Marina da Paz Bertato

Cinética plasmática do colesterol livre e do colesterol esterificado e transferência *in vitro* de lípidos para a HDL, utilizando uma nanoemulsão lipídica artificial, em indivíduos com intolerância à glicose

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

São Paulo

2010

Marina da Paz Bertato

Cinética plasmática do colesterol livre e do colesterol esterificado e transferência *in vitro* de lípidos para a HDL, utilizando uma nanoemulsão lipídica artificial, em indivíduos com intolerância à glicose

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

Área de Concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Lerario

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bertato, Marina da Paz

Cinética plasmática do colesterol livre e do colesterol esterificado e transferência *in vitro* de lípidos para a HDL, utilizando uma nanoemulsão lipídica artificial, em indivíduos com intolerância à glicose / Marina da Paz Bertato. -- São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientador: Antonio Carlos Lerario.

Descritores: 1.Intolerância à glucose 2.Cinética 3.Lipoproteínas LDL
4.Lipoproteínas HDL 5.Resistência à insulina 6.Aterosclerose

USP/FM/SBD-006/10

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida:

Primeiramente a Deus, por estar sempre comigo, me iluminando e me guiando na vida.

Aos meus queridos pais, *Antonio Claret e Lêda*, agradeço pelo que sou hoje, pelo apoio, esforço e dedicação ao longo desses anos, por tudo que me deram, que fizeram e ainda fazem para me ver feliz. Tenham certeza que o amor incondicional e a participação de vocês em cada fase da minha vida me fizeram superar os obstáculos e conseguir chegar até aqui!

Às minhas irmãs, *Maria Beatriz e Ludmila*, pela amizade e compreensão nos meus momentos mais difíceis desta fase e pelo grande amor que sempre tivemos e que nos mantém unidas!

Ao meu noivo, *Adriano*, que acompanhou de perto e de longe o início desta jornada, pela compreensão ao longo destes quatro anos que não foram fáceis, pela paciência em consertar o meu computador, me ajudar a usar o excel e a construir gráficos, pelo colo e horas não dormidas nos momentos mais difíceis, inclusive nos problemas de saúde. Obrigada pelo otimismo e persistência em sempre me mostrar a importância de cada aprendizado e conquista minha. Sua maneira simples de ver e resolver as coisas foram meu guia em cada etapa desta fase. Seu carinho e amor de cada dia me deram forças para ir até o fim!

AGRADECIMENTOS

Aos *pacientes*, pela confiança em gentilmente colaborar e tornar possível este estudo.

Ao meu orientador *Prof. Dr. Antonio Carlos Lerario*, por me aceitar como aluna e pela confiança que depositou em mim. Obrigada por me ensinar o complexo mundo do diabetes *mellitus*, pelos ensinamentos e conselhos profissionais e pessoais. A você, meu respeito e admiração pela pessoa que é e pelo seu profissionalismo.

Ao *Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão*, pela co-orientação e pela oportunidade de iniciar no fascinante mundo da pesquisa. Obrigada por me receber em seu laboratório e me mostrar o complexo mundo dos lípidos. Agradeço pelo esforço incansável em ensinar a seus alunos a difícil arte de fazer pesquisa.

À minha ex-professora de graduação *Prof. Dra. Maria Rita Marques de Oliveira*, por ter me trazido ao Laboratório de Metabolismo de Lípidos, pela confiança em mim e por ter me dado esta oportunidade.

Ao *Dr. Paulo Jorge Moffa*, chefe do Serviço de Eletrocardiograma do Esforço do Instituto do Coração por conceder a realização dos exames nos pacientes.

Ao *Prof. Dr. Manoel de Souza Rocha*, chefe do Departamento de Tomografia do Instituto de Radiologia do HC da FMUSP, pelo auxílio na execução e interpretação dos exames de tomografia dos pacientes.

À *Marcia Yamada*, do Serviço de Pesquisa Clínica do Instituto de Radiologia do HC, pelo gentil auxílio com a realização da tomografia dos pacientes.

À *Prof. Dra. Carmen Vinagre*, sempre solícita em ajudar a discutir e compreender os estudos cinéticos e o complexo modelo compartimental.

Ao *Prof. Dr. Bernardo Leo Wajchenberg*, renomado pesquisador, por acreditar neste trabalho e pelas preciosas contribuições concedidas.

Ao *Prof. Dr. Roberto Tadeu Barcellos Betti*, pelo incentivo neste trabalho, pela atenção que sempre me recebeu no Núcleo de Diabetes.

Ao *Dr. Nelson Vinícius Gonfinetti*, pela paciência e cuidado em me encaminhar pacientes, fundamental para a concretização desta pesquisa.

Ao *Prof. Dr. Carlos Henrique Mesquita*, pela várias tentativas em decifrar sua própria criação, o enigmático modelo compartimental utilizado para avaliar a cinética das nanoemulsões lipídicas artificiais.

À *Dra. Carolina Piras de Oliveira*, pelo apoio e colaboração em todas as etapas desta pesquisa, pela ajuda com a seleção e coleta dos pacientes e com os experimentos no Laboratório.

À colega de profissão, *Ana Carolina Gagliardi*, agradeço por me acompanhar na nossa incansável busca por pacientes nos corredores do hospital quando já não havia mais esperanças.

À secretária do Núcleo de Diabetes *Marineuza Gomes Rangel*, por todo suporte nesses quatro anos de InCor, sempre pronta a ajudar. A você, que foi minha amiga e até paciente, minha eterna gratidão por tudo.

Agradeço a todos os colegas, estagiários, alunos de iniciação científica, funcionários e pós-graduandos do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor: *Augusta, Maria, Conceição, Thaís Contente, Yara Kretzer, Nancy Aptekmann, Antonio Leite, Adriana Bulgarelli, Amanda Padoveze* (ex-aluna), *Talita Seydell* (ex-aluna), *Adriana Bonaco* e *Mariana Balbertini*, que contribuíram de alguma forma neste trabalho, e em especial a:

Débora Deus, pelo preparo das emulsões e pelas agradáveis conversas proporcionadas no nosso happy-hour, uma eterna companheira.

Sheila Loyolla, ex-secretária do Laboratório, pela ajuda com assuntos do Laboratório, pela amizade e por sempre, ou nem sempre, querer compartilhar comigo a sua paixão pelo doce, a qual eu me rendia facilmente.

Wanderley Gomes, pela eficiente colaboração na coleta dos pacientes, mais que isso, pelas suas adoráveis palavras de incentivo e encorajamento nos meus momentos difíceis no laboratório.

À amiga e colega de profissão *Fernanda Maniero*, quem primeiro me recebeu no Laboratório, passando seus conhecimentos e aprendizados adquiridos, pela amizade e disposição em sempre querer ajudar.

À amiga e colega de profissão *Tatiane Vanessa de Oliveira*, pela ajuda na discussão de artigos e nos experimentos do laboratório, pela amizade e, principalmente, por estar do meu lado nesta reta final de finalização. A nossa união foi fundamental para que conseguíssemos, pacificamente, disputar a atenção do Prof. Raul numa árdua tarefa: escrever o artigo. Sua companhia, às vésperas do Natal e Ano Novo, me tranquilizou. Muito obrigada!

À divertida amiga e também colega de profissão *Juliana Vinagre*, que com o seu jeito discreto de ser, foi minha parceira de disciplina, de bancada e minha grande amiga nessa fase do mestrado.

Ao amigo *Jeferson Souza*, por participar das discussões dos estudos cinéticos, sempre muito interessado em ajudar no que fosse preciso.

À amiga biomédica *Fernanda Pozzi*, pel auxílio com a coleta dos pacientes, por ser minha colega de bancada, me ensinando com toda facilidade do mundo como realizar um experimento.

À querida amiga biomédica *Vanessa Monteiro*, quem primeiro me ensinou a mexer com toda a maquinaria do Laboratório, me ensinando a pipetar, a usar a centrífuga e o contador beta. Agradeço por sempre estar presente quando precisei, pelas adoráveis conversas, otimistas e verdadeiras.

À adorável amiga *Aleksandra Tiemi Morikawa*, pela preciosa ajuda com a técnica da esterificação. Sempre me fazendo rir com suas conversas, ofereceu palavras de apoio e seu ombro amigo durante esta trajetória. Obrigada por tudo!

À querida amiga *Cristina Pio de Almeida*, pelas discussões sobre a “nanoemulsão” e por suas experientes palavras que sempre me confortam.

À amiga *Marília de Oliveira*, que sofreu junto comigo até quando a minha coluna não suportava mais as exaustivas horas de trabalho. Obrigada pela força nesses momentos e pela amizade!

À amiga biomédica *Maria Elisabeth Rodrigues*, pelo auxílio na coleta dos pacientes, pela amizade nos momentos difíceis e pelas palavras de força e otimismo.

Ao *Bill Presada*, pelo auxílio no inglês e pela amizade.

Aos queridos amigos do Laboratório: *Priscila Oliveira*, *Fátima Freitas*, *Elisabeth Ficher* e *Rosani Stefani*, pelas inúmeras discussões sobre os estudos cinéticos e por participarem dessa minha conquista, pela amizade e pela força.

Ao meu cunhado *Vinícius Fernandes*, meus sinceros agradecimentos pela compreensão durante o Mestrado, por me receber em sua casa tantos dias quando eu não morava mais em São Paulo e pela amizade.

À amiga *Sofia Gutierrez*, minha gratidão por sempre acreditar em mim, pelo incentivo a fazer o Mestrado e pelas carinhosas palavras nos meus momentos de dificuldade.

À querida amiga de longa data *Renata Nave*, pelo encorajamento, pelos conselhos na vida pessoal e acadêmica e por sempre estar presente na minha vida.

À amiga *Aretha Medina*, pela amizade e incentivo aos estudos.

À amiga de graduação *Carolina Souza*, pela amizade e confiança, pelas acolhedoras palavras sempre prontas e por me inspirar a ingressar na Pós-graduação.

Às amigas de graduação: *Marcella Aude* e *Patrícia Novais*, pelo incentivo e pela amizade.

