de 1250 mg/dia¹⁰². Esse valor está dentro da média descrita em avaliações laboratoriais desses parâmetros, em seres humanos¹⁰³. O método acima descrito permite estimar que os participantes deste estudo recebam por dose injetada de ^{14}C -éster de colesterol, 0,26 mGy no intestino grosso inferior, 0,5 mGy no intestino grosso superior, 0,18 mGy na pele, 0,13 mGy na superfície dos ossos e 0,13 mGy no fígado. A dose recebida pelos pulmões, coração, ovários ou testículo é desprezível. Em conformidade com as normas de proteção radiológica (Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1988), este valor é muito inferior ao máximo permitido que é o de 1 mSv. A dose de radiação induzida pela injeção dos radioisótopos é menor que a obtida com a maioria dos procedimentos radiológicos, sendo cerca de 10 vezes menor que a dose induzida por uma radiografia de crânio¹⁰⁴

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram expressas em médias e desvios-padrão; as variáveis categóricas foram expressas em valores percentuais e absolutos.

Para testar a normalidade da distribuição das variáveis foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov.

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

Comparamos os diabéticos e não diabéticos pareados por idade e índice de massa corpórea. Para tais comparações, utilizamos o teste T de students quando as variáveis contínuas tinham distribuição paramétrica, e o teste de Mann-Whitney quando tinham distribuição não-paramétrica.

Avaliamos as associações entre as variáveis contínuas pelo testes de Pearson ou Spearman (paramétricas e não-paramétricas, respectivamente).

A dispersão das curvas foi expressa em erro padrão da média

Consideraremos como significativas as diferenças com $p < 0,05$, bicaudal.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) for Windows versão 13.0.

6 RESULTADOS

6.1 Características clínicas, determinações bioquímicas e transferência de lípidos da população

Estudamos 73 indivíduos. Sendo 36 diabéticos e 37 controles.

A tabela 1 mostra as características antropométricas, clínicas, concentração plasmática de lípidos e apolipoproteínas, controle glicêmico, depuração de creatinina e estimativa da resistência à insulina em diabéticos e controles. O perfil lipídico foi semelhante exceto pelas concentrações mais baixas de LDLc em diabéticos (85 ± 22 vs. 98 ± 26 mg/dl, $p=0,035$). Os diabéticos tinham, em média, longa duração da doença e controle glicêmico ruim ($15,4 \pm 7,3$ anos e $8,8 \pm 1,3\%$, respectivamente), apesar da utilização de esquema de insulinização basal-bolus, com três ou mais aplicações ao dia em 94% dos participantes (02 diabéticos usavam apenas 02 doses de insulina NPH ao dia). Os dados sobre o tratamento insulinoterápico estão na tabela 2. A estimativa da taxa de captação da glicose (TCGe) foi diferente entre os grupos, sendo maior a captação em indivíduos não-diabéticos ($7,4 \pm 1,8$ vs. $10,5 \pm 0,8$ mg·kg⁻¹·min⁻¹, $p<0,0001$). O tamanho da partícula HDL não foi diferente entre os grupos ($10,3 \pm 1,3$ vs. $9,7 \pm 1,0$ nm, $p=0,051$). As transferências de ¹⁴C-éster de colesterol, ¹⁴C-fosfatidilcolina, ³H-colesterol livre e ³H-triglicérides da nanoemulsão para as partículas de HDL não foram diferentes entre diabéticos e controles. (tabela 4 e figura 7). Avaliação de complicações microvasculares está na tabela 3.

A comparação entre mulheres e homens diabéticos está demonstrada na tabela 5. Existiram mais mulheres tabagistas (5 [24%] x 0 [0%], $p=0,04$). A RCQ foi menor nas mulheres ($0,75\pm0,05$ vs. $0,83\pm0,04$, $p<0,0001$), enquanto a sensibilidade à insulina (TCGe) e as concentrações de HDLc e apoA-I foram maiores nas mulheres ($7,9\pm1,5$ vs. $6,7\pm2,0$ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, $p=0,04$; 71 ± 15 vs. 56 ± 14 mg/dl , $p=0,004$; 166 ± 39 vs. 127 ± 26 mg/dl , $p=0,01$; respectivamente).

As transferências de lípidos para as HDL foram diferentes entre mulheres e homens diabéticos (tabela 6). As partículas de HDL das diabéticas receberam mais ^{14}C -éster de colesterol e ^3H -triglicérides das nanoemulsões que as dos diabéticos ($3,9\pm1,3$ vs. $2,7\pm0,6\%$, $p=0,001$ e $3,7\pm2,3$ vs. $2,1\pm0,8\%$, $p=0,001$, respectivamente).

A avaliação por gênero não revelou diferenças nas transferências entre os diabéticos e não-diabéticos (tabelas 8 e 10).

As tabelas 7 e 9 apresentam os dados das comparações antropométricas, clínicas, lípidos e lipoproteínas, tamanho da partícula HDL e variáveis do metabolismo de carboidratos dos diabéticos e controles, separados por gênero.

6.2 Cinética plasmática da nanoemulsão (LDE) em homens

Para a avaliação da cinética da nanoemulsão estudamos o decaimento da radiação dos lípidos marcados com ^{14}C e ^3H durante 24 horas. Expressamos os dados em curvas de remoção plasmática da nanoemulsão com marcação ^{14}C -éster de colesterol e o ^3H -colesterol. Na tabela 11 e figuras

8 e 9 estão demonstradas a cinética das nanoemulsões em indivíduos diabéticos e não-diabéticos.

A taxa de remoção fracional da nanoemulsão marcada com ^{14}C -éster de colesterol nas 24h (tabela 11) foi maior nos diabéticos que não-diabéticos ($0,059\pm0,022$ e $0,039\pm0,022\text{h}^{-1}$, $p=0,019$). Não houve diferença na taxa remoção fracional do ^3H -colesterol entre os grupos (tabela 11).

A avaliação das taxas de transferências demonstrou diferenças entre os diabéticos e não-diabéticos. A remoção da nanoemulsão marcada com ^{14}C -éster de colesterol do compartimento plasmático para o espaço extravascular, representada pela constante $K_{2.0}$ foi maior em diabéticos ($0,049\pm0,024$ e $0,026\pm0,017\text{h}^{-1}$, $p=0,006$) em 24h.

6.3 Esterificação do ^3H -colesterol em 24 horas

O percentual de esterificação do colesterol livre ao longo das 24 horas nos participantes do estudo está representado na tabela 12 e figura 10. Não encontramos diferenças entre os grupos em quaisquer dos pontos de avaliação. A taxa de esterificação foi expressa em velocidade de esterificação por hora ($\%/h$) e foi semelhante entre os grupos.

6.4 Correlações

6.4.1 Correlações da cinética de lípidos e transferência de lípidos para HDL com os índices de resistência à insulina e controle glicêmico

Os índices de resistência à insulina (HOMA-IR e TCGe) não se associaram a alterações na transferência de lípidos das nanoemulsões para as HDL e na remoção das nanoemulsões ^{14}C -CE e ^3H -CL da circulação em não-diabéticos e diabéticos (tabela 13). Em diabéticos, a TCGe não se associou a variáveis clínicas e laboratoriais relacionadas à resistência à insulina, apenas à RCQ e à HbA1c, que fazem parte da fórmula. Em não-diabéticos, a TCGe esteve inversamente relacionada ao IMC, RCQ, CA, LDLc e positivamente relacionada a apoA-I e ao HDLc. (tabela 14)

O controle glicêmico agudo, estimado pela glicemia em jejum e o crônico, pela HbA1c não se relacionaram à esterificação do colesterol livre, transferências de lípidos para HDL e à remoção das nanoemulsões ^{14}C -CE e ^3H -CL da circulação em diabéticos (tabela 15).

6.4.2 Correlações das transferências de lípidos para as HDL e cinética de acordo com o perfil lipídico e parâmetros clínicos

Inúmeras associações entre as transferências de lípidos das nanoemulsões para as HDL entre si, os lípidos e variáveis clínicas de RI ocorreram em diabéticos e controles (tabelas 16 e 17). As concentrações de apoA-I e HDLc estiveram diretamente associadas às transferências de CL, CE

e TG para as HDL em diabéticos e às de CL e TG para as HDL, em não-diabéticos.

6.4.3 Correlações entre o tratamento insulínico e cinéticas das nanoemulsões, transferência de lípidos para as HDL e esterificação

Não encontramos associações entre a dose total de insulina e dose por quilo de peso com as transferências de lípidos das nanoemulsões para as HDL, com a remoção das nanoemulsões ^{14}C -CE e ^3H -CL. A dose total diária esteve inversamente associada a esterificação do colesterol às 24h e a velocidade de esterificação (tabela 18).

6.4.4 Correlações da esterificação do colesterol livre

As taxas de esterificação do colesterol livre nas 24 horas não se correlacionaram com índices de resistência à insulina, transferência de lípidos da nanoemulsão para as HDL, remoção das nanoemulsões ^{14}C -CE e ^3H -CL da circulação em diabéticos e não-diabéticos (dados não demonstrados).

6.4.5 Correlações do tamanho da HDL

O tamanho da partícula HDL não se relacionou a transferências de lípidos e à remoção das nanoemulsões ^{14}C -CE e ^3H -CL da circulação em diabéticos e não-diabéticos (dados não demonstrados).

7 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos diabéticos adultos jovens com longa duração da doença, normolipidêmicos, com controle glicêmico ruim e sem complicações macrovasculares e microvasculares significativas comparados a controles pareados para idade, sexo e índice de massa corpórea. Os diabéticos faziam uso de insulinização em esquema basal-bolus com um mínimo de 3 aplicações diárias de insulina (exceto 02 diabéticos que usavam 02 aplicações de insulina basal por dia) e apresentavam controle glicêmico crônico ruim avaliado pela hemoglobina glicada (média de HbA1c=8,8%). O perfil lipídico foi semelhante ao dos não-diabéticos exceto pelas concentrações de LDLc que foram mais baixas nos diabéticos.

A avaliação da cinética de lípides, das transferências e lípides entre lipoproteínas e esterificação do colesterol são úteis para entender a fisiopatologia do metabolismo lipídico e o processo de aterosclerose. A remoção plasmática da nanoemulsão com éster de colesterol estuda o tempo de permanência da partícula LDL na circulação e captação pelos receptores de LDL⁸³. A remoção plasmática da nanoemulsão com colesterol livre avalia a deposição de colesterol na parede arterial⁸⁸. O estudo das transferências de lípides entre a nanoemulsão e as HDL estima, indiretamente, a atividade das proteínas de transferências de lípides e o estudo da taxa de esterificação do colesterol livre avalia indiretamente a atividade da LCAT. Neste trabalho procurou-se caracterizar as alterações no metabolismo das LDL e HDL em diabéticos tipo 1 normolipidêmicos e as possíveis relações com o tratamento

insulinoterápico e o controle glicêmico. Avaliamos a influência da hiperglicemia aguda e crônica, da resistência à insulina e da insulinoterapia no metabolismo lipídico.

Demonstramos que a remoção da nanoemulsão lipídica com marcação ^{14}C -éster de colesterol da circulação foi mais rápida em indivíduos diabéticos tipo 1 que nos não-diabéticos. A remoção da nanoemulsão com marcação ^3H -colesterol, a esterificação do colesterol livre e a transferência de lípidos da nanoemulsão para as HDL foram semelhantes entre os dois grupos.

7.1 Metabolismo lipídico em DM1 avaliado pela remoção da nanoemulsão marcada com ^{14}C -éster de colesterol e ^3H -colesterol

Constituída sem proteína, a nanoemulsão lipídica artificial adquire apolipoproteínas ao ser injetada na circulação através do contato com lipoproteínas naturais⁸². Adquirindo apoE, a nanoemulsão pode ligar-se a receptores da LDL e desta forma ser removida da circulação. A remoção da nanoemulsão lipídica é mais rápida que a LDL natural⁸⁴ devido a maior afinidade da apoE pelos receptores B,E¹⁰⁵. A maior velocidade da remoção é uma vantagem metodológica visto que reduz o tempo necessário para os estudos cinéticos.