A todos os meus familiares, colegas e amigos não citados, pelo amor, carinho e apoio ao longo desses anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio concedido, fundamental para a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

"Uma longa viagem começa com um único passo"

(Lao-Tsé)

"....E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais...."

(William Shakespeare)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O diabetes <i>mellitus</i> e a doença cardiovascular	3
1.2 Qual é a relação do diabetes <i>mellitus</i> e da intolerância à glicose com a doença cardiovascular?	5
1.3 O papel da resistência à insulina e do tecido adiposo	6
1.4 Metabolismo de lípidos	7
1.4.1 Metabolismo da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e da lipoproteína de baixa densidade (LDL)	9
1.4.2 Metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL)	11
1.5 A importância da dislipidemia no diabetes <i>mellitus</i> e na intolerância à glicose.....	14
1.6 Estudos cinéticos de lipoproteínas.....	17
3. OBJETIVOS.....	23
4. CASUÍSTICA	25
4.1 Local do estudo.....	26
4.2 Recrutamento dos pacientes	26
4.3 Critérios de inclusão	27
4.4 Critérios de exclusão.....	27
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1 Avaliação clínica e antropométrica	29
5.2 Exames laboratoriais	30
5.3 Resistência à insulina	31
5.4 Distribuição da adiposidade abdominal	32
5.5 Cinética plasmática do ³ H-colesterol livre e do ¹⁴ C-éster de colesterol33	
5.5.1 Preparo da nanoemulsão.....	33
5.5.2 Estudo cinético	34
5.5.3 Análise compartimental dos dados cinéticos	34
5.6 Esterificação do ³ H-colesterol livre presente na nanoemulsão lipídica artificial.....	37

5.7 Transferência <i>in vitro</i> de éster de colesterol (EC), fosfolípide (PL), triglicérides (TG) e colesterol livre (CL) da nanoemulsão para a HDL	38
5.8 Segurança radiológica	39
5.9 Análise estatística	41
6. DESENHO DO ESTUDO	42
7. RESULTADOS	45
7.1 Avaliação clínica e antropométrica	46
7.2 Exames laboratoriais	48
7.3 Resistência à insulina	49
7.4 Distribuição da adiposidade abdominal	50
7.5 Cinética plasmática do ³ H-colesterol livre e do ¹⁴ C-éster de colesterol	51
7.6 Esterificação do ³ H-colesterol livre presente na nanoemulsão lipídica artificial.....	52
7.7 Transferência <i>in vitro</i> de éster de colesterol (CE), fosfolípide (PL), triglicérides (TG) e colesterol livre (CL) da nanoemulsão para a HDL	53
8. DISCUSSÃO	54
8.1 Avaliação clínica, laboratorial e antropométrica.....	57
8.2 Distribuição da adiposidade abdominal	60
8.3 Resistência à insulina	61
8.4 Cinética plasmática do ³ H-colesterol livre e do ¹⁴ C-éster de colesterol	64
8.5 Esterificação do ³ H-colesterol livre presente na nanoemulsão lipídica artificial.....	68
8.6 Transferência <i>in vitro</i> de éster de colesterol (EC), fosfolípide (FL), triglicérides (TG) e colesterol livre (CL) da nanoemulsão para a HDL	69
9. CONCLUSÕES	73
10. ANEXOS	75
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA1	ATP-binding cassette transporters A1
ACAT	acil-colesterol-acil transferase
ADA	American Diabetes Association
AGL	ácidos graxos livres
Apo	apolipoproteína
CA	circunferência abdominal
CETP	proteína de transferência de éster de colesterol
CL	colesterol livre
CQ	circunferência do quadril
DAC	doença arterial coronária
DCV	doença cardiovascular
DM2	diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
EC	éster de colesterol
FL	fosfolípide
HbA1C	hemoglobina glicada
HDL	lipoproteína de alta densidade
IDF	International Diabetes Federation
IDL	lipoproteína de densidade intermediária
IG	intolerância à glicose
IMC	índice de massa corporal
LCAT	lecitina-colesterol-acil transferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LE	lipase endotelial
LH	lipoproteína lipase hepática
LLP	lipoproteína lipase lipoprotéica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLTP	proteína de transferência de fosfolípide
QM	quilomícron
QMr	quilomícron remanescente
RCQ	relação cintura/quadril
RI	resistência à insulina
SM	síndrome metabólica
SRA	scavengers receptors
SR-B1	receptor scavenger classe B tipo I
TC	tomografia computadorizada
TFR	taxa fracional de remoção
TG	triglicérides
TOTG	teste oral de tolerância à glicose
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura de uma lipoproteína.....	8
FIGURA 2. Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL).....	10
FIGURA 3. Estrutura da lipoproteína de alta densidade (HDL).....	14
FIGURA 4. Modelo compartimental utilizado para analisar a cinética plasmática do ^3H -colesterol livre e do ^{14}C -éster de colesterol da nanoemulsão.....	35
FIGURA 5. Modelo esquemático do comportamento cinético da nanoemulsão lipídica: (A) Estrutura da nanoemulsão lipídica (ii) em comparação à lipoproteína LDL natural (i); (B) Nanoemulsão adquire apolipoproteínas, preferencialmente apo E, na circulação sanguínea; (C) Nanoemulsão é reconhecida pelas receptores B/E e removida da circulação.....	36
FIGURA 6. Modelo esquemático da transferência <i>in vitro</i> dos quatro lípidos marcados da nanoemulsão lipídica para a lipoproteína HDL: (A) Incubação do plasma com a nanoemulsão lipídica radioativamente marcada; (B) Precipitação da fração HDL; (C) Obtenção da taxa (em %) dos lípidos transferidos da nanoemulsão lipídica para a HDL.....	39
FIGURA 7. Desenho do estudo.....	44
FIGURA 8. Distribuição da circunferência abdominal (A), relação cintura/quadril (B) e índice de massa corpórea (C), segundo o limite de risco proposto pela Federação Internacional de Diabetes, no grupo IG (n=14)....	47
FIGURA 9. Distribuição da circunferência abdominal (A), relação cintura/quadril (B) e índice de massa corpórea (C), segundo o limite de risco no grupo controle (n=15).....	48
FIGURA 10. Curvas de decaimento plasmático do ^{14}C -éster de colesterol nos grupos IG (n=14) e controle (n=15).....	52
FIGURA 11. Curvas de decaimento plasmático do ^3H -colesterol livre nos grupos IG (n=14) e controle (n=15).....	52
FIGURA 12. Curva da taxa de esterificação do ^3H -colesterol livre nos grupos IG (n=12) e controle (n=7).....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Características clínicas dos grupos IG e controle.....	46
TABELA 2. Medicamentos utilizados pelos pacientes dos grupos IG e controle para tratamento das comorbidades hipertensão e hipotireoidismo.....	48
TABELA 3. Parâmetros bioquímicos dos grupos IG e controle.....	49
TABELA 4. Valores de homeostase glicêmica avaliado pelo HOMA e insulina de jejum dos grupos IG e controle.....	50
TABELA 5. Distribuição da adiposidade abdominal nos grupos IG e controle.....	50
TABELA 6. Taxa fracional de remoção (TFR) e parâmetros cinéticos (K's) dos compartimentos 1 e 2 do ^{14}C -éster de colesterol e do ^3H -colesterol livre da nanoemulsão lipídica nos grupos IG e controle.....	51
TABELA 7. Transferência <i>in vitro</i> dos lípides marcados da nanoemulsão lipídica para a HDL nos grupos IG e controle.....	53

RESUMO

BERTATO, MP. **Cinética plasmática do colesterol livre e do colesterol esterificado e transferência *in vitro* de lípides para a HDL, utilizando uma nanoemulsão lipídica artificial, em indivíduos com intolerância à glicose.** São Paulo, 2010. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

O indivíduo com diabetes *mellitus* tipo 2 apresenta um risco de 2 a 4 vezes maior de desenvolver doença cardiovascular (DCV) quando comparado ao não-diabético, sendo que este aumento do risco para o desenvolvimento da DCV também é observado quando na intolerância à glicose (IG) que ocorre em fases mais precoces da história natural do diabetes. Atribui-se ser a presença da síndrome metabólica (SM), que ocorre na maioria dos pacientes com DM2 e IG, um fator importante para o desenvolvimento da DCV nestes indivíduos. Dos componentes da SM, inúmeros estudos destacam a dislipidemia como um dos principais fatores para este risco. A dislipidemia comumente encontrada na IG é caracterizada por hipertrigliceridemia, baixo HDL-C e presença de LDL pequena e densa. Entretanto, como a elevação dos níveis séricos do LDL-C associada ao surgimento de aterosclerose prematura em indivíduos não diabéticos na maioria das vezes não é observada em pacientes com IG, questiona-se se outras alterações do metabolismo lipídico, tais como alterações da cinética do colesterol ou a transferência de lípides das lipoproteínas para a HDL, poderiam estar relacionadas ao maior risco cardiovascular nestes pacientes. Estudo prévio, utilizando uma nanoemulsão lipídica artificial de LDL, verificou uma remoção mais rápida do colesterol na forma livre em pacientes normolipidêmicos com doença arterial coronária (DAC) quando comparada com controles. No presente estudo, utilizou-se a nanoemulsão lipídica artificial para avaliar se esses dois processos envolvidos no metabolismo da LDL e da HDL estão alterados em pacientes com intolerância à glicose que os predispõem à DAC, relacionando estes resultados com fatores de risco cardiovasculares, tais como a resistência à insulina, a obesidade e a dislipidemia. Para tanto, foram estudados 14 pacientes com IG e 15 controles, sem manifestação clínica de DCV, que não utilizam antidiabéticos orais e hipolipemiantes, comparados com controles pareados para idade, sexo, raça, IMC, tabagismo, consumo de álcool, prática de atividade física e doenças associadas. Para o estudo cinético, a nanoemulsão marcada foi injetada endovenosamente e amostras de sangue coletadas ao longo de 24h para a determinação da radioatividade, das curvas de decaimento plasmático e da taxa fracional de remoção (TFR) dos lípides marcados a partir de um modelo de análise compartimental. Foi medida a taxa de esterificação do ³H-colesterol livre da nanoemulsão no plasma e avaliada a transferência *in vitro* de lípides da nanoemulsão para a fração HDL. A resistência à insulina foi estimada pelo modelo matemático de homeostase glicêmica (HOMA) e a adiposidade abdominal por tomografia computadorizada de abdômen. A concentração plasmática de colesterol total, LDL-C, HDL-C, triglicérides e de

apolipoproteínas não diferiu entre os grupos. O perfil antropométrico relacionado ao peso, IMC e circunferência abdominal foi semelhante entre os grupos. O grupo IG apresentou maior concentração de insulina de jejum ($p=0,01$), menor sensibilidade à insulina ($p<0,01$) e maior índice de resistência à insulina ($p<0,01$). A TFR ^{14}C -EC foi similar nos dois grupos, porém a TFR ^3H -CL foi mais rápida no grupo IG comparado com controle ($p=0,04$). A porcentagem de esterificação do ^3H -colesterol da nanoemulsão bem como a transferência de lípidos da nanoemulsão para a fração HDL foram semelhantes entre os grupos. A remoção mais rápida do ^3H -colesterol livre mostra que ocorreu uma dissociação das partículas de colesterol da nanoemulsão lipídica nos pacientes com intolerância à glicose. Essa dissociação do colesterol pode refletir alterações no metabolismo intravascular da lipoproteína LDL, as quais podem favorecer a aterogênese nesses pacientes.