A marcação radioativa dos lípidos que constituem a nanoemulsão torna possível acompanhar suas taxas de remoção da circulação através da curva de decaimento da radiação e, desta forma, avaliar o comportamento destes lípidos.

A concentração plasmática da LDL é determinada pelo equilíbrio entre a taxa de produção – as LDL são o produto final do catabolismo das VLDL produzidas pelo fígado – e a taxa de remoção desta lipoproteína da circulação. A maior parte das LDL é removida pelos hepatócitos, sendo dois terços, aproximadamente, mediada pelos receptores de membrana que reconhecem a apoB-100^{11, 106}

A nanoemulsão lipídica tem servido como instrumento para investigação do metabolismo lipídico em diversas condições patológicas. Indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar homozigótica, nos quais a função do receptor de LDL está prejudicada ou ausente¹⁰⁷, a remoção da nanoemulsão com ¹⁴C-éster de colesterol é mais lenta que a dos controles normolipidêmicos⁸³, normalizando-se após a administração da vastatina em altas doses¹⁰⁸. Já em portadores de leucemia mielóide aguda, câncer de mama e ovário, onde existe superexpressão dos receptores de LDL, a remoção da nanoemulsão lipídica é mais rápida que nos controles¹⁰⁹⁻¹¹¹, o que justifica o encontro de concentrações de colesterol mais baixas nestes tumores. A nanoemulsão tem sido usada como veículo para quimioterápicos valendo-se da propriedade de ser reconhecida pelos receptores de LDL¹¹², superexpressos em células tumorais, o que faz aumentar a concentração dos fármacos no tumor e provavelmente reduzir toxicidade sistêmica.

Em nosso estudo a remoção da ¹⁴C-éster de colesterol foi mais rápida em diabéticos. Como o éster de colesterol, hidrofóbico, localiza-se no centro da partícula, a sua remoção representa a captação desta partícula pelos receptores, refletindo a ação destes⁸³, conforme relatado nos estudos supracitados.

A insulina exerce ação sobre a expressão de receptores de LDL¹¹³⁻¹¹⁸. Embora exista alguma controvérsia na literatura^{114, 119, 120} os resultados dos estudos convergem para a direção de a insulina ser capaz de aumentar o número ou a atividade do receptor de LDL. Culturas celulares humanas¹²¹⁻¹²⁴ e de animais de experimentação¹²⁰ têm demonstrado que a insulina aumenta a capacidade de ligação, acúmulo e degradação das LDL, estimula a atividade transcricional do receptor de LDL (LDLr)^{117, 125}, aumenta a atividade^{114, 118} e a expressão deste receptor^{116, 123, 126} e, agudamente, estimula a apresentação do LDLr na superfície da célula¹²³. Em diabéticos tipo 2, a substituição de antidiabéticos orais por insulina resultou em aumento da expressão de LDLr em monócitos¹²¹ e aceleração da taxa catabólica da LDL^{127, 128}. Por outro lado, Rosenstock e colaboradores¹³ demonstraram, em DM1, que a redução dos concentrações de LDL sob tratamento insulínico pode dever-se à diminuição da produção da lipoproteína ao invés do aumento da taxa catabólica fracional. Desta forma, diversos mecanismos poderiam justificar o encontro de concentrações de LDLc mais baixas em indivíduos insulinizados.

Sabe-se que a insulinização intensiva com redução da hemoglobina glicada⁶⁸ promove alterações qualitativas e quantitativas no perfil lipídico, podendo resultar em redução da massa de LDL, aumento da massa de HDL e redução de triglicérides^{13, 129} e que o hiperinsulinismo é o responsável por estas modificações no metabolismo lipídico¹². A maioria dos diabéticos (94%) do presente estudo estava em uso de insulinização com três ou mais aplicações diárias em esquema basal-bolus (exceto dois homens que vinham em uso de duas doses de NPH ao dia) associadas à automonitorização. Devido a forma de insulinização, por via subcutânea, em todos os diabéticos

há hiperinsulinismo na circulação periférica^{72, 73}, mesmo que não haja ideal controle glicêmico. A absorção de insulina injetada no subcutâneo drena para a circulação periférica e não para a portal, sendo assim para atingir adequadas concentrações portais para controle glicêmico, necessariamente coexistirá hiperinsulinemia periférica^{72, 73}.

Sugerimos que a remoção mais rápida do ¹⁴C-éster de colesterol em diabéticos tipo 1 deveu-se, provavelmente, a maior expressão ou também maior atividade dos receptores de LDL estimulada pela insulinoterapia intensiva que induziu ao hiperinsulinismo periférico. Desta forma, a insulinoterapia, mesmo não estando relacionada ao controle glicêmico adequado, possibilitou a redução das concentrações do LDLc.

Entretanto não encontramos associação entre a dose de insulina por quilo de peso com as taxas de remoção. A ausência desta relação não enfraquece a associação aventada, visto que a absorção da insulina subcutânea é altamente variável e a quantidade aplicada no subcutâneo pode não refletir proporcionais quantidades na circulação portal. Mesmo em condições padronizadas a absorção interindividual pode chegar a 50% entre os usuários¹³⁰. Além da variabilidade interindividual, a relação da dose subcutânea e a insulinemia portal é dependente de múltiplos fatores pessoais que não apenas o peso, mas também o local de injeção, volume, temperatura, atividade física resultando em ampla variabilidade intraindividual¹³¹.

Esta é a primeira vez que se demonstra, in vivo, maior remoção das LDL em diabéticos tipo 1 por estudos cinéticos, um dos mecanismos possíveis para a redução das concentrações destas lipoproteínas.

7.2 Tamanho das partículas HDL

Diabéticos tipo 1 podem apresentar, quando mantidos em moderado a bom controle glicêmico, perfil lipídico quantitativamente favorável com maiores concentrações de HDL e menores concentrações de LDL que não-diabéticos^{4, 5, 29, 60}. Diferenças no diâmetro das partículas são detectadas entre diabéticos e não-diabéticos, apresentando, os primeiros maiores quantidades de HDL de maior diâmetro e em geral, as HDL de maior tamanho parecem ser mais cardioprotetoras que as HDL menores que até podem promover aterosclerose¹³². Em nosso estudo não encontramos diferenças no tamanho das partículas HDL entre os diabéticos e os controles. Estudo prévio mostrou que diabéticos tipo 1 podem ter mais HDL maiores e menos HDL menores⁶⁰. O maior tamanho poderia ser explicado não somente, mas em parte, pelo aumento da atividade da PLTP em diabéticos⁷¹. A semelhança no tamanho das partículas encontrado no presente estudo não exclui a possibilidade de reais alterações no tamanho e dispersão de tamanho das HDL. O valor apresentado no trabalho foi o valor médio do diâmetro de todas as partículas mensuradas, sem fracionamento de subclasses, pela dispersão da luz, poderia haver diferenças nos tamanhos das subclasses das HDL⁶⁰, que não foram avaliados.

7.3 Transferências de lípidos da nanoemulsão (LDE) para as HDL

A avaliação das transferências lipídicas entre a nanoemulsão e as HDL revelou que os percentuais de lípidos transferidos em indivíduos diabéticos e não diabéticos foram similares.

Estudar as transferências lipídicas entre lipoproteínas e a esterificação do colesterol são formas de elucidar parte do metabolismo de lípidos através da estimativa indireta das atividades dos elementos responsáveis por estas trocas e esterificação: as proteínas de transferências de lípidos e a LCAT. A aquisição ou doação de lípidos pelas HDL modifica sua composição, tamanho, subclasses e até funcionalidade destas partículas.

Através do modelo experimental utilizado neste trabalho foi possível estudar, a um só tempo, *in vitro*, e de forma prática, a remodelação das HDL, parte do metabolismo destas partículas. O modelo simula a remodelação que ocorre no plasma, avaliando indiretamente a função da PLTP e CETP por meio das transferências dos triglicérides, fosfolípidos, colesterol livre e éster de colesterol da nanoemulsão lipídica para as HDL dos indivíduos em estudo.

Investigações anteriores, utilizando diferentes técnicas, revelam resultados díspares aos nossos. Os estudos de Bagdade JD^{57, 58, 133} e col. e Dirican M^{57, 58, 133}, utilizando métodos de transferência radioisotópica e de massa, evidenciaram aumento na transferência de ésteres de colesterol das HDL para lipoproteínas contendo apoB (VLDL e LDL) em diabéticos tipo 1 normolipidêmicos com demonstração de aumento da relação TG/CE no centro da partícula HDL. Estudo posterior de Bagdade JD revelou esta transferência aumentada ocorria apenas entre as HDL3 e lipoproteínas contendo apoB¹³⁴.

Este autor demonstrou que as alterações composicionais e nas transferências eram normalizadas através da insulinização intraperitoneal sendo postulado a ligação entre hiperinsulinemia periférica, ativação da lipase lipoproteica e transferência de ésteres de colesterol¹⁵. Entretanto estes estudos avaliaram a transferência de apenas um lipídio das HDL para lipoproteínas contendo apoB enquanto nós avaliamos os quatro lípidos, deslocando-se no sentido da nanoemulsão, que imita a LDL natural, para a HDL. Poucos estudos avaliaram a transferência neste sentido. Ritter MC e colaboradores¹³⁴ documentaram aumento de transferência de TG para as HDL3 dos DM1, sem aumento para as HDL2.

Outros grupos, a semelhança dos nossos resultados, não mostraram alterações nas taxas de transferências^{135, 136}. Medina WL e colaboradores¹³⁵ avaliaram diabéticos tipo 1 normolipêmicos, jovens, com controle glicêmico ruim e sem complicações com mesmas técnicas utilizadas por Bagdade e não encontraram diferenças nas transferências de ésteres de colesterol entre os grupos controle e DM. Valabhji J e colaboradores¹³⁶ também demonstraram ausência de alterações na transferência de massa de ésteres de colesterol em diabéticos, com aquela técnica. Estudos em crianças diabéticas tipo 1, normolipêmicas e IMC normal, mostram concentrações maiores de HDL, menor esterificação do colesterol¹³⁷ e menor atividade de CETP¹³⁸, estas alterações poderiam aumentar o tamanho das HDL, estarem associadas com redução de risco de DAC¹³⁷ e serem relacionadas ao hiperinsulinismo periférico¹³⁸. Os diabéticos do nosso estudo, apesar de apresentarem descontrole glicêmico eram normolipidêmicos e faziam, em sua maioria, uso

de insulinoterapia intensiva o que ocasiona hiperinsulinismo periférico e poderia justificar os achados.

Encontramos inúmeras correlações entre os quatro lípides transferidos das nanoemulsões para as HDL e o perfil lipídico em diabéticos e não-diabéticos.

Observamos que a colinearidade dos lípides transferidos foi maior no grupo dos diabéticos. Analisando as ações das proteínas de transferência de lípides que influenciaram este fluxo podemos supor que, em diabéticos, as mesmas proteínas promovem mais transferências simultâneas que em não-diabéticos. Não foi possível, através desta análise, definir precisamente, qual foi a proteína responsável e o que ela transferiu.

Em diabéticos a transferência de CE esteve positivamente relacionada à de CL e TG enquanto em não-diabéticos, apenas à de TG. A relação de CE com CL poderia ser explicada pelo fato de que este lípide, em sendo esterificado pela LCAT⁴⁶, poderia ser trocado, via CETP, por TG, aumentando o fluxo de CL para as HDL, pela redução do gradiente de CE na partícula. Já a correlação direta e em mesma direção de CE/TG em diabéticos contraria a teoria da troca destes lípides através da CETP²⁰. Entretanto o estudo de Ritter MC e col.¹³⁴ também encontrou colinearidade de transferências em diabéticos tipo 1: as HDL2 recebiam mais CE e TG das VLDL e LDL que não diabéticos e a transferências destes lípides estiveram paralelamente aumentadas na mesma direção de fluxo. Tanto o nosso trabalho quanto o trabalho de Ritter MC e col. demonstram transferência de CE e TG simultâneas, diferindo da teoria de troca de lípides pela CETP. O conceito da heterotroca de TG por CE entre partículas ricas em TG com as HDL foi questionado por Liu XQ e col.¹³⁹

quando revelou, em seu estudo, que as transferências lipídicas não são equimolares; vias independentes poderiam existir para explicar as transferências de CE e TG entre as lipoproteínas.

Contribuindo para a complexidade das trocas lipídicas, parece que outras proteínas de transferência também desempenham papéis múltiplos. A PLTP é uma proteína que atua na transferência de CL e PL de partículas ricas em TG para as HDL e na fusão de HDL menores formando as HDL2, maiores^{44, 140, 141}. Nosso trabalho verificou que a transferência de PL esteve positivamente relacionada à de CL e TG em diabéticos e à de TG em não-diabéticos. E que a transferência de CL esteve positivamente relacionada à de CE, PL e TG em diabéticos e TG em não-diabéticos. A colinearidade da transferência de CL e PL pode ser facilmente explicada pela atividade da PLTP, que pode estar aumentada em diabéticos^{71, 142}. Já o colesterol livre pode ser transferido para as HDL de forma passiva e via PLTP, podendo ser posteriormente esterificado pela LCAT e servir para a troca por TG com as partículas VLDL e LDL. Este mecanismo justificaria a colinearidade CL/TG nos dois grupos.

Observamos que quanto maiores as concentrações de apoA-I, maiores foram as transferências dos lípidos CL, CE e TG dos diabéticos e de CL e TG dos não-diabéticos. Como a apoA-I é a principal apolipoproteína da HDL, representando o número destas partículas, estes resultados evidenciam que as transferências destes lípidos estão vinculadas ao número de partículas.

Possível explicação para a colinearidade aumentada na transferência dos lípidos em diabéticos seria a hiperinsulinemia induzida pelo tratamento subcutâneo. Sabe-se que a hiperinsulinemia periférica é capaz de estimular a

CETP^{15, 57}, LLP¹⁵ e LH¹⁴ e poderia, então, proporcionar maior efluxo e influxo de lípides nas HDL. Apesar de não haver diferença nos percentuais transferidos na comparação diabéticos e não-diabéticos, isto não garante que a composição destas HDL seja semelhante. Como vimos nas correlações, as transferências simultâneas foram maiores em DM1; baseando-se no fato de que as trocas não são equimolares¹³⁹ (pelo menos entre CE e TG) e na conhecida alteração na composição das HDL em diabéticos tipo 1^{12, 55, 56}, podemos supor que partículas de HDL diabéticas estão em constante remodelação, influenciadas por inúmeras condições como concentrações de lípides e o próprio tratamento. Esta remodelação intensa poderia alterar o TRC com modificações composicionais que predispussem à aterosclerose como enriquecimento com TG ou ainda gerar partículas “instáveis” com função prejudicada e susceptíveis a maior remoção.

Uma limitação de nosso trabalho foi a visão unidirecional do processo (nanoemulsão para HDL) e a ausência de avaliação composicional das HDL ao fim da transferência, entretanto estudos prévios de transferências de lípides de outros autores comumente estudam o metabolismo de forma unidirecional^{57, 58, 133}, poucos o avaliam bidirecionalmente¹³⁴.

O nosso estudo difere dos anteriores pelo fato de a metodologia radioisotópica avaliar a transferência, a um só tempo, de todos os lípides neutros da nanoemulsão para as HDL; é o primeiro estudo em DM1 usando esta técnica. Um dos destaques de nosso trabalho é a quantidade de indivíduos estudados, grande número de diabéticos tipo 1 sem complicações avaliados através de estudos cinéticos. A praticidade do método utilizado possibilitou a análise de muitos indivíduos, o que difere da maioria dos estudos

cinéticos que limitam a inclusão de mais participantes por serem caros e trabalhosos.

7.4 Esterificação do colesterol livre

As taxas de esterificação ao longo das 24 horas foram semelhantes entre os grupos controle e DM1.

A esterificação do colesterol livre é uma etapa essencial do transporte reverso do colesterol. A enzima LCAT, ligada às HDL, catalisa a conversão do colesterol livre em éster hidrofóbico⁴⁶ transformando as HDL em partículas maduras e maiores⁴⁷. A LCAT pode facilitar a captação do colesterol dos tecidos periféricos pela manutenção de gradiente de concentração para o colesterol livre nas HDL. A HDL enriquecida com ésteres de colesterol, ao sofrer ação da CETP, troca este lipídio por triglicérides das partículas contendo apoB. Esta troca contribui para a remoção do colesterol da circulação de forma indireta através da captação das partículas ricas em colesterol pelo fígado. A redução da atividade da LCAT poderia estar ligada à aterosclerose na medida em que justificaria menor remoção do colesterol tecidual para a HDL para, posteriormente, disponibilizá-lo para o transporte reverso do colesterol.

Dados sobre a esterificação em diabéticos tipo 1 são escassos e controversos. Dirican M e colaboradores¹³³ encontraram redução da atividade da LCAT em diabéticos tipo 1 com inadequado controle glicêmico (HbA1c=10,6%) enquanto Chang CK e col¹⁴³ relataram acelerada atividade de LCAT positivamente associada com a glicemia. De Vries e colaboradores¹⁴², documentaram elevadas taxas de esterificação em diabéticos tipo 1, já

Valabhji J e colaboradores¹³⁶ e Medina WL e colaboradores¹³⁵ não encontraram diferenças na esterificação do colesterol. A diferença entre estes quatro estudos é que nos três primeiros os indivíduos apresentavam intenso descontrole glicêmico ou eram dislipidêmicos e nos dois últimos, à semelhança do nosso, normolipidêmicos e com regular controle glicêmico.

Não encontramos relação entre as taxas de esterificação, as transferências de lípidos e as taxas de remoção do ³H-colesterol e o ¹⁴C-éster de colesterol. O controle glicêmico, perfil lipídico, idade e dados antropométricos (CA, RCQ) não influenciaram na esterificação.

7.5 Resistência à insulina e Metabolismo lipídico

Avaliamos a influência da resistência à insulina na esterificação, transferências de lípidos e remoção das nanoemulsões. Para estimar a sensibilidade à insulina calculamos o TCGe em diabéticos e não-diabéticos e o HOMA-IR em não diabéticos. A resistência à insulina não influenciou a cinética de lípidos (remoção das nanoemulsões, transferências e esterificação). Procurando avaliar se os índices serviram para estimar adequadamente a resistência na população, determinamos a associação do TCGe e HOMA-IR com parâmetros clínicos e bioquímicos que são reconhecidos serem associados à resistência à insulina. A TCGe, em diabéticos, apenas apresentou correlação direta com a RCQ, mas esta variável clínica faz parte da fórmula para o cálculo da TCGe. Houve associação direta entre a TCGe em não-diabéticos com a concentração de apoA-I e HDL e inversa com IMC, CA,

RCQ e LDL. O HOMA-IR não se correlacionou a cinética ou parâmetros clínicos e bioquímicos de RI.

O que poderia explicar a ausência de relação entre o HOMA-IR nos não-diabéticos e o TCGe nos diabéticos com as variáveis clínicas associadas a resistência à insulina é a homogeneidade e o perfil de sensibilidade à insulina na população estudada – os indivíduos eram bastante sensíveis à insulina, em média. A amostra reduzida de indivíduos avaliados pode não ter possibilitado distinções. Aplicando os critérios do IDF, somente cinco diabéticos e dois controles poderiam ser classificados como portadores da síndrome metabólica. Entretanto a TCGe nos não-diabéticos esteve associada a parâmetros clínicos e bioquímicos característicos de RI. Para o cálculo da TCGe fazem parte a HbA1c, a RCQ e presença de hipertensão; nos não-diabéticos, a RCQ foi a variável que permitiu a distinção dos indivíduos quanto a sensibilidade à insulina, já que poucos eram hipertensos e os valores da HbA1c eram semelhantes. Como a RCQ representa a gordura em distribuição visceral, a correlação da TCGe e variáveis clínicas (CA, IMC) e bioquímicas (HDL) foi expressiva, o que não aconteceu com a TCGe em diabéticos, onde a HbA1c determinou a maior variação dos resultados.

7.6 Insulinização e Metabolismo lipídico

A dose total diária de insulina associou-se inversamente com a taxa de esterificação em 24 horas e com a velocidade de esterificação. A relação entre insulina em diabéticos tipo 1 e atividade de LCAT é controversa e escassa na literatura. Alguns estudos demonstram aumento da atividade¹⁴³ e elevadas taxas de esterificação¹⁴² em DM1 sob insulinoterapia, enquanto outros encontram redução da atividade¹³³ e não encontram diferenças nas taxas de esterificação quando comparadas aos controles¹³⁵. Ohta T demonstrou menor taxa fracional de esterificação em crianças portadoras de diabetes tipo 1 insulinizadas e com perfil lipídico normal¹³⁷. Nestes estudos, entretanto, não foi analisada associação com doses de insulina.

A relação do metabolismo lipídico com a quantidade de insulina diária pode impactar em entraves farmacocinéticos da forma de administração desta medicação. Não encontramos associação entre a dose de insulina por quilo de peso com as taxas de remoção e transferências. Variabilidade da absorção da insulina subcutânea pode justificar a ausência de associação. A quantidade aplicada no subcutâneo pode não refletir proporcionais quantidades na circulação portal. Mesmo em condições padronizadas a absorção interindividual pode chegar a 50% entre os usuários¹³⁰. Além da variabilidade interindividual, a relação da dose subcutânea e a insulinemia portal é dependente de múltiplos fatores pessoais que não apenas o peso, mas também o local de injeção, volume, temperatura, atividade física resultando em ampla variabilidade intraindividual¹³¹.

7.7 Considerações finais

Aventamos a possibilidade de que a ausência de diferenças nas taxas de esterificação do colesterol e transferência de lípides para as HDL, associada a mais rápida remoção do ^{14}C -éster de colesterol da circulação em diabéticos tipo 1 traduzam alterações qualitativas nos lípides associadas a redução de risco de doença vascular. Postulamos que a insulinoterapia intensiva, a despeito de não ter alcançado ideal controle glicêmico possa auxiliar na prevenção da doença aterosclerótica. No DCCT 2005, a média da HbA1c foi de $7,9 \pm 1,3\%$, um valor não-ideal, e ainda assim estes indivíduos tiveram risco 42% menor de doença vascular que no grupo de tratamento convencional ao início do estudo¹⁴⁴. A acelerada remoção do ^{14}C -éster de colesterol demonstrada pela cinética da nanoemulsão poderia se justificar pela possível maior expressão dos receptores de LDL hepáticos induzidos pela hiperinsulinização periférica. Outra possibilidade é que os diabéticos estudados constituam uma amostra muito selecionada e especial. Foram avaliados diabéticos jovens, com longa duração de doença, normolipidêmicos, com IMC normal e sem complicações, “protegidos”, possivelmente, por mecanismos ainda não bem esclarecidos ou não avaliados neste estudo.

8 CONCLUSÃO

Os resultados encontrados permitem que se conclua:

1. Em diabéticos tipo 1, jovens, normolipidêmicos, sem complicações crônicas significativas da doença, com controle glicêmico ruim a despeito de insulinização intensiva, o ^{14}C -éster de colesterol é removido mais rapidamente circulação que nos não-diabéticos e são encontradas semelhantes taxas de transferência de lípides da nanoemulsão para as HDL, de esterificação e remoção da ^3H -colesterol em ambos os grupos.