Descritores: intolerância à glicose, cinética, lipoproteínas LDL, lipoproteínas HDL, resistência à insulina, aterosclerose.

ABSTRACT

BERTATO, MP. **Plasma kinetics of free and esterified cholesterol and *in vitro* lipid transfer to HDL, using an artificial lipidic nanoemulsion, in subjects with glucose intolerance.** São Paulo, 2010. Master's Dissertation. Medical School of the University of São Paulo.

Individuals with diabetes *mellitus* type 2 are 2 to 4 times more susceptible to cardiovascular disease (CVD) than non-diabetic individuals. This increased risk is also observed for glucose intolerance (GI) which appears in the initial stages of diabetes. The presence of the metabolic syndrome (MS), present in most DM2 and GI patients, is also an important factor contributing to the development of CVD in these individuals. Various MS component studies emphasize dyslipidemia as one of the main contributors for this risk factor. The dyslipidemia commonly associated to GI is characterized by hypertriglyceridemia, low HDL-C and the presence of a small and dense LDL. However, since associated LDL-C levels with the development of premature atherosclerosis in non diabetic individuals is for the most part not observed in GI patients, it is questioned whether other lipid metabolism alterations such as cholesterol kinetics or the lipid transfer to HDL could be related to a greater CVD risk in these individuals. A previous study using an artificial LDL nanoemulsion showed a faster removal rate of the free cholesterol in normolipidemic with coronary artery disease (CAD) patients when compared to control individuals. In this study an artificial lipid nanoemulsion was used to evaluate both these processes involved in the metabolism of LDL and HDL which are both altered in patients with GI that expose them to CAD, and relating the results to CVD factors such as insulin resistance, obesity and dyslipidemia. 14 GI and 15 control individuals participated in this study. All without manifestations of CVD, none using any oral antidiabetic medication or hypolipimeants, paired for age, sex, race, BMI, smoking, alcoholic consumption, physical activity and comorbidities. For the kinetic study, a labeled nanoemulsion was intervencously injected and blood samples collected at determined intervals over a 24 hour period to determine the radioactive plasma decay curves and fractional clearance rate (FCR) of the labeled nanoemulsion lipids through a compartmental analysis model. Plasma esterification rate of the ^3H -free cholesterol of the nanoemulsion was measured as was the *in vitro* transfer from the nanoemulsion to HDL fraction. Insulin resistance was obtained by the glycemic homeostasis mathematical model (HOMA) and abdominal adipose by a computerized tomography of the abdomen. No differences were observed for total cholesterol plasmatic concentrations, LDL-C, HDL-C, triglycerides or apolipoproteins between the two groups. The anthropometric profile related to weight, BMI and abdominal circumference was similar for both groups. The GI group presented higher fasting insulin concentration ($p=0.01$), less insulin sensitivity ($p=0.01$) and a greater insulin resistance ($p=0.01$). The TFR ^{14}C -CE was similar in both groups, although the TFR ^3H -CL was faster in the GI group compared to the control group ($p=0.04$). The esterification percentage of the nanoemulsion's

³H-cholesterol, as well as the lipid transfer from the nanoemulsion to HDL fraction were similar for both groups. The faster ³H-free cholesterol removal shows that a dissociation of the cholesterol particles of the lipidic nanoemulsion occurred in those patients with GI. This dissociation could possibly reflect alterations in the intravascular LDL lipoprotein metabolism which in turn, may favor atherogenesis in these patients.

Descriptors: glucose intolerance, kinetics, LDL lipoproteins, HDL lipoproteins, insulin resistance, atherosclerosis.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O surgimento do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) decorre de um conjunto de alterações metabólicas que se processam de maneira progressiva e heterogênea. É caracterizada pela diminuição da produção de insulina pela célula β pancreática associada à menor sensibilidade dos tecidos à insulina. Conseqüentemente, a manifestação da hiperglicemia crônica decorre da produção insuficiente de insulina pancreática para compensar o aumento da resistência à insulina (RI) associada a uma redução da captação de glicose para as células. Na tentativa de buscar a homeostase glicêmica, inicialmente ocorre uma maior produção de insulina (hiperinsulinemia compensatória) e, com a evolução da doença, pode ocorrer uma redução da secreção pancreática de insulina resultante da exaustão da capacidade secretória de insulina pela célula β (QATANANI e LAZAR, 2007).

O DM2 é uma doença progressiva sendo que nas fases iniciais da história natural do diabetes, surge primeiro a elevação da glicêmica no período pós-alimentar seguida de uma elevação gradual dos níveis de glicemia de jejum. Para fins diagnósticos do DM2, a progressão gradual das alterações glicêmicas é definida de acordo com os valores glicêmicos no jejum e 120 minutos após a ingestão oral de 75 g de glicose no teste de tolerância oral à glicose (TOTG). Atualmente, são considerados valores não diabéticos (ou normais) as glicemias menores que 100 mg/dL no jejum e < 140 mg/dL no período pós-alimentar (120 minutos). Glicemias de jejum entre 100 e 125 mg/dL são definidas como glicemia de jejum alterada e valores iguais ou superiores a 126 mg/dL caracterizam o diabetes. No teste de tolerância à glicose, valores de glicemia entre 140 e 199 mg/dL classificam o indivíduo como intolerante à glicose (IG) e concentrações iguais ou acima de 200 mg/dL como diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

A IG é a fase intermediária entre o estado normal e o diabetes clínico. Do ponto de vista fisiopatológico, a alteração predominante da IG se caracteriza pela deficiência da primeira fase de liberação da insulina pela célula beta e ainda uma deficiência severa na fase tardia de liberação de

insulina que ocorre no período pós alimentar. Nessa fase, por não apresentar sintomas, a maioria destes pacientes desconhece a presença de alteração glicêmica (SHAW et al., 1999; MACIEL et al., 2007; NATHAN et al., 2007; ABDUL-GHANI E DEFRONZO, 2009; FAERCH et al., 2009).

O recente e expressivo aumento da prevalência do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) mundialmente tem ocorrido tão rapidamente que essa doença passou a ser classificada como epidemia global. Atualmente, cerca de 200 milhões de pessoas no mundo vivem com diabetes e se estima que esse número deva se elevar para 366 milhões em 2030 (WILD et al., 2004).

A elevada prevalência do diabetes é observada não somente na sua forma clínica, mas também em fases mais precoces que precedem a doença, quando ocorre a intolerância à glicose. Estimativas atuais indicam que a maioria dos indivíduos (mais de 70%) com IG desenvolve diabetes clínico (SHAW et al., 1999; DE VEGT et al., 2001; TUOMILEHTO et al., 2001; VENDRAME e GOTTLIEB, 2004; FAERCH et al., 2009).

1.1 O diabetes *mellitus* e a doença cardiovascular

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte no DM2, sendo a doença arterial coronária (DAC) a principal delas. Estimativas mostram que os diabéticos apresentam um risco de 2 a 4 vezes maior de apresentar um evento cardiovascular quando comparado aos não-diabéticos (ROSAMOND et al., 1998; MORRISH et al., 2001; SCHMIDT et al., 2005). Assim como no diabetes clínico, o indivíduo com IG, apesar de caracterizar uma fase mais precoce da história natural da doença, também está igualmente susceptível a desenvolver um evento cardiovascular (COUTINHO et al., 1999; TOMINAGA et al., 1999; DECODE, 2001; BALKAU et al., 2002; MEIGS et al., 2002; STERN et al., 2002; LEVITAN et al., 2004; NATHAN et al., 2007).

Na década de 80, um dos estudos prospectivos pioneiros que demonstrou a estreita relação da IG com a DCV foi o estudo *The Whitehall Study*, realizado na Inglaterra com mais de 18.000 pacientes (40-64 anos)

acompanhados por 7,5 anos, o qual observou o dobro de mortalidade por DCV em intolerantes comparados àqueles com glicemia normal (FULLER et al., 1980). Outro estudo, o *The Paris Prospective Study* reportou, em 10 anos de seguimento, uma mortalidade cardiovascular 2 vezes maior em IG e DM2 em comparação aos indivíduos normais (ESCHWÉGE et al., 1995).

O estudo clássico do DECODE (2001) aponta uma forte evidência do risco cardiovascular relativo à hiperglicemia pós prandial. Realizado em 13 centros europeus, incluiu mais de 22.500 pacientes acompanhados por 8,5 anos em média, sendo que todas as causas de morte foram documentadas após estratificação da população de acordo com as glicemias de jejum e após TOTG. Resultados observaram índices de mortalidade de 20% no grupo de pacientes classificados com IG. Foram registradas, também, várias mortes de intolerantes à glicose com glicemia de jejum normal, sinalizando a importância do correto diagnóstico da IG, o que não deve ser substituído apenas pela medida da glicemia de jejum.