2. Os índices de avaliação de resistência à insulina em diabéticos e controles não se relacionaram à transferência de lípides da nanoemulsão para as HDL, à esterificação e à remoção do ^{14}C -éster de colesterol e ^3H -colesterol da circulação.

3. Não há associações entre controle glicêmico agudo e crônico e quantidade de insulina com transferências de lípides da nanoemulsão para a HDL e remoção do ^{14}C -éster de colesterol e ^3H -colesterol em diabéticos.

4. As partículas HDL dos diabéticos recebem simultaneamente mais lípides transferidos das nanoemulsões.

9 ANEXOS

ANEXO 1

Questionário

Data da Entrevista: _____

Identificação: etiqueta

Data de Nascimento: _____ Idade atual: _____

Ano de diagnóstico do diabetes _____ Tempo de diagnóstico: _____

Idade ao diagnóstico: _____

História familiar de diabetes: sim ☐ não ☐ - qual : _____

Peso ao diagnóstico: magro ☐ sobrepeso ☐ obeso ☐

História de cetoacidose: sim ☐ não ☐

Tempo para insulinização: ao diagnóstico ☐ após ☐ anos

Tabagismo: atual ☐ prévio ☐ Etilismo ☐

Autoanticorpos: _____

História familiar de:

Diabetes tipo 2 ☐ hipertensão ☐

Obesidade ☐ dislipidemia ☐

Medicações em uso: _____

Neuropatia periférica: (questionário MNSI adaptado)

1. Suas pernas e/ou pés são dormentes?	Sim ☐ Não ☐
2. Você tem alguma queimação em pernas e/ou pés?	Sim ☐ Não ☐
3. Seus pés são hipersensíveis ao toque?	Sim ☐ Não ☐
4. Você tem câimbras em suas pernas e/ou pés?	Sim ☐ Não ☐
5. Você tem sensação de agulhadas nas pernas e/ou pés?	Sim ☐ Não ☐
6. O contato da roupa incomoda a sua pele?	Sim ☐ Não ☐
7. Você já teve ulcera em seu pé?	Sim ☐ Não ☐
8. Ao tomar banho você é capaz de distinguir a água quente da fria?	Sim ☐ Não ☐
9. Seu médico já lhe contou que você tem neuropatia?	Sim ☐ Não ☐

10. Você se sente fraco na maioria do tempo?	Sim ☐ Não ☐
11. Seus sintomas são piores à noite?	Sim ☐ Não ☐
12. Suas pernas doem quando você anda?	Sim ☐ Não ☐
13. Você sente seus pés quando anda?	Sim ☐ Não ☐
14. A pele de seus pés é seca a ponto de ferir?	Sim ☐ Não ☐
15. Você já teve amputação?	Sim ☐ Não ☐

Claudicação Intermitente

1. Dor nas panturrilhas ao caminhar?	☐
2. Queimação nas panturrilhas ao caminhar?	☐
3. “Travam” as panturrilhas ao caminhar?	☐
4. Câimbras nas panturrilhas ao caminhar?	☐
5. Melhora ao parar de andar?	☐
6. Piora ao andar?	☐
7. Melhor pé para cima?	☐
8. Melhor pé para baixo?	☐

Comorbidades

HAS ☐	AVC ☐	Apneia do sono ☐
Menopausa ☐	IAM ☐	Esteatose hepática ☐
Osteoporose ☐	Angina CF ☐	ICC CF ☐
Dislipidemia ☐	Hipotireoidismo ☐	Estenose carotídea ☐
Obesidade grau ☐	Litíase vesicular ☐	Nefropatia ☐
Vitiligo ☐		

Outros: _____

ANEXO 2

Exame Físico:

PA sentado_____

FC sentado_____

PA em pé_____

FC em pé_____

Peso_____

Altura_____ IMC_____

CA_____

Cintura_____ Quadril_____

Sopros carotídeos: direita ☐ esquerda ☐Sopros abdominais: sim ☐ não ☐

Exame físico dos pés:

Pele excessivamente seca: Sim ☐ Não ☐Formações calorosas: Sim ☐ Não ☐Fissuras: Sim ☐ Não ☐Ulceração: Sim ☐ Não ☐Deformidades: Sim ☐ Não ☐Amputação: Sim ☐ Não ☐

Teste do monofilamento

1, 3 e 5 pododáctilos e 1, 3 e 5 metatarsos.

Número de pontos sentidos_____

Local não sentido:_____

Pulsos	Presente	Diminuído	Ausente
Tibial posterior E	☐	☐	☐
Tibial posterior D	☐	☐	☐
Pedioso E	☐	☐	☐
Pedioso D	☐	☐	☐

Sensibilidade vibratória (diapasão 128 hz)

Testada na cabeça do primeiro metatarso do paciente e comparada com o examinador ao parar de sentir

Vibração que dura > 10 segundos ☐< 10 segundos ☐não percebe ao tocar ☐não percebe ao terminar ☐

Artrestesia:

	Percebe balançar	Sabe a direção
Pododáctilo esquerdo	☐	☐
Pododáctilo direito	☐	☐

Distribuição de gordura: Visceral ☐ Difusa ☐

ANEXO 3

Complicações Relacionadas ao DM

Microcomplicações:

Retinopatia: data _____ resultado: _____

Nefropatia: data _____ resultado: _____

Microalbuminúria: data _____ resultado: _____

Macroalbuminúria: data _____ resultado: _____

Clearance de Creatinina data _____ estimado _____ medido _____

Confirma nefropatia? sim ☐ não ☐ Como: _____

Neuropatia periférica (se alterados, marcar X)

Exame Físico – mono ☐ diapasão ☐ artrestesia ☐ Questionário ☐

ENMG: data _____ resultado: _____

Neuropatia autonômica:

Queda pressórica postural: ☐

Taquicardia em repouso: ☐

Outros dados: gastroparesia ☐ diarreia ☐

Cintilografia de esvaziamento gástrico: _____

DAP:

Doppler de MMII: data _____ resultado: _____

Queixas de claudicação: ☐

DAC:

História de IAM, angina ou RM ☐

Q no ECG ☐

Cintilografia miocárdica:

Teste de esforço

Ecocardiograma

10 TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Características antropométricas e clínicas, lípides e lipoproteínas plasmáticas, tamanho da partícula HDL e variáveis do metabolismo de carboidratos em diabéticos e não-diabéticos

Características	Diabéticos (n= 36)	Não-diabéticos (n=37)	
Idade (anos)	27,2±6,2	29,6±6,1	0,098
Homens	15 (42%)	16 (43%)	0,89
HAS	5 (13,8%)	1 (2,7%)	0,014
Atividade física *	14 (38,9%)	14 (37,8%)	0,924
Uso de IECA†	8 (22,2%)	0	0,002
Uso de ACO	6 (16%)	6 (17%)	0,913
Tabagista	5 (13,9%)	7 (18,9%)	0,562
CA (cm)	85±8,9	84,2±9,3	0,72
RCQ	0,78±0,06	0,76±0,07	0,18
IMC (Kg/m ²)	23,6±3,1	23,8±3,5	0,80
apoA-I (mg/dl)	146±34	148±29	0,83
ApoB (mg/dl)	72±14	80±20	0,104
CT (mg/dl)	166±32	178±29	0,093
LDLc (mg/dl)	85±22	98±26	0,035
HDLc (mg/dl)	64±16	62±16	0,60
VLDLc (mg/dl)†	16±8	18±7	0,28
TG (mg/dl)	80±37	89±35	0,35
HbA1c (%)†	8,8±1,3	5,3±0,4	<0,001
Glicemia de jejum (mg/dl)†	213±106	75±8	<0,001
Dep. creat (ml/min)	107,4±29,9	-	-
Tempo de DM (anos)	15,4±7,3	-	-
IdadeDx (anos)	12,6±7,6	-	-
Insulina (uU/ml)	-	6,8±3,4	-
HOMA-IR (mmol/L·uU/ml)	-	0,99±1,00	-
TCGe (mg·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	7,4±1,8	10,5±0,8	<0,001
Síndrome metabólica †	5 (13,9%)	2 (5%)	0,43
Tamanho HDL (nm)	10,3±1,3	9,7±1,0	0,051

Média±DP † Mann-Whitney ou teste exato de Fisher *pelo menos 3 vezes por semana em tempo superior a 30 minutos. HAS=hipertensão arterial sistêmica, IECA=inibidor de enzima conversora de angiotensina, ACO=anticoncepcional oral, CA=circunferência abdominal, RCQ=relação cintura-quadril, IMC=índice de massa corpórea, apoA-I=apolipoproteína A-I, apoB=apolipoproteína B, CT=colesterol total, LDLc=LDL colesterol, HDLc=HDL colesterol, VLDLc=VLDL colesterol, TG=triglicérides, IdadeDx= idade do diagnóstico, HbA1c= hemoglobina glicada A1c, Dep. Creat = depuração de creatinina; HOMA-IR=homestasis model assesement insulin resistance, TCGe=estimativa da taxa de captação da glicose.

Tabela 2 - Dados sobre tratamento insulinoterápico em média e desvio padrão (n=36)

Dose total diária de insulina (UI/dia)	44,2±12,7
Dose total diária de insulina/kg (UI/kg)	0,68±0,16
Número de aplicações de insulina ao dia	3,69±0,58§
Uso de insulina para correção*	25 (69,4%)
Contagem de carboidratos**	17 (47,2%)
HbA1c (%)	8,8±1,3
Média HbA1c em 1 ano † (%)	8,7±1,2

§ apenas 02 diabéticos faziam uso de 02 doses diárias de insulina NPH, o restante aplicava três ou mais vezes por dia.

* bolus de insulina rápida ou ultra-rápida usado para corrigir hiperglicemias pré e pós-prandiais.

† Média da hemoglobina glicada no ano que antecedeu o estudo.

**Dose de insulina prandial baseada na contagem de carboidratos da refeição.

Tabela 3 - Avaliação de complicações microvasculares em diabéticos (n=36)

	Alterado	Normal	Não-avaliados
MA 24h*	2 (5,6%)	34 (94,4%)	0
Fundoscopia	6 (16,7%)	30 (83,3%)	0
TMF	1 (2,8%)	35 (97,2%)	0
Teste da vibração	5 (13,9%)	28 (77,8%)	3 (8,3)

*denominada "alterada" quando entre 30 a 50mg/24h MA=microalbuminúria em 24 h, TMF=teste do monofilamento de 10g.

Tabela 4 - Taxas de transferência de lípidos da nanoemulsão para as partículas HDL em diabéticos e não-diabéticos

Taxa de transferência	Diabéticos (n= 36)	Não-diabéticos* (n=34)	p
¹⁴ C-éster de colesterol (%)	3,4±1,2	3,5±0,9	0,66
¹⁴ C- fosfatidilcolina (%)	20,5±3,8	21,3±3,6	0,39
³ H-triglicérides (%) †	3,0±2,0	3,1±1,3	0,20
³ H -colesterol (%)	6,4±1,7	6,5±1,3	0,71

Média±DP. † Mann-Whitney. * 03 controles tiveram amostras insuficientes para o teste.