Outros estudos mostram que independente da glicose de jejum, a hiperglicemia pós-prandial representa alto risco para a DCV (BONORA e MUGGEO, 2001; DECODE, 2001; ISOMAA, et al., 2001; GERICH, 2003). Nesse sentido, evidências epidemiológicas mostram que o TOTG fornece a mais sensível medida que prevê as primeiras anormalidades do metabolismo da glicose, diferente de avaliar isoladamente a glicose de jejum ou a hemoglobina glicada (HbA1C). Além disso, esse teste é o melhor preditor de várias causas de mortalidade (QIAO et al., 2000; DECODE, 2001; SINGLETON et al., 2003).

Além da doença macrovascular, indivíduos com IG são afetados por lesões microvasculares. Estudos randomizados de longa duração destacaram o papel da hiperglicemia associado às complicações microvasculares (UKPDS 35, 2000; DCCT, 2001). FRANKLIN et al. (1990) documentaram associação entre IG e neuropatia ao avaliar prospectivamente pacientes americanos e constataram neuropatia em 11,2% dos 89 pacientes com IG. Neuropatia em IG é fenotipicamente similar

à neuropatia inicial do diabético, a qual também causa sintomas sensoriais, incluindo dor e disfunção autonômica (SINGLETON et al., 2003).

Portanto, indivíduos com IG apresentam maior risco de morte por todas as causas relacionada às DCV e uma incidência 2 a 5 vezes maior para a isquemia cardiovascular, o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral, em comparação com indivíduos normoglicêmicos (TOMINAGA et al., 1999; KULLER et al., 2000; DECODE, 2001).

1.2 Qual é a relação do diabetes *mellitus* e da intolerância à glicose com a doença cardiovascular?

Além do próprio efeito deletério da hiperglicemia, a relação do DM2 e da IG com a DCV está associada à resistência à insulina, condição que está inserida nas bases fisiológicas do surgimento do DM2 e da IG (STERN, 1995; GOLDSTEIN, 2003).

A resistência à insulina é definida como uma diminuição no efeito da insulina sobre a captação, o metabolismo e o armazenamento de glicose, em virtude da redução da sensibilidade dos tecidos periféricos à ação desse hormônio (QATANANI e LAZAR, 2007).

A resistência à insulina seria a alteração fisiopatológica determinante da síndrome metabólica (SM) (REAVEN, 1993). Vários estudos mostram que de 42 a 64% dos pacientes com IG apresentam a SM (ISOMAA et al., 2001; AVRAMOGLU et al. 2006; KAHN et al., 2006). Indivíduos que possuem a SM apresentam um risco 3 vezes maior de apresentar a DCV comparados com aqueles sem a SM (ISOMAA et al. 2001; GINSBERG et al., 2006). Na SM, merecem destaque dois de seus componentes: a obesidade e a dislipidemia (BONORA E MUGGEO 2001; ISOMAA et al., 2001).

A estreita relação entre a doença cardiovascular e o DM2 levou STERN (1995) a idealizar a hipótese do “elo comum”, segundo o qual o DM2 e a DCV possuem a mesma origem genética e ambiental. Visto que em torno de 90% dos diabéticos apresentam algum grau de RI, o elo

fisiopatológico comum (*solo comum*) entre DM2 e a DCV seria as alterações fisiopatológicas conseqüentes à RI (STERN, 1995; GINSBERG, 2000).

Mais recentemente, CERIELLO e MOTZ (2004), revendo essa hipótese, também sugeriram que o estresse oxidativo seria o mecanismo pelo qual a RI leva à falência das células β e à disfunção endotelial, fazendo com que o DM2 e a DCV estejam intimamente relacionados.

1.3 O papel da resistência à insulina e do tecido adiposo

Os adipócitos possuem a capacidade de sintetizar ácidos graxos (lipogênese), estocar triglicérides (TG) em períodos de oferta abundante de energia e mobilizá-los quando há déficit calórico (lipólise), constituindo, portanto, o grande reservatório energético de nosso organismo (AVRAMOGLU et al., 2006). Recentemente, inúmeras evidências demonstram que o tecido adiposo deixou de ser considerado apenas um reservatório energético e fornecedor de gordura ao metabolismo celular, passando também a ser reconhecido como um órgão dinâmico secretor de várias substâncias com ação local e sistêmica, que agem na regulação de diversos processos envolvidos na resistência à insulina, função endotelial, aterogênese, hipertensão, diabetes, etc (MAEDA et al., 1997; WAJCHENBERG, 2000; WYNE, 2003; KAHN et al., 2006).

Algumas dessas substâncias secretadas essencialmente pelo tecido adiposo, como a leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), a proteína-C reativa (PCR), entre outras, apresentam papel fundamental na sensibilidade tecidual à insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1993; HARMELEN et al., 1998; MOHAMED-ALI et al., 1998; RAJALA e SCHERER, 2003; GIORGINO et al., 2005; KAHN et al., 2006; GUTIERREZ et al., 2009).

Já de longa data, vários estudos epidemiológicos baseados em medidas antropométricas demonstram que não somente a quantidade, mas também o tipo de deposição de gordura se associa ao maior risco cardiovascular. Indivíduos com deposição gordurosa abdominal ou andróide

apresentam um maior risco cardiovascular e de apresentar SM quando comparados a indivíduos com distribuição na região do quadril (distribuição ginecóide). Estudos que utilizam novas tecnologias de imagem, especialmente a tomografia computadorizada (TC), demonstram que o maior risco cardiovascular associado ao aumento da gordura visceral se relaciona ao aumento da RI e citocinas inflamatórias (MORI et al., 2005; KAHN et al., 2006). Várias evidências associam também o aumento da gordura visceral a alterações do metabolismo das gorduras.

1.4 Metabolismo de lípidos

No processo de digestão, os lípidos provenientes da dieta sofrem ação da lipase pancreática e lipase gástrica, as quais, juntamente com sais biliares produzidos pelo fígado e secretados pela bile, hidrolisam os triacilgliceróis dando origem a moléculas menores de ácidos graxos, glicerol e colesterol. Todo esse conjunto de moléculas forma a micela, principal veículo transportador de gordura e altamente permeável à membrana. Uma vez transportados para dentro do enterócito para serem absorvidos, os produtos da digestão lipídica podem ser reesterificados gerando ésteres de colesterol e TG e incorporados aos quilomícrons para serem transportados para os vasos linfáticos (PATSCHE, 1998).

Como não conseguem circular livres no plasma por serem hidrofóbicos, os lípidos são transportados incorporados às lipoproteínas (FIGURA 1), estrutura composta por lipídeos e proteínas, sob a forma de um núcleo hidrofóbico de TG e éster de colesterol (EC) envolvido por uma capa hidrofílica de colesterol livre (CL), fosfolípide (FL) e proteína, chamada apolipoproteína (apo) (GARRET e GRISHAM, 1995; FERRURA et al., 1999).

Existem cinco classes principais de lipoproteínas com diferentes densidades, composição em lípidos, tipo de proteína presente e função. São os quilomícrons (QM), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (GANONG, 1989).

Figura 1. Estrutura de uma lipoproteína.

As apolipoproteínas são importantes moduladoras da função da lipoproteína, pois agem como ligantes aos receptores celulares e ativam ou inibem enzimas envolvidas no metabolismo das mesmas (CHAHIL e GINSBERG, 2006). A apo B-100 é produzida no fígado e está contida na VLDL, IDL e LDL. A apo B-48, produzida no intestino, pertence ao QM e seus remanescentes. A apo A-I é produzida no intestino e fígado e está contida na HDL (CHAHIL e GINSBERG, 2006).

Os lípides do organismo têm como origem a dieta e a síntese hepática (GANONG, 1989). Os lípides da dieta são transportados do intestino para o fígado por meio do QM, a maior lipoproteína de todas, o qual é enriquecido de TG e contém apos E, C e B-48. O transporte de lípides oriundos da alimentação inicia-se com os QMs formados no intestino que percorrem a circulação nos ductos linfáticos e sofrem ação, nos capilares, da enzima lipase lipoprotéica (LLP). Esta enzima está presente no tecido adiposo e músculo e é ativada pela apo C-II presente no QM. Uma vez ativada a enzima LLP, ocorre o processo de lipólise dos TG presentes nos QM, resultando em partículas de menor diâmetro denominadas quilomíncrons remanescentes (QMr) (GANONG, 1989; PATSCH, 1998). Uma parte dos TG hidrolisados é removida da circulação pela captação dos QMr via receptores localizados no fígado, onde são internalizados. A parte restante é degradada até ácidos graxos livres (AGL) e glicerol. Os AGL seguem para os adipócitos

no tecido adiposo e são armazenados na forma de TG (PATSCHE, 1998; FERRURA et al., 1999).

1.4.1 Metabolismo da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e da lipoproteína de baixa densidade (LDL)

O transporte de lípidos de origem hepática tem início com a síntese hepática de VLDL, lipoproteína que contém principalmente TG e apo B-100, E e C. Na circulação, a VLDL sofre ação da LLP e ocorre hidrólise dos triglicérides presentes, originando uma VLDL remanescente, com menor diâmetro, chamada IDL ou VLDLr (GANONG, 1989; GARRET e GRISHAM, 1995).

As partículas de IDL formadas a partir do catabolismo da VLDL, agora com menor conteúdo de triglicérides e maior de colesterol, podem seguir dois caminhos distintos. Cerca de 60 a 70% da IDL são retiradas rapidamente da circulação via receptor específico de apo E ou receptor de apo B-100 localizados no fígado. De 30 a 40% da IDL de menor tamanho podem ser captadas e removidas pelos hepatócitos ou continuar a perder TG e FL por ação da lipoproteína lipase hepática (LH), passando a ser chamada LDL. Durante este processo, ocorre perda das apolipoproteínas, com exceção da apo B-100 (HAVEEL, 1984; GANONG, 1989; GARRET e GRISHAM, 1995).

A LDL (FIGURA 2), produto final da degradação da VLDL, é uma partícula esférica com densidade entre 1019 a 1063 g/mL e tamanho de 20nm, constituída por um núcleo apolar de ésteres de colesterol (cerca de 46% do seu conteúdo) e um resíduo de TG (6%), estabilizado por uma monocamada externa de fosfolípidos e CL. Esta lipoproteína possui meia-vida plasmática de dois a três dias e a apo B-100 é a sua principal apolipoproteína que, além do seu papel estrutural, liga-se a receptores específicos (B/E) presentes em células hepáticas e extra-hepáticas para ser captada e removida da circulação (GANONG, 1989; STRYER, 1996; MAHLEY et al., 2003).

É conferido à LDL o papel de grande transportadora de colesterol no plasma humano, responsável por cerca de 70% de colesterol carreado para o fígado, células e tecidos periféricos. A fração de LDL que não é captada pelos hepatócitos é distribuída aos tecidos periféricos, função esta intimamente relacionada com o depósito de colesterol nos vasos e com o surgimento da aterosclerose. Uma parte de colesterol pode ser captada por outros tecidos que não envolvem a interação com receptor (MAHLEY et al., 2003; KOBA et al., 2006).

Figura 2. Estrutura da lipoproteína de baixa densidade (LDL).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que se inicia com a disfunção do endotélio vascular devido a diversos fatores de risco. O depósito de lipoproteínas LDL na parede arterial é o processo-chave inicial porque elas podem penetrar na parede da artéria e migrar para o espaço subendotelial. Uma vez retidas, as LDL podem sofrer um processo de oxidação excessiva atraindo o recrutamento de monócitos e linfócitos, que migram para o espaço subendotelial, diferenciam-se em macrófagos e captam as LDL oxidadas (ROSS, 1999). Os macrófagos repletos de lípidos são chamados células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Está ativado o processo de inflamação que estimula a

migração e proliferação de células musculares lisas da camada média para a íntima levando ao início da formação da placa aterosclerótica (LUSIS, 2000).

O entendimento atual da fisiopatologia da aterosclerose envolve vários fatores que interagem de forma complexa. Embora a aterosclerose só se torne clinicamente evidente a partir da meia-idade, é uma doença silenciosa que tem início na infância e evolui durante toda a vida no decorrer de várias décadas (STRONG, 1991; ROSS, 1999).

1.4.2 Metabolismo da lipoproteína de alta densidade (HDL)

O estudo populacional epidemiológico clássico de Framingham acompanhou prospectivamente o risco cardíaco de homens e mulheres e observou correlação positiva da presença da DCV com concentrações plasmáticas de LDL-C e negativa com HDL-C, demonstrando a importância da concentração plasmática dos lípides no surgimento e progressão da lesão aterosclerótica (CASTELLI, 1988).

Dessa forma, a HDL tem despertado grande interesse e tem sido alvo de diversos estudos em busca de avanços na terapêutica contra as DCV. Tais partículas desempenham importante papel anti-aterogênico, que inclui a capacidade de efluxo de colesterol, atribuído ao seu papel no transporte reverso do colesterol, atividade antioxidante, antiinflamatória e antitrombótica, evitando a progressão da placa aterosclerótica (ASSMANN e GOTTO, 2004).

Diferente de outras classes de lipoproteínas que são sintetizadas no intestino e fígado, a HDL (FIGURA 3) é formada no compartimento intravascular. A HDL é continuamente remodelada pela transferência de lípides, que é essencial no papel de esterificação do colesterol e no transporte reverso do colesterol, no qual o colesterol de tecidos periféricos é conduzido ao fígado e excretado na bile. Trata-se de uma fração heterogênea de partículas, com densidade entre 1,063 e 1,21 g/mL, de formato esférico e formada principalmente por proteínas (cerca de 50%), um núcleo apolar de EC (16%) e TG (5%), circundado por uma camada externa

de FL (25%) e uma pequena quantidade de CL (4%). Esta fração possui como componentes principais a apo A-I (constitui 70 a 80% da sua estrutura) e a apo A-II, com uma meia-vida plasmática de cinco a seis dias, a mais longa de todas as lipoproteínas (EISENBERG, 1984; GANONG, 1989).

Dependendo do conteúdo lipídico, tamanho e quantidade de proteínas presentes, a HDL é dividida em subclasses: HDL₁, HDL₂, HDL₃ e HDL₄, sendo que as de maior concentração no plasma são a HDL₂ (possui somente apo A-I) e a HDL₃ (possui apo A-I e A-II). Quando é liberada na circulação na sua forma inicial com formato discóide chamada HDL nascente (pré β -HDL), apresenta alto conteúdo de colesterol, FL e proteínas e está pronta para adquirir lípidos (EISENBERG, 1984; GANONG, 1989; WANG e BRIGGS, 2004).

Esta captação de lípidos inicial ocorre quando a HDL nascente capta colesterol e fosfolípidos dos tecidos hepáticos e extra-hepáticos, num processo facilitado pelo transportador de membrana ATP - *binding cassette transporter* A1 (ABCA1), que possui alta afinidade pela apo A-I, resultando na formação da HDL discóide, composta por apolipoproteína, fosfolípido e uma menor quantidade de colesterol na forma livre. A pré β -HDL continua a captar lípidos via ABCA1 e também adquire quantidades extras de colesterol de outras lipoproteínas que contêm apo B (VLDL, IDL e LDL) (ORAM, 2002; BARTER et al., 2003; WANG e BRIGGS, 2004).

Devido à característica atribuída ao colesterol livre de ser mais instável na lipoproteína, existe um mecanismo protetor e eficiente de manter esse colesterol preferencialmente dentro da célula ou da lipoproteína na sua forma mais estável ligada ao ácido graxo (sua forma esterificada). Por isso, a pré β -HDL é um excelente substrato para a ação no plasma da enzima *lecitina colesterol acil- transferase* (LCAT) que, secretada no fígado e ativada pela apo A-I (co-fator), tem como função principal converter o colesterol livre da superfície das partículas em éster de colesterol e internalizá-lo para o centro da partícula, processo chamado esterificação. A LCAT também facilita a captação e incorporação do CL das células periféricas para as partículas de HDL e é responsável pela maturação da HDL. Todo esse processo

resulta na formação de uma partícula menor, a HDL₃, de forma esférica e madura, com um núcleo hidrofóbico constituído por EC (GJONE, 1983; WANG e BRIGGS, 2004).

A esterificação na HDL é fundamental para manter a sua estabilização e seu transporte no plasma. A esterificação do colesterol livre também pode ser realizada pela enzima *acil-colesterol-acil transferase* (ACAT) no meio intracelular (GJONE, 1983; DANIELS et al., 2009).

A HDL₃ continua a receber colesterol e FL das membranas celulares, processo mediado pelo SR-B1 (*scavenger receptor class B type I*), expressos em alguns tecidos, como fígado e monócitos. Recebe ainda colesterol e FL, oriundos da lipólise do QM e VLDL, processo mediado pela LLP e facilitado pela proteína de transferência de fosfolípide PLTP (*plasma phospholipid transfer protein*). Semelhante à pré β -HDL, a HDL₃ também sofre ação da LCAT, que esterifica o colesterol presente transformando-a em uma partícula maior, a HDL₂ (GJONE, 1983).

A HDL₂ passa a doar ésteres de colesterol para as demais lipoproteínas que contêm apo B (QM, VLDL, IDL, LDL). Estas, por sua vez, transferem TG para a HDL₂, processo mediado pela proteína de transferência de éster de colesterol CETP (*cholesteryl ester transfer protein*), produzida no fígado. Portanto, o colesterol pode ser removido da circulação diretamente, por meio da interação da HDL com receptores SR-B1 localizados no fígado, ou indiretamente, por meio da transferência de éster e colesterol para lipoproteínas que contêm apo B, via CETP (TRIGATTI et al., 2003; WANG e BRIGGS, 2004).

Os triglicérides recebidos pela HDL₂ tornam-se substrato para a ação da lipase hepática (LH), que, ativada pela apo E, é responsável por degradar TG e FL e convertê-la novamente em HDL₃, retornando ao ciclo com a função de remover colesterol dos tecidos. A lipase endotelial (LE) também participa da lipólise e do remodelamento da HDL₂, hidrolisando principalmente fosfolípidos. Após a lipólise da HDL₂ pelas LH e LE, o colesterol dessa partícula é removido pelos receptores SR-B1, responsáveis pela captação seletiva do colesterol da HDL no fígado. Em um processo

contínuo, a ação dessas duas lipases sobre a HDL₂ dá início à formação de novas partículas menores de HDL, com formato discóide como a pré β -HDL e grandes aceptoras de colesterol dos tecidos, retomando todo o processo de lipidação descrito anteriormente (BRUCE et al., 1998).

A HDL é constantemente remodelada no compartimento intravascular por meio da transferência de lípides, essencial para o papel central dessa lipoproteína na esterificação do colesterol e no transporte reverso do colesterol. Esse processo é facilitado pelas proteínas de transferência e possibilita que o colesterol livre, o éster de colesterol, o fosfolípide e os triglicérides sejam transferidos de lipoproteínas que contém apo B para a fração HDL e vice-versa (BRUCE et al., 1998; MASSON et al., 2009).

Figura 3. Estrutura da lipoproteína de alta densidade (HDL).

1.5 A importância da dislipidemia no diabetes *mellitus* e na intolerância à glicose

Um dos principais fatores de risco para a SM é a dislipidemia. Sua importância é evidenciada por dados epidemiológicos de estudos prospectivos mostrando que é o principal fator de risco independente para DAC e provavelmente o maior mediador da aterogenicidade neste grupo de pacientes (ISOMAA et al., 2001; FORD et al., 2002; ALEXANDER et al., 2003; FORD, 2005; REAVEN, 2005).

O risco cardiovascular aumentado entre diabéticos e intolerantes à glicose pode ser atribuído principalmente à presença da complexa

dislipidemia, cujas anormalidades lipídicas e de lipoproteínas estão presentes antes mesmo do surgimento da hiperglicemia (KREISBERG, 1998; TASKINEN, 2002).