Tabela 5 - Características antropométricas e clínicas, lípides e lipoproteínas plasmáticas, tamanho da partícula HDL e variáveis do metabolismo de carboidratos em mulheres e homens diabéticos

Dados	Mulheres (n= 21)	Homens (n=15)	p
Idade (anos)	27,8±5,6	26,4±7	0,52
HAS (%)	2 (9,5%)	3 (20%)	0,63
Atividade física (%) *	7 (35%)	7 (47%)	0,49
Uso de IECA (%)†	4 (20%)	4 (27%)	0,70
Uso de ACO (%)	8 (38%)	-	-
Tabagista (%)†	5 (24%)	0	0,04
CA (cm)	85,5±9,4	84,3±8,3	0,69
RCQ	0,75±0,05	0,83±0,04	<0,001
IMC (Kg/m ²)	24 ±3,7	23,2±2,3	0,46
apoA-I (mg/dl)	158±34	127±26	0,01
CT (mg/dl)	174±34	155±26	0,07
LDLc (mg/dl)	87±27	83±15	0,61
HDLc (mg/dl)	71±15	56±14	0,004
VLDLc (mg/dl)	17±9	16±8	0,90
TG (mg/dl)	81±37	80±38	0,93
HbA1c (%)	8,8±1,3	8,8±1,5	0,36
Glicemia de jejum (mg/dl)	230±113	192±96	0,32
Tempo de DM (anos)	14,4±7,2	15,7±7,9	0,86
IdadeDx (anos)	13±8,4	12,2±7,2	0,79
Dose total insulina (UI)	41±11	49±14	0,069
Dose/kg insulina (UI/kg)	0,67±0,17	0,69±0,4	0,73
N de aplicações†	4 (3-4)	4 (2-4)	0,22
TCGe (mg·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	7,9±1,5	6,7±2,0	0,04
Síndrome metabólica (%)†	4 (19%)	1 (6,7%)	0,38
Tamanho da HDL (nm)	10,2±1,2	10,4±1,6	0,52

Média±DP; †Mann-Whitney ou teste exato de Fisher *pelo menos 3 vezes por semana em tempo superior a 30 minutos. HAS=hipertensão arterial sistêmica, IECA=inibidor de enzima conversora de angiotensina, ACO=anticoncepcional oral, CA=circunferência abdominal, RCQ=relação cintura-quadril, IMC=índice de massa corpórea, apoA-I=apolipoproteína A-I, apoB=apolipoproteína B, CT=colesterol total, LDLc=LDL colesterol, HDLc=HDL colesterol, VLDLc=VLDL colesterol, TG=triglicérides, Idade Dx=idade ao diagnóstico, HbA1c=hemoglobina glicada A1c, HOMA-IR=homestasis model assesement insulin resistance, IdadeDX=idade diagnóstico, TCGe=estimativa da taxa de captação da glicose.

Tabela 6 - Taxas de transferência de lípidos da nanoemulsão para as partículas HDL em mulheres e homens diabéticos

Dados	Mulheres (n= 21)	Homens (n=15)	p
¹⁴ C-éster de colesterol (%)	3,9±1,3	2,7±0,6	0,001
¹⁴ C-fosfatidilcolina (%)	21,5±3,6	19,3±3,7	0,08
³ H-triglicérides (%)†	3,7±2,3	2,1±0,8	0,001
³ H -colesterol (%)	6,8±1,6	5,9±1,7	0,11

Média±DP. † Mann-Whitney.

Tabela 7 - Comparação de características antropométricas e clínicas, lípidos e lipoproteínas plasmáticas, tamanho da partícula HDL e variáveis do metabolismo de carboidratos em mulheres diabéticas e não-diabéticas

Dados	Diabéticas (n= 21)	Não-diabéticas (n=21)	p
Idade (anos)	27,8±5,6	30,8±6	0,11
HAS (%)†	2 (9,5%)	0	0,49
Atividade física (%) *†	7 (35%)	8 (38%)	1
Uso de IECA (%)†	4 (20%)	0	0,048
Uso de ACO (%)	7 (32%)	6 (29%)	1
Tabagista (%)†	5 (24%)	3 (14%)	0,67
CA (cm)	85,5±9,4	80,2±7,5	0,07
RCQ	0,75±0,05	0,73±0,05	0,21
IMC (Kg/m ²)	24 ±3,7	22,3±2,5	0,18
apoA-I (mg/dl)	158±34	159±28	0,88
ApoB (mg/dl)	75±17	82±19	0,25
CT (mg/dl)	174±34	184±28	0,28
LDLc (mg/dl)	87±27	96±27	0,26
HDLc (mg/dl)	71±15	69±16	0,81
VLDLc (mg/dl)	17±9	19±7	0,37
TG (mg/dl)	81±37	93±34	0,27
HbA1c (%)	8,8±1,3	5,3±0,4	<0,001
Glicemia de jejum (mg/dl)†	230±113	71±8	<0,001
Tempo de DM (anos)	14,4±7,2	-	-
Idade do diagnóstico (anos)	13±8,4	-	-
TCGe (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	7,9±1,5	10,8±20,7	<0,001
Síndrome metabólica (%)†	4 (19%)	1 (5%)	0,34
Tamanho da HDL (nm)	10,2±1,2	9,7±0,9	0,16

Média±DP †Mann-Whitney ou teste exato de Fisher * pelo menos 3 vezes por semana em tempo superior a 30 minutos HAS=hipertensão arterial sistêmica, IECA=inibidor de enzima conversora de angiotensina, ACO=anticoncepcional oral, CA=circunferência abdominal, RCQ=relação cintura-quadril, IMC=índice de massa corpórea, apoA-I=apolipoproteína A-I, apoB=apolipoproteína B, CT=colesterol total, LDLc=LDL colesterol, HDLc=HDL colesterol, VLDLc=VLDL colesterol, TG=triglicérides, HbA1c=hemoglobina glicada A1c, HOMA-IR=homestasis model assesment insulin resistance, TCGe=estimativa da taxa de captação da glicose.

Tabela 8 - Taxas de transferência de lípides da nanoemulsão para as partículas HDL em mulheres diabéticas e não-diabéticas

Dados	Diabéticas (n= 21)	Não-diabéticas (n=21)	p
¹⁴ C-éster de colesterol (%)	3,9±1,3	3,7±0,9	0,63
¹⁴ C-fosfatidilcolina (%)	21,5±3,6	21,7±3,5	0,83
³ H-triglicérides (%)†	3,7±2,3	3,6±1,3	0,97
³ H -colesterol (%)	6,8±1,6	6,8±1,5	0,87

Média±DP. † Mann-Whitney.

Tabela 9 - Comparação de características antropométricas e clínicas, lípides e lipoproteínas plasmáticas, tamanho da partícula HDL e variáveis do metabolismo de carboidratos em homens diabéticos e não-diabéticos

Dados	Diabéticos (n= 15)	Não-diabéticos (n=13§)	p
Idade (anos)	26,4±7	28,4±6	0,4
HAS (%)†	3 (20%)	0	0,23
Atividade física (%) * †	7 (47%)	5 (42%)	1
Uso de IECA (%)†	4 (27%)	0	0,1
Tabagista (%)†	0	3 (23%)	0,09
CA (cm)	84,3±8,3	90,5±9,4	0,09
RCQ	0,83±0,04	0,82±0,05	0,8
IMC (Kg/m ²)	23,2±2,3	25,5±3,7	
apoA-I (mg/dl)	127±26	128±17	0,91
ApoB (mg/dl)	67±9	75±23	0,26
CT (mg/dl)	155±26	174±31	0,09
LDLc (mg/dl)	83±15	100±29	0,08
HDLc (mg/dl)	55±14	56±9	0,88
VLDLc (mg/dl)	16±8	16±8	0,95
TG (mg/dl)	80±39	81±40	0,94
HbA1c (%)	8,8±1,5	5,2±0,4	<0,001
Glicemia de jejum (mg/dl)†	192±96	81±4	<0,001
Tempo de DM (anos)	15,7±7,9	-	-
Idade do diagnóstico (anos)	12,2±7,2	-	-
TCGe (mg·kg ⁻¹ ·min ⁻¹)	6,7±2,0	9,8±0,7	<0,001
Síndrome metabólica (%)†	1 (6,7%)	0	1
Tamanho da HDL (nm)	10,4±1,6	9,8±1,2	0,2

Média±DP, § 03 só tinham perfil lipídico. †Mann-Whitney ou teste exato de Fisher *pelo menos 3 vezes por semana em tempo superior a 30 minutos. HAS=hipertensão arterial sistêmica, IECA= inibidor de enzima conversora de angiotensina, ACO=anticoncepcional oral, CA=circunferência abdominal, RCQ=relação cintura-quadril, IMC=índice de massa corpórea, apoA-I= apolipoproteína A-I, apoB=apolipoproteína B, CT=colesterol total, LDLc=LDL colesterol, HDLc=HDL colesterol, VLDLc=VLDL colesterol, TG=triglicérides, HbA1c=hemoglobina glicada A1c, HOMA-IR=homestasis model assesement insulin resistance, TCGe=estimativa da taxa de captação da glicose.

Tabela 10 - Taxas de transferência de lípidos da nanoemulsão para as partículas HDL em homens diabéticos e não-diabéticos

Lípidos radioativos	Diabéticos (n= 15)	Não-diabéticos (n=13)	p
¹⁴ C-éster de colesterol (%)	2,7±0,6	3,1±0,8	0,09
¹⁴ C-fosfatidilcolina (%)	19,3±3,7	20,7±3,9	0,33
³ H-triglicérides (%) ‡	2,1±0,8	2,3±0,5	0,38
³ H -colesterol (%)	5,9±1,7	6,0±0,9	0,78

Média±DP; ‡ Mann-Whitney.

Tabela 11 - Taxas de remoção fracional (TRF em h-1) e taxas de transferência da nanoemulsão com marcação CE e CL em indivíduos com e sem diabetes

Cinética	Diabéticos (n=15)	Não-diabéticos (n=15)	
TRF ³ H-CL	0,025±0,024	0,028±0,024	0,78
TRF ¹⁴ C-CE	0,059±0,022	0,039±0,022	0,019
K _{1.0} CL	0,911±0,731	0,866±0,651	0,86
K _{1.0} CE ‡	0,352±0,278	0,502±0,567	0,97
K _{2.0} CL	0,016±0,021	0,011±0,010	0,98
K _{2.0} CE	0,049±0,024	0,026±0,017	0,006
K _{1.2} CL ‡	0,999±0,972	0,677±0,815	0,19
K _{1.2} CE	1,939±1,464	1,436±1,425	0,35

Média±DP; ‡ Mann-Whitney TRF ³H-CL=taxa de remoção fracional do ³H-colesterol, TRF ¹⁴C-CE=taxa de remoção fracional do ¹⁴C-éster de colesterol, K_{1.0}=remoção não-específica da LDE, K_{1.2}=transformação da LDE pela aquisição das lipoproteínas, K_{2.0}=remoção da LDE do compartimento plasmático para o extravascular.

Tabela 12 - Taxa de esterificação (%) do ^3H -colesterol em 24 horas em homens diabéticos e não-diabéticos

Esterificação	Diabéticos (n= 15)	Não-diabéticos (n=11§)	p
0,08 hora	29,4±11,5	27,4±6,9	0,60
1 hora	40,3±15,1	35,0±10,3	0,35
2 horas	48,8±14,1	45,6±8,9	0,55
4 horas	51,1±12,3	49,5±11	0,83
8 horas	61,7±11,8	55,9±9,2	0,23
24 horas	65,7±9,6	63,1±9,1	0,51
Velocidade de esterificação (%/h)	1,56±0,34	1,52±0,24	0,54

Média±DP § hemólise de 04 amostras impediram a avaliação.