Nos indivíduos com intolerância à glicose, o perfil lipídico geralmente encontra-se alterado e é caracterizado por aumento na concentração de VLDL (hipertrigliceridemia) e de apo B, baixas concentrações de HDL-C e, apesar do LDL-C ser normal ou discretamente elevado, há presença de LDL pequena e densa (FONTBONNE et al., 1989; GINSBERG, 1991; PIETZSCH et al., 1999b; TASKINEN, 2002; JULIUS et al., 2007a).

A resistência à insulina tem um papel central na fisiopatologia da dislipidemia diabética. Ela provoca uma diminuição na síntese, mobilização e atividade da lipase lipoprotéica enquanto provoca um aumento na atividade da lipase hepática (GINSBERG, 1991; KREISBERG, 1998; HAFFNER, 2002; TASKINEN, 2002; BORGGREVE et al., 2003).

A possível diminuição da LLP no DM2 e IG pode ser devido ao aumento na produção da apo C-III, que atua inibindo a LLP levando ao acúmulo de lipoproteínas ricas em triglicérides no plasma. Estudos em humanos e com cultura de células sugerem que a expressão gênica desta proteína é regulada pela insulina. Na deficiência de insulina e na presença da RI, a produção de apo C-III pode estar elevada, levando à inibição da lipólise mediada pela LLP (CHAN et al., 2002; MERKEL et al., 2002; DE VRIES et al., 2003; ALTOMONTE et al., 2004; COHN et al., 2004). Já o aumento da atividade da LH leva a uma maior hidrólise de triglicérides e fosfolípidos de VLDL e QM remanescentes, dando origem a uma LDL enriquecida de triglicérides (BORGGREVE et al., 2003; DE VRIES et al., 2003; JUUTILAINEN et al., 2004).

Portanto, a hipertrigliceridemia é decorrente da presença da RI que estimula a lipólise no tecido adiposo, aumentando a oferta de AGL para o fígado, levando a uma maior secreção hepática de VLDL-apo B e de suas frações remanescentes, ambas enriquecidas de triglicérides. Além disso, ocorre uma diminuição no clearance da VLDL via lipase lipoprotéica provocada pela presença da RI. A hipertrigliceridemia é ocasionada também

pela diminuição da atividade da LLP que prejudica o processo de lipólise. Outro fator causador da hipertrigliceridemia é que o aumento da secreção de triglicérides da VLDL pode competir com o QM pela ação da LLP no processo lipolítico, resultando em aumento da síntese de VLDL (NORDESTGAARD e NIELSEN, 1994; BJORKEGREN et al., 1996; PIETZSCH et al., 1999b; ADELI et al., 2001; FESTA, 2001; MERKEL et al., 2002; DE VRIES et al., 2003; COHN et al., 2004).

Na presença da RI e na IG, freqüentemente pode ocorrer aumento da atividade da CETP (PIETZSCH et al., 1999a; JULIUS et al., 2007b). Após sofrer ação da LLP, a VLDL interage com a LDL e a HDL e realiza trocas de TG da VLDL com ésteres de colesterol da LDL e HDL via CETP, originando uma fração de LDL menor em tamanho, depletada de éster de colesterol e enriquecida de TG, processo este que explica a formação da LDL pequena e densa nesses pacientes. O aumento na produção de VLDL₁ também contribui com a formação da LDL pequena e densa. A VLDL₁ é uma subclasse de VLDL maior e mais rica em triglicérides a qual, associada com a diminuição da ação da LLP no processo lipolítico, gera a fração de LDL pequena e densa enriquecida de triglicérides via CETP (PIETZSCH et al., 1999a; TASKINEN, 2002; PIETZSCH e FUECKER, 2003; ADIELS et al., 2005; JULIUS et al., 2007a).

A menor concentração de HDL-C está relacionada à diminuição na subfração HDL₂ e é consequência de todos os fatores que levam à hipertrigliceridemia no paciente diabético e intolerante à glicose (TASKINEN, 2002). A menor concentração de HDL também é consequência de um maior catabolismo dessas partículas, demonstrado em estudos cinéticos *in vivo* com radioisótopos e *in vitro* utilizando isótopos estáveis (GOLAY et al., 1987; DUVILLARD et al., 2000). O acúmulo de VLDL no plasma leva ao aumento na transferência de éster de colesterol da HDL para VLDL e o enriquecimento da HDL com triglicérides, como resultado da ação da CETP. A consequência é a formação de uma HDL e LDL depletadas de colesterol e enriquecidas de triglicérides. A HDL com menor conteúdo de colesterol associada a um maior catabolismo desta partícula pode prejudicar o

transporte reverso do colesterol e conferir menor função anti-aterogênica a esta lipoproteína (HOWARD, 1997; PIETZSCH et al., 1998; PIETZSCH et al., 1999a; ADELI et al., 2001; MERKEL et al., 2002; DE VRIES et al., 2003; PIETZSCH e FUECKER, 2003; JULIUS et al., 2007a; TAN, 2009).

A formação da fração LDL menor e mais densa (fenótipo B) está diretamente relacionada ao processo aterogênico, porque essa fração se infiltra facilmente para o espaço subendotelial e migra para dentro do vaso. Além disso, as frações de LDL pequenas e densas são mais oxidáveis, o que confere menor afinidade pelos receptores B/E e, por isso, são mais freqüentemente captadas via receptores SRA (*scavengers receptors*), presentes em macrófagos e células endoteliais (PACKARD, 2003; KOBAYASHI et al., 2006).

Portanto, alterações nas atividades de transferência de lípidos e de lipases que podem ser observadas nos pacientes com DM2 e com IG trazem consequências para a composição e metabolismo tanto da HDL quanto da LDL, contribuindo para um perfil lipídico aterogênico nesses pacientes.

Entretanto, do ponto de vista clínico, uma parcela apreciável dos pacientes diabéticos que apresenta um evento cardiovascular agudo não apresenta uma dislipidemia muito evidente, especialmente nas avaliações laboratoriais rotineiras, demonstrando a complexidade desta relação. Sugere-se que possíveis alterações do metabolismo da transferência de lípidos para a HDL e da cinética das lipoproteínas possam ocorrer no paciente com diabetes e IG.

1.6 Estudos cinéticos de lipoproteínas

O metabolismo das lipoproteínas tem sido amplamente investigado com o uso de marcação endógena: lipoproteínas naturais (autólogas) são isoladas do plasma, marcadas e re-injetadas no indivíduo; ou via marcação exógena, utilizando-se lipoproteínas artificiais com estrutura plasmática semelhante às lipoproteínas naturais, as quais são marcadas e injetadas no indivíduo. É possível acompanhar a curva de decaimento das lipoproteínas

uma vez que as mesmas podem ser marcadas radioativamente ou com isótopos estáveis (KISSEBAH, 1987; MARANHÃO et al., 1993; GYLLING e MIETTINEN, 1997; MARANHÃO et al., 1997; CHAN et al., 2002; PONT et al., 2002; PARHOFER e BARRETT, 2006).

Estudos cinéticos são realizados para acompanhar o comportamento específico de uma determinada lipoproteína ou em combinação com várias outras em diferentes indivíduos. Através de um modelo de análise multicompartimental é possível gerar dados que traduzem o comportamento cinético de uma determinada lipoproteína (PARHOFER e BARRETT, 2006).

Por ser sabidamente associada com a aterosclerose, a utilização da emulsão rica em colesterol (nanoemulsão lipídica artificial) permite estudar a cinética das partículas ricas em lípidos, como a LDL, com o intuito de explorar o metabolismo e o comportamento cinético desta lipoproteína e compreender os processos e mecanismos envolvidos na fisiopatologia que levam ao surgimento da DAC em diversos pacientes. Para tanto, a aplicação da nanoemulsão mostrou-se ser tecnicamente segura, adequada e simples de ser utilizada em humanos.

Formulada em laboratório, a nanoemulsão possui composição lipídica semelhante à LDL, mas é preparada sem proteínas. Em contato com a circulação sanguínea, a nanoemulsão adquire apolipoproteínas, preferencialmente a apo E, permitindo ser reconhecida e removida do plasma por receptores B/E (receptor de LDL) (GINSBURG et al., 1982; MARANHÃO et al., 1993). O esquema do trajeto da nanoemulsão lipídica no compartimento plasmático está ilustrado na FIGURA 5.

Em 1987, iniciaram-se os estudos que visaram reproduzir o metabolismo da LDL com a utilização desta nanoemulsão lipídica na investigação das dislipidemias (MARANHÃO et al., 1993).

SANTOS et al. (2003) avaliaram a cinética do éster de colesterol e do colesterol livre da nanomeulsão em pacientes com DAC normolipidêmicos submetidos à angiografia das coronárias. Nesses pacientes, a forma livre do colesterol foi removida mais rapidamente em comparação com controles sem doença coronária. No entanto, a remoção plasmática do éster de

colesterol foi semelhante entre os grupos. Em estudo posterior, COUTO et al. (2007), utilizando a mesma nanoemulsão, evidenciaram um maior depósito de colesterol livre na aorta, artéria torácica interna e veia safena de pacientes com DAC submetidos à cirurgia de revascularização. Postula-se, a partir desses estudos, um novo mecanismo para a gênese da doença coronária no qual o colesterol livre, ao dissociar-se das partículas de LDL e se depositar na parede dos vasos, pode favorecer o surgimento e a progressão da placa aterosclerótica (SANTOS et al., 2003; COUTO et al., 2007).

Portanto, a proposta desta pesquisa é estudar a cinética plasmática do colesterol livre e do esterificado, presente na nanoemulsão lipídica artificial de LDL, em pacientes intolerantes à glicose assintomáticos para DAC. Busca-se verificar se tais indivíduos possuem alteração na cinética da nanoemulsão da mesma forma que pacientes sintomáticos para DAC e se essa alteração justifica o importante risco cardiovascular nessa população.