Tabela 13 - Correlações entre cinética de lípides, transferência de lípides para HDL, variáveis clínicas, bioquímicas em diabéticos com índice de resistência à insulina (n=15 para a cinética, demais associações n=36)

PARÂMETROS	TCGe	
	r	p
^3H -CL (%)	-0,053	0,76
^{14}C -CE (%)	-0,099	0,57
^{14}C -PL (%)	0,046	0,79
^3H -TG (%)	0,145	0,40†
TRF ^{14}C -CE (h^{-1})	0,112	0,69
TRF ^3H -CL (h^{-1})	-0,042	0,88
IMC (Kg/m^2)	-0,204	0,23
CA (cm)	-0,319	0,06
RCQ	-0,501	0,002
CT (mg/dl)	0,16	0,35
LDL (mg/dl)	0,208	0,22
HDL (mg/dl)	0,11	0,53
VLDL (mg/dl)	-0,167	0,26
TG (mg/dl)	-0,191	0,26
HbA1c (%)	-0,545	0,001
GJ (mg/dl)	0,136	0,44

^3H -CL= Colesterol livre marcado com ^3H , ^{14}C -CE= Éster de colesterol marcado com ^{14}C , ^{14}C -PL= Fosfatidilcolina marcada com ^{14}C , ^3H -TG= Triglicéride marcado com ^3H , TRF ^3H -CL=taxa de remoção fracional do ^3H -colesterol, TRF ^{14}C -CE=taxa de remoção fracional do ^{14}C -éster de colesterol, IMC=índice de massa corpórea, CA=circunferência abdominal, RCQ=relação cintura-quadril, IdadeDx= idade do diagnóstico do diabetes, CT=colesterol total, TG=triglicérides. †spearman.

Tabela 14 - Correlação entre cinética de lípidos e transferência de lípidos em não-diabéticos com índices de resistência à insulina, variáveis clínicas e bioquímicas (n=15 para cinética e 37 para a transferência)

PARÂMETROS	TCGe		HOMA-IR	
	r	p	r	p
³ H-CL (%)	0,110	0,550	-0,286	0,133
¹⁴ C-CE (%)	0,175	0,338	0,070	0,72
¹⁴ C-PL (%)	-0,120	0,513	0,078	0,687
³ H-TG (%)†	0,115	0,532	-0,140	0,469
TRF ¹⁴ C-CE (h ⁻¹)	-0,215	0,526	0,359	0,278
TRF ³ H-CL (h ⁻¹)	-0,378	0,252	-0,389	0,238
IMC (Kg/m ²)	-0,685	<0,001	0,244	0,211
CA (cm)	-0,755	<0,001	0,244	0,211
RCQ	-0,951	<0,001	0,219	0,236
CT (mg/dl)	-0,083	0,65	0,192	0,308
LDL (mg/dl)	-0,360	0,043	0,152	0,424
HDL (mg/dl)	0,541	0,001	0,083	0,664
apoA-I (mg/dl)	0,529	0,002	-0,258	0,176
VLDL (mg/dl)	-0,097	0,598	0,074	0,699
TG (mg/dl)	-0,088	0,632	0,065	0,731

³H-CL= Colesterol livre marcado com ³H, ¹⁴C-CE= Éster de colesterol marcado com ¹⁴C, ¹⁴C-PL= Fosfatidilcolina marcada com ¹⁴C, ³H-TG= Triglicéride marcado com ³H, TRF ³H-CL=taxa de remoção fracional do ³H-colesterol, TRF ¹⁴C-CE=taxa de remoção fracional do ¹⁴C-éster de colesterol, IMC=índice de massa corpórea, CA=circunferência abdominal, RCQ=relação cintura-quadril, IdadeDx= idade do diagnóstico do diabetes, CT=colesterol total, TG=triglicérides. †spearman.

Tabela 15 - Correlações entre a cinética de lípidos, transferência de lípidos para as HDL e esterificação do colesterol com o controle glicêmico em diabéticos (n=15, para cinética e 36 para transferência)

PARÂMETROS	Glicemia (mg/dl)		HbA1c (%)	
	r	p	r	p
³ H-CL (%)	-0,066	0,713	0,057	0,741
¹⁴ C-CE (%)	0,014	0,939	0,173	0,312
¹⁴ C-PL (%)	0,155	0,380	-0,050	0,773
³ H-TG (%)	-0,112	0,528	0,002	0,989
TRF ¹⁴ C-CE (h ⁻¹)	-0,052	0,855	0,089	0,753
TRF ³ H-CL (h ⁻¹)	0,281	0,310	0,063	0,823
EST _{5MIN} (%)	0,144	0,610	0,221	0,429
EST _{1H} (%)	-0,043	0,888	0,277	0,360
EST _{2H} (%)	-0,351	0,290	-0,022	0,949
EST _{4H} (%)	-0,256	0,422	0,184	0,567
EST _{8H} (%)	0,137	0,671	0,026	0,937
EST _{24H} (%)	-0,255	0,401	0,404	0,171
Velocidade (%/h)	-0,495	0,086	-0,043	0,890
Diferença (%)	-0,495	0,085	-0,038	0,902

³H-CL= Colesterol livre marcado com ³H, ¹⁴C-CE= Éster de colesterol marcado com ¹⁴C, ¹⁴C-PL= Fosfatidilcolina marcada com ¹⁴C, ³H-TG= Triglicéride marcado com ³H, TRF ³H-CL=taxa de remoção fracional do ³H-colesterol, TRF ¹⁴C-CE=taxa de remoção fracional do ¹⁴C-éster de colesterol, EST=esterificação, velocidade= velocidade de esterificação, Diferença=diferença entre a taxa percentual entre o último e 1º ponto de esterificação $\bar{r}$ spearman.

Tabela 16 - Correlações entre as transferências de lípides das nanoemulsões para as HDL com parâmetros bioquímicos e antropométricos em indivíduos diabéticos

PARÂMETROS	³ H-CL (%)		¹⁴ C-CE (%)†		¹⁴ C-PL (%)†		³ H-TG (%)†	
	r	p	r	p	r	p	r	p
apoA-I (mg/dl)	0,5	0,003	0,71	<0,001	0,2	0,25	0,4	0,02
HDLc (mg/dl)	0,47	0,004	0,65	<0,001	0,21	0,21	0,39	0,02
³ H-CL (%)	1	-	0,6	<0,001	0,6	<0,001	0,76	<0,001
¹⁴ C-CE (%)	0,59	<0,001	1	-	0,26	0,13	0,52	0,001
¹⁴ C-PL (%)	0,6	<0,001	0,26	0,13	1	-	0,63	<0,001
³ H-TG (%)	0,76	<0,001	0,52	0,001	0,63	<0,001	1	-
IMC (Kg/m ²)	0,46	0,005	0,29	0,08	0,07	0,68	0,12	0,47
CA (cm)	0,34	0,045	0,15	0,38	0,000	0,99	0,14	0,43
RCQ	-0,23	0,19	-0,36	0,031	-0,18	0,28	-0,3	0,08
CT (mg/dl)	0,22	0,2	0,42	0,01	0,03	0,88	0,25	0,15
LDL	-0,095	0,581	-0,053	0,758	-0,157	0,360	-0,019	0,913
VLDL (mg/dl)	0,16	0,34	0,37	0,03	0,16	0,35	0,15	0,39
TG (mg/dl)	0,17	0,32	0,36	0,03	0,16	0,36	0,19	0,27

³H-CL= Colesterol livre marcados com ³H, ¹⁴C-CE= Éster de colesterol marcado com ¹⁴C, ¹⁴C-PL= Fosfatidilcolina marcada com ¹⁴C, ³H-TG= Triglicérides marcados com ³H, IMC=índice de massa corpórea, CA=circunferência abdominal, RCQ=relação cintura-quadril, IdadeDx= idade do diagnóstico do diabetes, CT=colesterol total, TG=triglicérides†spearman.

Tabela 17 - Correlações entre as transferências de lípides da nanoemulsão para as HDL com parâmetros bioquímicos e antropométricos em indivíduos não-diabéticos

PARÂMETROS	³ H-CL (%)		¹⁴ C-CE (%)		¹⁴ C-PL (%)		³ H-TG (%)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
apoA-I (mg/dl)	0,73	<0,001	0,28	0,1	0,21	0,23	0,47	0,005
HDLc (mg/dl)	0,67	<0,001	0,15	0,4	0,32	0,06	0,37	0,03
³ H-CL (%)	1		0,32	0,06	0,27	0,12	0,61	<0,001
¹⁴ C-CE (%)	0,32	0,06	1		-0,3	0,08	0,37	0,03
¹⁴ C-PL (%)	0,27	0,12	-0,3	0,08	1		0,44	0,009
³ H-TG (%)†	0,61	<0,001	0,37	0,03	0,44	0,009	1	
IMC (Kg/m ²)	-0,11	0,95	0,02	0,9	-0,16	0,37	-0,16	0,39
CA (cm)	-0,11	0,56	-0,04	0,85	0,04	0,83	-0,2	0,28
RCQ	-0,21	0,26	-0,31	0,08	0,13	0,49	-0,2	0,3
CT (mg/dl)	0,2	0,25	0,4	0,02	0,001	0,99	0,3	0,09
LDL	-0,224	0,165	0,237	0,177	0,026	0,883	0,058	0,745
VLDL (mg/dl)	0,36	0,036	0,44	0,009	-0,23	0,19	0,26	0,13
TG (mg/dl)	0,36	0,037	0,46	0,007	-0,23	0,18	0,28	0,11

³H-CL= Colesterol livre marcado com ³H, ¹⁴C-CE= Éster de colesterol marcado com ¹⁴C, ¹⁴C-PL= Fosfatidilcolina marcada com ¹⁴C, ³H-TG= Triglicéride marcado com ³H, IMC=índice de massa corpórea, CA=circunferência abdominal, RCQ=relação cintura-quadril, IdadeDx= idade do diagnóstico do diabetes, CT=colesterol total, TG=triglicérides. †spearman.

Tabela 18. Correlações entre a cinética de lípidos, transferência de lípidos para as HDL e esterificação do colesterol com a insulinoterapia (n=15, para cinética e 36 para transferência)

PARÂMETROS	Dose total		Dose kg		Nº aplicações †	
	r	p	r	p	r	p
³ H-CL (%)	0,004	0,989	-0,039	0,891	0,075	0,790
¹⁴ C-CE (%)	-0,232	0,405	-0,278	0,315	-0,116	0,682
¹⁴ C-PL (%)‡	0,262	0,345	0,213	0,447	-0,077	0,785
³ H-TG (%)‡	-0,237	0,396	-0,158	0,574	0,243	0,383
TRF ¹⁴ C-CE (h ⁻¹)	0,444	0,098	0,484	0,067	-0,114	0,687
TRF ³ H-CL (h ⁻¹)‡	-0,131	0,643	-0,218	0,435	0,259	0,351
Tamanho HDL	0,083	0,770	0,169	0,548	-0,389	0,151
EST _{5MIN} (%)‡	0,159	0,571	0,107	0,704	0,516	0,049
EST _{1H} (%)	-0,195	0,523	-0,408	0,166	0,494	0,086
EST _{2H} (%)	-0,201	0,554	-0,434	0,183	0,422	0,196
EST _{4H} (%)	-0,249	0,434	-0,250	0,434	0,277	0,383
EST _{8H} (%)	-0,255	0,400	-0,269	0,374	0,459	0,115
EST _{24H} (%)	-0,604	0,029	-0,467	0,108	-0,318	0,289
Velocidade (%/h)	-0,598	0,031	-0,455	0,119	-0,299	0,321
Diferença (%)	0,130	0,644	0,074	0,793	0,310	0,261

³H-CL Colesterol livre marcado com ³H, ¹⁴C-CE = Éster de colesterol marcado com ¹⁴C, ¹⁴C-PL = Fosfatidilcolina marcada com ¹⁴C, ³H-TG = Triglicéride marcado com ³H, TRF ³H-CL = taxa de remoção fracional do ³H-colesterol, TRF ¹⁴C-CE = taxa de remoção fracional do ¹⁴C-éster de colesterol, EST = esterificação, velocidade = velocidade de esterificação, Diferença = diferença entre a taxa percentual entre o último e 1º ponto de esterificação; Dose total = dose total de insulina diária, Dose kg = dose de insulina dividida pelo peso em kg, Nº aplicações = número de aplicações de insulina ao dia. ‡spearman.