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O diabetes *mellitus* é uma doença freqüente e sua prevalência está aumentando. O diabético possui um risco de 2 a 4 vezes maior de desenvolver doença cardiovascular comparado ao não-diabético. Como demonstrado por diferentes estudos epidemiológicos (COUTINHO et al., 1999; TOMINAGA et al., 1999; DECODE, 2001), o risco para o desenvolvimento da doença cardiovascular já é observado em fases mais precoces e assintomáticas da história natural do diabetes, quando ocorre a hiperglicemia pós-prandial. Considerando que nesta fase o menor grau de deficiência secretória da insulina e de hiperglicemia não explicaria o elevado risco cardiovascular semelhante ao observado no diabetes manifesto, atribui-se ser a presença da SM, que ocorre na maioria dos pacientes com IG, um fator condicionante importante para o desenvolvimento das alterações endoteliais nestes indivíduos. Dos componentes da SM, inúmeros estudos destacam a dislipidemia como um dos principais fatores de risco para a DCV no paciente diabético e com IG (ISOMAA et al., 2001; AVRAMOGLU et al. 2006; KAHN et al., 2006). Considerando que o LDL-C elevado está associado ao desenvolvimento da aterosclerose prematura em pacientes não diabéticos, nem sempre pode ser observado em pacientes IG, geralmente se mostrando normal ou discretamente aumentado, questiona-se se outras alterações do metabolismo lipídico como o aumento das concentrações de LDL pequena e densa ou mesmo alterações da cinética das lipoproteínas poderiam estar relacionadas como fatores contribuintes para o maior risco no desenvolvimento da aterosclerose nestes pacientes.

Baseado nos relatos de que alterações da cinética utilizando uma nanoemulsão lipídica artificial duplamente marcada com ^{14}C -éster de colesterol e ^3H -colesterol livre apresentaram uma maior remoção do colesterol na forma livre em pacientes com DAC comparado com controles (SANTOS et al., 2003), bem como maior depósito deste colesterol nas paredes dos vasos sanguíneos (COUTO et al., 2007), propomos estudar se essa dissociação do colesterol, um novo mecanismo para a gênese e

progressão da doença arterial coronária, poderia ser observada também em pacientes sem a doença arterial coronária com intolerância à glicose.

O colesterol livre e sua forma esterificada, assim como os fosfolípidos e os triglicérides, são continuamente transferidos de outras classes de lipoproteínas para a HDL, cujo processo é mediado pelas proteínas de transferência. A transferência de lípidos é um processo importante na formação e no metabolismo intravascular da HDL porque envolve sua interação com outras classes de lipoproteínas no plasma. A nanoemulsão utilizada para avaliar o metabolismo das duas formas de colesterol na LDL também é utilizada como doadora de lípidos para testar a transferência simultânea de quatro lípidos radioativamente marcados para a fração HDL (LO PRETE et al., 2009). Utilizando uma nanoemulsão lipídica artificial, nossa proposta é verificar se o metabolismo intravascular das duas formas de colesterol presentes na LDL e a transferência de lípidos para a HDL estão alterados em pacientes com intolerância à glicose que os predispõem precocemente à doença arterial coronária.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Estudar a cinética plasmática do colesterol livre e do colesterol esterificado e a transferência *in vitro* de lípidos para a HDL, utilizando uma nanoemulsão lipídica artificial, em indivíduos com intolerância à glicose.

Relacionar as possíveis alterações da cinética da nanoemulsão e da transferência de lípidos, neste grupo de pacientes, com a presença da resistência à insulina, a distribuição da adiposidade abdominal e a presença de outros componentes clínicos da síndrome metabólica.

4. CASUÍSTICA

4.1 Local do estudo

O estudo foi realizado na Unidade de Diabetes da disciplina de Endocrinologia e Metabologia, no Ambulatório de Endocrinologia e Obesidade e no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Hospital das Clínicas do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.2 Recrutamento dos pacientes

Foram recrutados pacientes do Ambulatório de Endocrinologia e Obesidade do Hospital das Clínicas, pacientes e funcionários do Instituto do Coração e pacientes atendidos em Ambulatórios, Consultórios e Clínicas externas ao HC e InCor.

A informação prévia detalhada de todo o protocolo foi dada aos participantes antes do início de cada etapa do estudo. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO F) para realização do estudo, de acordo com as normas que regem estudos experimentais com seres humanos, disponibilizadas pelas comissões de ensino, pesquisa e ética médica da Instituição. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O estudo teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Foram selecionados 29 indivíduos voluntários, divididos em 2 grupos:

Grupo intolerante à glicose (IG): 14 pacientes com diagnóstico de intolerância à glicose baseado no TOTG, de acordo com o critério proposto pela Associação Americana de Diabetes (2008), que classifica a presença de valores de glicemia de 2h após sobrecarga oral de 75 g de glicose entre 140-199 mg/dL.

Grupo controle: 15 indivíduos com glicemia normal, baseado no TOTG, de acordo com o critério proposto pela Associação Americana de Diabetes (2008), com valores de glicemia de 2h após sobrecarga oral de 75 g de glicose <140mg/dL e glicemia de jejum <100mg/dL.

4.3 Critérios de inclusão

Foram considerados os seguintes critérios para inclusão dos pacientes no estudo:

- Sexo: ambos
- Idade: 40 a 70 anos
- Colesterol total: < 240 mg/dL
- LDL-Colesterol: < 160 mg/dL
- Triglicérides: < 200 mg/dL
- Pressão Arterial: ser normotenso ou apresentar hipertensão arterial controlada com valores de PA até 130/85 mmHg, medida em três dias diferentes.

4.4 Critérios de exclusão

Foram considerados os seguintes critérios para exclusão dos pacientes no estudo:

- Presença de doença crônica: insuficiência renal crônica (creatinina >1,5mg/dL), insuficiência hepática, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença inflamatória, oncológica, tireoideopatia descompensada e mulheres na menacme.
- Presença de doença cardiovascular: macrovascular (DAC), insuficiência arterial periférica crônica e AVC encefálico.
- Pacientes em uso de medicamentos hipolipemiantes (estatinas e fibratos), glicocorticóides e metformina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Avaliação clínica e antropométrica

Todos os pacientes foram avaliados por médicos endocrinologistas do Ambulatório de Diabetes do InCor, baseado nos seguintes critérios: a) Anamnese clínica: para detectar queixas relativas à doença coronária (angina, dispnéia, palpitação); b) Exame físico: foram avaliados parâmetros clínicos de frequência cardíaca e pressão arterial.

Com o objetivo de selecionar pacientes sem manifestação clínica de doença cardiovascular, os mesmos realizaram o eletrocardiograma de esforço, exame que avalia o comportamento do sistema cardiovascular frente ao estresse físico, sob monitorização clínica, eletrocardiográfica e hemodinâmica do paciente. Para tanto, foi utilizado o protocolo de Bruce padronizado no Setor de Eletrocardiograma do Esforço do InCor e o ergômetro foi a esteira rolante MAT 2100 acoplada ao sistema ML 800 *Stress Test System* da Fukuda Denshi Co. Ltda.

Foi adotado o sistema de registro eletrocardiográfico de 15 derivações simultâneas, sendo 12 derivações clássicas do sistema Mason – Likar e 3 derivações do sistema ortogonal de Frank (X,Y, Z).

A monitorização eletrocardiográfica foi realizada sistematicamente no repouso (em pé), no momento inicial das alterações do segmento ST, no momento da maior alteração desse segmento, no pico do esforço, no primeiro minuto da recuperação, no momento da normalização do desvio do segmento ST e no sexto minuto após o exercício. A aferição da pressão arterial ocorreu sistematicamente a cada 90 segundos, no pico do esforço, no momento de maior alteração do segmento ST e a cada minuto da fase pós-exercício.

A frequência cardíaca foi monitorizada continuamente e documentada a cada 15 segundos. A frequência cardíaca máxima desejada foi calculada pela fórmula $(220 - \text{idade})$ em anos. Os critérios de interrupção do exame e os de positividade adotados foram os recomendados pela II Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2002). A monitorização da fase de

recuperação teve duração de 6 minutos ou foi interrompida após a reversão total das alterações eletrocardiográficas e/ou hemodinâmicas. Em seguida, foram analisados a capacidade funcional, os dados hemodinâmicos, eletrocardiográficos e clínicos de todos os pacientes para, então, classificar o teste como negativo ou positivo.

Os pacientes foram submetidos à avaliação antropométrica, que consistiu em medidas de peso e altura, para cálculo do índice de massa corpórea (IMC), e de medidas de circunferência abdominal (C.A.) e do quadril (C.Q.) para obtenção da relação cintura/quadril (RCQ).

A RCQ e o IMC são considerados indicadores de risco metabólico em relação à obesidade central e generalizada, respectivamente. Tais indicadores foram interpretados de acordo com a Organização Mundial da Saúde (1997), que atribui risco aumentado à RCQ quando $> 0,9$ para homens e $> 0,85$ para mulheres.

Como representação da adiposidade central, a C.A. foi interpretada de acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2005), que atribui valores segundo parâmetros étnicos específicos para a América do Sul e Central, definidos como circunferência abdominal ≥ 90 para homens e ≥ 80 para mulheres.

5.2 Exames laboratoriais

Todos os pacientes apresentaram exames prévios normais para inclusão no estudo. Esses exames incluem avaliação da função da tireóide (TSH), função renal (uréia e creatinina), função hepática (TGO e TGP), hemograma completo e plaquetas (dados não mostrados).

Após jejum de 12 horas, os pacientes foram submetidos aos exames laboratoriais para dosagem de colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglicérides, glicemia e insulina de jejum e hemoglobina glicada.

As concentrações plasmáticas de triglicérides, colesterol total, HDL-C e glicemia foram dosadas por método enzimático colorimétrico automatizado e a medida de LDL-C por método cinético automatizado. O VLDL-C foi

calculado por meio da divisão das concentrações plasmáticas de triglicérides por 5 ($VLDL-C = \text{triglicérides}/5$). O colesterol não-HDL foi calculado por meio da subtração do colesterol total pelo colesterol contido na fração HDL ($\text{colesterol não-HDL} = CT - HDL-C$).