Figura 7. Transferência de lípidos da nanoemulsão para as partículas HDL em diabéticos e não-diabéticos

Figura 8. Curva da remoção plasmática (em h^{-1}) da emulsão ^{14}C -éster de colesterol em diabéticos e não-diabéticos em 24h

Figura 9. Curva de remoção plasmática (h^{-1}) da nanoemulsão ^3H -colesterol em diabéticos e não-diabéticos em 24 horas

Figura 10. Taxa de esterificação (%) do ^3H -colesterol em 24 horas em diabéticos e não-diabéticos

11 REFERÊNCIAS

1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007; 30 Suppl 1:S42-7.
2. Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia: basic mechanisms underlying the common hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol levels. *Diabetes* 1996; 45 Suppl 3:S27-30.
3. Goldberg IJ. Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(3):965-71.
4. Winocour PH, Durrington PN, Ishola M, Anderson DC. Lipoprotein abnormalities in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1986; 1(8491):1176-8.
5. Weis U, Turner B, Gibney J, Watts GF, Burke V, Shaw KM, et al. Long-term predictors of coronary artery disease and mortality in type 1 diabetes. *Qjm* 2001; 94(11):623-30.
6. Calvert GD, Graham JJ, Mannik T, Wise PH, Yeates RA. Effects of therapy on plasma-high-density-lipoprotein-cholesterol concentration in diabetes mellitus. *Lancet* 1978; 2(8080):66-8.
7. Nikkila EA, Hormila P. Serum lipids and lipoproteins in insulin-treated diabetes. Demonstration of increased high density lipoprotein concentrations. *Diabetes* 1978; 27(11):1078-86.
8. Durrington PN. Serum high density lipoprotein cholesterol in diabetes mellitus: an analysis of factors which influence its concentration. *Clin Chim Acta* 1980; 104(1):11-23.

9. Mattock MB, Salter AM, Fuller JH, Omer T, Gohari RE, Redmond SD, et al. High density lipoprotein subfractions in insulin-dependent diabetic and normal subjects. *Atherosclerosis* 1982; 45(1):67-79.
10. Moss SE, Klein R, Klein BE. Cause-specific mortality in a population-based study of diabetes. *Am J Public Health* 1991; 81(9):1158-62.
11. Mahley RW, Innerarity TL. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1983; 737(2):197-222.
12. Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res* 1987; 28(6):613-28.
13. Rosenstock J, Vega GL, Raskin P. Effect of intensive diabetes treatment on low-density lipoprotein apolipoprotein B kinetics in type I diabetes. *Diabetes* 1988; 37(4):393-7.
14. Ruotolo G, Parlavecchia M, Taskinen MR, Galimberti G, Zoppo A, Le NA, et al. Normalization of lipoprotein composition by intraperitoneal insulin in IDDM. Role of increased hepatic lipase activity. *Diabetes Care* 1994; 17(1):6-12.
15. Bagdade JD, Dunn FL, Eckel RH, Ritter MC. Intraperitoneal insulin therapy corrects abnormalities in cholesteryl ester transfer and lipoprotein lipase activities in insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb* 1994; 14(12):1933-9.
16. Bagdade JD, Teuscher AU, Ritter MC, Eckel RH, Robertson RP. Alterations in cholesteryl ester transfer, lipoprotein lipase, and lipoprotein composition after combined pancreas-kidney transplantation. *Diabetes* 1998; 47(1):113-8.

17. Gonen B, White N, Schonfeld G, Skor D, Miller P, Santiago J. Plasma levels of apoprotein B in patients with diabetes mellitus: the effect of glycemic control. *Metabolism* 1985; 34(7):675-9.
18. von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5(6):404-16.
19. Asztalos BF, Schaefer EJ. HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atheroscler Suppl* 2003; 4(1):21-9.
20. Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(2):160-7.
21. Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M. Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2005; 5(5):1431-45.
22. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999; 265(2):501-23.
23. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 2004; 45(6):993-1007.
24. Forti N, Diament J. High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. An update for clinicians. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87(5):671-9.

25. Castle CK, Pape ME, Marotti KR, Melchior GW. Secretion of pre-beta-migrating apoA-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture. *J Lipid Res* 1991; 32(3):439-47.
26. Danielsen EM, Hansen GH, Poulsen MD. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J Cell Biol* 1993; 120(6):1347-56.
27. Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res* 1994; 35(7):1187-99.
28. Francone OL, Royer L, Haghsassand M. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J Lipid Res* 1996; 37(6):1268-77.
29. von Eckardstein A, Jauhiainen M, Huang Y, Metso J, Langer C, Pussinen P, et al. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1301(3):255-62.
30. Jiang X, Francone OL, Bruce C, Milne R, Mar J, Walsh A, et al. Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J Clin Invest* 1996; 98(10):2373-80.
31. Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* 1996; 37(12):2473-91.
32. Krieger M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:523-58.

33. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1):8-15.
34. Genest J, Jr., Marcil M, Denis M, Yu L. High density lipoproteins in health and in disease. *J Investig Med* 1999; 47(1):31-42.
35. Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 1999; 144(2):285-301.
36. Barter PJ, Rye KA. High-density lipoproteins and coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk* 1994; 1(3):217-21.
37. Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(10):1792-8.
38. Silver DL, Jiang XC, Arai T, Bruce C, Tall AR. Receptors and lipid transfer proteins in HDL metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 902:103-11; discussion 111-2.
39. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(1):13-27.
40. Yamashita S, Sakai N, Hirano K, Ishigami M, Maruyama T, Nakajima N, et al. Roles of plasma lipid transfer proteins in reverse cholesterol transport. *Front Biosci* 2001; 6:D366-87.
41. Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu AY, Wright SD. Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* 1996;271(21):12172-8.

42. Rao R, Albers JJ, Wolfbauer G, Pownall HJ. Molecular and macromolecular specificity of human plasma phospholipid transfer protein. *Biochemistry* 1997; 36(12):3645-53.
43. Kostner GM, Oettl K, Jauhiainen M, Ehnholm C, Esterbauer H, Dieplinger H. Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem J* 1995; 305 (Pt 2):659-67.
44. Jauhiainen M, Metso J, Pahlman R, Blomqvist S, van Tol A, Ehnholm C. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J Biol Chem* 1993; 268(6):4032-6.
45. Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis* 2001; 155(2):269-81.
46. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529(1-3):245-56.
47. Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Remodelling of reconstituted high density lipoproteins by lecithin: cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* 1996; 37(9):1962-70.
48. Deakin S, Moren X, James RW. HDL oxidation compromises its influence on paraoxonase-1 secretion and its capacity to modulate enzyme activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(5):1146-52.
49. Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol* 2001; 38(4):163-169.

50. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, et al. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000; 43(3):312-20.
51. Lopes-Virella MF, Wohltmann HJ, Loadholt CB, Buse MG. Plasma lipids and lipoproteins in young insulin-dependent diabetic patients: relationship with control. *Diabetologia* 1981; 21(3):216-23.
52. Bagdade JD, Porte D, Jr., Bierman EL. Acute insulin withdrawal and the regulation of plasma triglyceride removal in diabetic subjects. *Diabetes* 1968; 17(3):127-32.
53. Taskinen MR. Lipoprotein lipase in diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3(2):551-70.
54. Taskinen MR. Quantitative and qualitative lipoprotein abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes* 1992; 41 Suppl 2:12-7.
55. Rivellese A, Riccardi G, Romano G, Giacco R, Patti L, Marotta G, et al. Presence of very low density lipoprotein compositional abnormalities in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients; effects of blood glucose optimisation. *Diabetologia* 1988;31(12):884-8.
56. Eckel RH, Albers JJ, Cheung MC, Wahl PW, Lindgren FT, Bierman EL. High density lipoprotein composition in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1981; 30(2):132-8.
57. Bagdade JD, Ritter MC, Subbaiah PV. Accelerated cholesteryl ester transfer in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1991; 21(2):161-7.

58. Bagdade JD, Dunn FL. Effects of insulin treatment on lipoprotein composition and function in patients with IDDM. *Diabetes* 1992; 41 Suppl 2:107-10.
59. Sibley SD, Palmer JP, Hirsch IB, Brunzell JD. Visceral obesity, hepatic lipase activity, and dyslipidemia in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(7):3379-84.
60. Colhoun HM, Otvos JD, Rubens MB, Taskinen MR, Underwood SR, Fuller JH. Lipoprotein subclasses and particle sizes and their relationship with coronary artery calcification in men and women with and without type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51(6):1949-56.
61. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(9):2995-8.
62. Lam MC, Tan KC, Lam KS. Glycoxidized low-density lipoprotein regulates the expression of scavenger receptors in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2004; 177(2):313-20.
63. Bustos P, Radojkovic C, Ulloa N, Munoz M, Martinez A, Calvo C, et al. Lipoprotein composition in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005; 18(3):257-64.
64. Valabhji J, McColl AJ, Schachter M, Dhanjil S, Richmond W, Elkeles RS. High-density lipoprotein composition and paraoxonase activity in Type I diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2001; 101(6):659-70.

65. Boemi M, Leviev I, Sirolla C, Pieri C, Marra M, James RW. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. *Atherosclerosis* 2001; 155(1):229-35.
66. Mackness B, Durrington PN, Boulton AJ, Hine D, Mackness MI. Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *Eur J Clin Invest* 2002; 32(4):259-64.
67. Ferretti G, Bacchetti T, Busni D, Rabini RA, Curatola G. Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):2957-62.
68. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993; 329(14):977-86.
69. Kanh CS, RJ; Jacobson, AM; Weir, GC; King, GL. The Molecular Mechanism of Insulin Action and the Regulation of Glucose and Lipid Metabolism. In: Kanh C, editor. *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14^a Ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 145-168.
70. Lalli C, Ciofetta M, Del Sindaco P, Torlone E, Pampanelli S, Compagnucci P, et al. Long-term intensive treatment of type 1 diabetes with the short-acting insulin analog lispro in variable combination with NPH insulin at mealtime. *Diabetes Care* 1999; 22(3):468-77.

71. Colhoun HM, Scheek LM, Rubens MB, Van Gent T, Underwood SR, Fuller JH, et al. Lipid transfer protein activities in type 1 diabetic patients without renal failure and nondiabetic control subjects and their association with coronary artery calcification. *Diabetes* 2001; 50(3):652-9.
72. Quell horst E. Insulin therapy during peritoneal dialysis: pros and cons of various forms of administration. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 Suppl 1:S92-6.
73. Schade DS, Eaton RP, Friedman NM, Spencer WJ. Normalization of plasma insulin profiles with intraperitoneal insulin infusion in diabetic man. *Diabetologia* 1980; 19(1): 35-9.
74. Goff DC, Jr., D'Agostino RB, Jr., Haffner SM, Otvos JD. Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations. Results from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Metabolism* 2005; 54(2):264-70.
75. DeFronzo RA, Hendler R, Simonson D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1982; 31(9):795-801.
76. DeFronzo RA, Simonson D, Ferrannini E. Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1982; 23(4): 313-9.
77. Teupe B, Bergis K. Epidemiological evidence for "double diabetes". *Lancet* 1991;337(8737):361-2.
78. Dabelea D, Kinney G, Snell-Bergeon JK, Hokanson JE, Eckel RH, Ehrlich J, et al. Effect of type 1 diabetes on the gender difference in coronary

artery calcification: a role for insulin resistance? The Coronary Artery

Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) Study. *Diabetes* 2003; 52(11):2833-9.

79. Orchard TJ, Olson JC, Erbey JR, Williams K, Forrest KY, Smithline Kinder L, et al. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 2003; 26(5):1374-9.

80. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28(7):412-9.

81. Williams KV, Erbey JR, Becker D, Arslanian S, Orchard TJ. Can clinical factors estimate insulin resistance in type 1 diabetes? *Diabetes* 2000; 49(4): 626-32.

82. Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids* 1993; 28(8): 691-6.

83. Maranhão RC, Roland IA, Toffoletto O, Ramires JA, Gonçalves RP, Mesquita CH, et al. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids* 1997; 32(6): 627-33.

84. Hirata RD, Hirata MH, Mesquita CH, Cesar TB, Maranhão RC. Effects of apolipoprotein B-100 on the metabolism of a lipid microemulsion model in rats. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1437(1):53-62.
85. Pinto LB, Wajngarten M, Silva EL, Vinagre CC, Maranhão RC. Plasma kinetics of a cholesterol-rich emulsion in young, middle-aged, and elderly subjects. *Lipids* 2001; 36(12):1307-11.
86. Oliveira MR, Maranhão RC. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in normolipidemic obese women after a short-period weight loss by energy-restricted diet. *Metabolism* 2002; 51(9):1097-103.
87. Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena SM, Coelho IJ, et al. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res* 1994; 54(17):4660-6.
88. 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(5):411-8.
89. Ho YK, Smith RG, Brown MS, Goldstein JL. Low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 1978; 52(6):1099-114.
90. Millar JS, Lichtenstein AH, Cuchel M, Dolnikowski GG, Hachey DL, Cohn JS, et al. Impact of age on the metabolism of VLDL, IDL, and LDL apolipoprotein B-100 in men. *J Lipid Res* 1995; 36(6): 1155-67.

91. Melo NR, Latrilha MC, Santos RD, Pompei LM, Maranhão RC. Effects in post-menopausal women of transdermal estrogen associated with progestin upon the removal from the plasma of a microemulsion that resembles low-density lipoprotein (LDL). *Maturitas* 2005; 50(4): 275-81.
92. Sachet JC, Borba EF, Bonfa E, Vinagre CG, Silva VM, Maranhão RC. Chloroquine increases low-density lipoprotein removal from plasma in systemic lupus patients. *Lupus* 2007; 16(4):273-8.
93. Standards of medical care in diabetes--2007. *Diabetes Care* 2007; 30 Suppl 1:S4-S41.
94. James TM, Davis JE, McDonald JM, Santiago JV, Ladenson JH. Comparison of hemoglobin A1c and hemoglobin A1 in diabetic patients. *Clin Biochem* 1981; 14(1):25-7.
95. Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkins SL. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2007; 30(3):707-12.
96. Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters. Protein-free models of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1982; 257(14):8216-27.
97. Marchese SRM, Mesquita CH, I.I.L. C. Anacomp program application to calculate ^{137}C transfer rates in marine organisms and dose in man. *J Radioan Nucl Chem* 1998; 232:233 - 236.
98. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226(1):497-509.

99. Lima ES, Maranhão RC. Rapid, simple laser-light-scattering method for HDL particle sizing in whole plasma. *Clin Chem* 2004; 50(6):1086-8.
100. Sowby FS. Limits for Intakes of Radionuclides by Workers. ICRP publication 30. In: Sowby FS, editor. Radiation protection. Oxford: Pergamon Press; 1984.
101. International Commission on Radiological Protection. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection Publication. In: Press P, editor. Oxford UK; 1977.
102. Boxenbaum H, Ronfeld R. Interspecies pharmacokinetic scaling and the Dedrick plots. *Am J Physiol* 1983; 245(6):R768-75.
103. Maranhão RC, Quintão EC. Long term steroid metabolism balance studies in subjects on cholesterol-free and cholesterol-rich diets: comparison between normal and hypercholesterolemic individuals. *J Lipid Res* 1983; 24(2):167-73.
104. Altman PL, Dittmer, D.S. Federation of the American Societies for Experimental Biology. In: Biology Data Book. Bethesda, Maryland, USA; 1974.
105. Swarnakar S, Reyland ME, Deng J, Azhar S, Williams DL. Selective uptake of low density lipoprotein-cholesteryl ester is enhanced by inducible apolipoprotein E expression in cultured mouse adrenocortical cells. *J Biol Chem* 1998; 273(20):12140-7.
106. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232(4746):34-47.

107. Hobbs HH, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992; 1(6): 445-66.
108. Santos RD, Chacra AP, Morikawa A, Vinagre CC, Maranhão RC. Plasma kinetics of free and esterified cholesterol in familial hypercholesterolemia: effects of simvastatin. *Lipids* 2005; 40(7):737-43.
109. Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Llacer PD, Pileggi FJ, Chamone DA. Increased plasma removal of microemulsions resembling the lipid phase of low-density lipoproteins (LDL) in patients with acute myeloid leukemia: a possible new strategy for the treatment of the disease. *Braz J Med Biol Res* 1992; 25(10): 1003-7.
110. Graziani SR, Igreja FA, Hegg R, Meneghetti C, Brandizzi LI, Barboza R, et al. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by breast cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 85(3):493-7.
111. Ades A, Carvalho JP, Graziani SR, Amancio RF, Souen JS, Pinotti JA, et al. Uptake of a cholesterol-rich emulsion by neoplastic ovarian tissues. *Gynecol Oncol* 2001; 82(1): 84-7.
112. Dias ML, Carvalho JP, Rodrigues DG, Graziani SR, Maranhão RC. Pharmacokinetics and tumor uptake of a derivatized form of paclitaxel associated to a cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) in patients with gynecologic cancers. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 59(1):105-11.
113. Streicher R, Kotzka J, Muller-Wieland D, Krone W. Regulation of the LDL receptor gene expression by hormones. *Z Ernährungswiss* 1998; 37 Suppl 1:85-7.

114. Nagele H, Gebhardt A, Niendorf A, Kroschinski J, Zeller W. LDL receptor activity in human leukocyte subtypes: regulation by insulin. *Clin Biochem* 1997;30(7):531-8.
115. Streicher R, Kotzka J, Muller-Wieland D, Siemeister G, Munck M, Avci H, et al. SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* 1996; 271(12):7128-33.
116. Swami S, Sztalryd C, Kraemer FB. Effects of streptozotocin-induced diabetes on low density lipoprotein receptor expression in rat adipose tissue. *J Lipid Res* 1996; 37(2):229-36.
117. Wade DP, Knight BL, Soutar AK. Regulation of low-density-lipoprotein-receptor mRNA by insulin in human hepatoma Hep G2 cells. *Eur J Biochem* 1989; 181(3):727-31.
118. Wade DP, Knight BL, Soutar AK. Hormonal regulation of low-density lipoprotein (LDL) receptor activity in human hepatoma Hep G2 cells. Insulin increases LDL receptor activity and diminishes its suppression by exogenous LDL. *Eur J Biochem* 1988; 174(1):213-8.
119. Chirieac DV, Cianci J, Collins HL, Sparks JD, Sparks CE. Insulin suppression of VLDL apo B secretion is not mediated by the LDL receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297(1):134-7.
120. Kraemer FB, Sather SA, Park B, Sztalryd C, Natsu V, May K, et al. Low density lipoprotein receptors in rat adipose cells: subcellular localization and regulation by insulin. *J Lipid Res* 1994; 35(10):1760-72.

121. Duvillard L, Florentin E, Lizard G, Petit JM, Galland F, Monier S, et al. Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy. *Diabetes Care* 2003; 26(5):1540-4.
122. Krone W, Naegele H, Behnke B, Greten H. Opposite effects of insulin and catecholamines on LDL-receptor activity in human mononuclear leukocytes. *Diabetes* 1988; 37(10):1386-91.
123. Ko KW, Avramoglu RK, McLeod RS, Vukmirica J, Yao Z. The insulin-stimulated cell surface presentation of low density lipoprotein receptor-related protein in 3T3-L1 adipocytes is sensitive to phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *Biochemistry* 2001; 40(3):752-9.
124. Oppenheimer MJ, Sundquist K, Bierman EL. Downregulation of high-density lipoprotein receptor in human fibroblasts by insulin and IGF-I. *Diabetes* 1989; 38(1):117-22.
125. Sekar N, Veldhuis JD. Concerted transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene by insulin and luteinizing hormone in cultured porcine granulosa-luteal cells: possible convergence of protein kinase a, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Endocrinology* 2001; 142(7):2921-8.
126. Menrad A, Anderer FA. Expression of LDL receptor on tumor cells induced by growth factors. *Anticancer Res* 1991; 11(1):385-90.
127. Duvillard L, Pont F, Florentin E, Gambert P, Verges B. Significant improvement of apolipoprotein B-containing lipoprotein metabolism by insulin

treatment in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.

Diabetologia 2000; 43(1):27-35.

128. Taskinen MR, Packard CJ, Shepherd J. Effect of insulin therapy on metabolic fate of apolipoprotein B-containing lipoproteins in NIDDM. Diabetes 1990; 39(9): 1017-27.

129. Perez A, Caixas A, Carreras G, Mauricio D, Pou JM, Serrat J, et al. Lipoprotein compositional abnormalities in type I diabetes: effect of improved glycaemic control. Diabetes Res Clin Pract 1997; 36(2):83-90.

130. Binder C, Lauritzen T, Faber O, Pramming S. Insulin pharmacokinetics. Diabetes Care 1984; 7(2):188-99.

131. Pickup JW, G. Insulin Pharmacology. In: Pickup JW, G, editor. Textbook of Diabetes. 3rd ed: Blackwell Science; 2003. p. 42.1-42.15.

132. Soedamah-Muthu SS, Chang YF, Otvos J, Evans RW, Orchard TJ. Lipoprotein subclass measurements by nuclear magnetic resonance spectroscopy improve the prediction of coronary artery disease in Type 1 diabetes. A prospective report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. Diabetologia 2003; 46(5):674-82.

133. Dirican M, Serdar Z, Sarandöl E, Surmen-gür E. Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Activity and Cholesteryl Ester Transfer Rate in Patients with Diabetes Mellitus. Turk J Med Sci 2002; 33:95-101.

134. Ritter MC, Bagdade JD. Changes in high density lipoprotein subfraction lipids during neutral lipid transfer in healthy subjects and in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Lipids 1996; 31(1):1-7.

135. Medina WL, Nunes VS, Carrilho AJ, Shimabukuru AF, Lottenberg AM, Lottenberg SA, et al. High-density lipoprotein cholesterol esterification and transfer rates to lighter density lipoproteins mediated by cholesteryl ester transfer protein in the fasting and postprandial periods are not altered in type 1 diabetes mellitus. *Eur J Intern Med* 2000; 11(5):264-270.
136. Valabhji J, Donovan J, McColl AJ, Schachter M, Richmond W, Elkeles RS. Rates of cholesterol esterification and esterified cholesterol net mass transfer between high-density lipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoproteins in Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2002; 19(5):424-8.
137. Ohta T, Nishiyama S, Nakamura T, Saku K, Maung KK, Matsuda I. Predominance of large low density lipoprotein particles and lower fractional esterification rate of cholesterol in high density lipoprotein in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Pediatr* 1998; 157(4):276-81.
138. Hayashibe H, Asayama K, Nakane T, Kobayashi K, Amemiya S, Nakazawa S. Decreased activity of plasma cholesteryl ester transfer protein in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Paediatr* 1999; 88(10):1067-70.
139. Liu XQ, Bagdade JD. Neutral lipid mass transfer among lipoproteins in plasma from normolipidemic subjects is not an equimolar heteroexchange. *J Lipid Res* 1995; 36(12):2574-9.
140. Lagrost L, Desrumaux C, Masson D, Deckert V, Gambert P. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9(3):203-9.

141. Lagrost L, Athias A, Gamber P, Lallemand C. Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 1994;35(5):825-35.
142. de Vries R, Kerstens MN, Sluiter WJ, Groen AK, van Tol A, Dullaart RP. Cellular cholesterol efflux to plasma from moderately hypercholesterolaemic type 1 diabetic patients is enhanced, and is unaffected by simvastatin treatment. *Diabetologia* 2005; 48(6):1105-13.
143. Chang CK, Tso TK, Snook JT, Huang YS, Lozano RA, Zipf WB. Cholesteryl ester transfer and cholesterol esterification in type 1 diabetes: relationships with plasma glucose. *Acta Diabetol* 2001; 38(1):37-42.
144. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005; 353(25):2643-53.