As concentrações plasmáticas de apo A-I e apo B foram mensuradas por método imunoturbidimétrico (Roche/ Hitachi – Roche *Diagnostics* – Mannheim) e a de apo E pelo método nefelometria, utilizando-se analisadores automáticos nas três análises.

A medida de hemoglobina glicada foi obtida utilizando-se o sangue total pelo método HLPC, certificado pelo *National Glyco Hemoglobin Standardization Program* (NGSP-EUA), considerando como valores normais entre 4,1 a 6,0%.

A insulina e o TSH foram determinados no soro pelo sistema de imunoensaio automatizado autodelfia (Perkin-Elmer *Life Science*, Wallac, Oy, Finland, para insulina e *Life Science*, Wallac, Oy, Finland, para TSH).

Todos os exames foram realizados no Laboratório Central e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42 do HCFMUSP.

5.3 Resistência à insulina

Foi utilizado o Modelo da Avaliação da Homeostase (*Homeostasis Model Assessment* - HOMA) baseado no cálculo matemático de homeostase glicêmica que prediz a capacidade de secreção de célula β ($HOMA2- \% \beta$), a sensibilidade à insulina ($HOMA2- \% S$) e o índice de resistência à insulina ($HOMA2-IR$), a partir de concentrações plasmáticas de glicemia e insulina de jejum.

Esse modelo está implementado no programa de computador *HOMA Calculator* versão 2.2.2, desenvolvido pela The Oxford Center for Diabetes, Endocrinology e Metabolism (Diabetes Trial Unit. *HOMA Calculator*. Disponível em <http://www.dtu.ox.ac.uk>).

Amostras de sangue dos pacientes foram coletadas após jejum de 12 horas para obter as dosagens de glicemia (em mg/dL) e insulina de jejum

(em $\mu\text{U/mL}$) e, posteriormente, convertidas em mmol/L (glicemia) e pmol/L (insulina). A partir desses valores, foram estimados os valores de HOMA2- β , HOMA2-%S e HOMA2-IR.

5.4 Distribuição da adiposidade abdominal

A distribuição da gordura abdominal foi realizada pela tomografia computadorizada de abdômen sem contraste oral ou venoso e sem a necessidade de qualquer preparo prévio do paciente, conforme técnica descrita por WAJCHENBERG et al. (1995). Trata-se de um procedimento de imagem de alta tecnologia que permite a quantificação da gordura na região abdominal. Tal exame foi realizado por técnico habilitado, no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da FMUSP, com o equipamento CT *High Speed* GE.

A aquisição de imagens é por “scout” (radiologia digital) do paciente em perfil. Uma única imagem tomográfica com 10 mm de espessura é obtida no plano médio do espaço discal de L4-L5, orientada pelo “scout” obtido anteriormente.

Na imagem tomográfica foram calculadas:

- *Área de gordura visceral*: foram identificados os limites da cavidade da musculatura abdominal em uma circunferência completa e por meio do *software* do próprio equipamento foi realizada a determinação da área ocupada apenas por gordura, obtendo-se a área ocupada pelo tecido adiposo visceral.
- *Área de gordura subcutânea*: foram identificados os limites do tecido subcutâneo e por meio do *software* do próprio equipamento foi realizada a determinação da área ocupada apenas por gordura.
- *Determinação dos limites do componente gorduroso abdominal*: a área do tecido adiposo abdominal total foi marcada com um cursor eletrônico adotando o limite superior de -50 unidades Hounsfield e o limite inferior -250 unidades Hounsfield como os valores de atenuação da densidade do tecido

adiposo, possibilitando determinar a presença de gordura nas áreas delimitadas (visceral e subcutânea).

- *Cálculo da relação gordura visceral / gordura subcutânea*: o índice foi calculado como a razão entre as áreas de gordura visceral e de gordura subcutânea, obtidas conforme descrito acima.

5.5 Cinética plasmática do ^3H -colesterol livre e do ^{14}C -éster de colesterol

5.5.1 Preparo da nanoemulsão

A nanoemulsão lipídica artificial foi preparada segundo a técnica descrita por GINSBURG et al. (1982) e modificada por Maranhão et al. (1993). Em um frasco, foram pipetados lípides obtidos da indústria farmacêutica (Sigma Chemical Co – St. Louis, EUA), sendo 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol, diluídos em clorofórmio:metanol (2:1) (Merck – Darmstadt, Alemanha).

Posteriormente, foram adicionados à mistura de lípides, 70kBq do isótopo ^{14}C -oleato de colesterol e 121kBq do isótopo ^3H -colesterol (*Amersham International* – Reino Unido). Em seguida, a mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio em banho-maria a 37°C e mantida em dessecador a vácuo por 16 horas a 4°C para remoção dos solventes residuais. A mistura de lípides foi ressuspensa com tampão TRIS-Cl e emulsificada por irradiação ultrasônica de 125 watts de potência durante 3 horas sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando de 51 a 55°C. Depois, a emulsão foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação e esterilizada por passagem em filtro Millipore 0,22µm de diâmetro. Todo o material utilizado foi despirogenizado em estufa a 180°C durante 90 minutos e esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos.

O procedimento de preparo das nanoemulsões foi realizado em capela de fluxo laminar, armazenadas a 4°C por até trinta dias. Todas as

nanoemulsões foram testadas quanto a sua esterilidade e pirogenicidade, antes da utilização nos pacientes.

5.5.2 Estudo cinético

Após coleta de sangue para determinações bioquímicas em jejum, os pacientes foram submetidos à injeção endovenosa, em bolus, de aproximadamente 150µL da nanoemulsão marcada com ^3H -colesterol e ^{14}C -oleato de colesterol correspondente a 4 milhões de cpm de radioativo.

Logo depois, foram coletadas amostras de sangue (10mL) em tubo de ensaio contendo 250 U.I. de heparina sódica (Roche, Brasil) durante 24 horas em intervalos de tempo pré-determinados: 5 minutos, 1 hora, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após a injeção da nanoemulsão lipídica.

Os pacientes receberam café da manhã padronizado após a coleta de 5 minutos e almoço após a coleta de 4 horas.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos em centrífuga Sorvall (modelo RT7, Wilmington, EUA) para obtenção do plasma. Alíquotas de 1,0 mL de plasma foram pipetadas em frascos de cintilação e acrescentadas 5,0mL de solução de cintilação Ultima Gold TM XR (Packard – Groningen, Holanda), para a determinação da radioatividade presente nas amostras, utilizando-se um contador Beta (*Liquid Scintillation Analyzer*, Packard, 1600 TK, Palo Alto, CA).

5.5.3 Análise compartimental dos dados cinéticos

A radioatividade presente nas amostras de plasma dos pacientes foi utilizada para a determinação das curvas de decaimento plasmático e cálculo dos parâmetros cinéticos dos componentes lipídicos radioativos da emulsão, por meio do programa de análise compartimental ANACOMP® versão 4.1 (MESQUITA, 1994).

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

decaimento mais lento. Esse perfil levou à adoção de um modelo com quatro compartimentos, dois para o ^{14}C -éster de colesterol e dois para ^3H -colesterol livre, a partir do qual foram calculados os parâmetros cinéticos (k) para cada marcação da nanoemulsão lipídica.

Os compartimentos e os parâmetros cinéticos desse modelo (FIGURA 4) são definidos do seguinte modo:

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

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

Figura 4. Modelo compartimental utilizado para analisar a cinética plasmática do ^3H -colesterol livre e do ^{14}C -éster de colesterol da nanoemulsão.

Figura 5. Modelo esquemático do comportamento cinético da nanoemulsão lipídica: (A) Estrutura da nanoemulsão lipídica (ii) em comparação à lipoproteína LDL natural (i); (B) Nanoemulsão adquire apolipoproteínas, preferencialmente apo E, na circulação sangüínea; (C) Nanoemulsão é reconhecida pelas receptores B/E e removida da circulação.

5.6 Esterificação do ^3H -colesterol livre presente na nanoemulsão lipídica artificial

Alíquotas de 1000 μL de plasma dos pacientes foram utilizadas para a extração dos lípides pelo método de Folch (FOLCH et al., 1957). As amostras foram extraídas com clorofórmio/metabol/água destilada (2:1:1, v/v/v) em 12 horas a 4°C. O sobrenadante protéico foi aspirado e o infranadante foi seco sob fluxo de nitrogênio, ressuspendido 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 (70:3:1, 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. Em seguida, as bandas foram transferidas para “vials” de contagem contendo 5mL de solução cintiladora (PPO dimetil POPOP-Triton X-100-tolueno, 5g: 0,5g: 333mL, v/v/v/v). A radioatividade foi contada usando o espectrofotômetro Packard 1660 TR (Meridien, CT).

A porcentagem (%) de esterificação foi calculada dividindo-se o ^3H -colesterol livre na banda de éster de colesterol (esterificado) pelo total de colesterol livre, que foi considerado a somatória da radioatividade ^3H na banda do colesterol livre e do éster de colesterol, para cada tempo do experimento (5 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas).

Em seguida, foi traçada a curva média da taxa de esterificação (em %) do ^3H -colesterol livre ao longo de 24h em cada tempo do experimento.

$$\% \text{ de esterificação} = \frac{{}^3\text{H-CE}}{{}^3\text{H-CL} + {}^3\text{H-CE}} \times 100$$

5.7 Transferência *in vitro* de éster de colesterol (EC), fosfolípide (PL), triglicérides (TG) e colesterol livre (CL) da nanoemulsão para a HDL

A transferência de lípides constitui um ensaio *in vitro* e foi realizado no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor. Este procedimento está esquematizado na FIGURA 6.

Amostras de sangue dos pacientes foram coletadas, após jejum de 12 horas, em tubo contendo anticoagulante EDTA (1,5g/L). O plasma foi obtido após 10 minutos de centrifugação a 3000 rpm, em centrífuga Soval RT7. Em seguida, 50µl de duas nanoemulsões lipídicas marcadas radioativamente com ^3H -éster de colesterol e ^{14}C -fosfolípide e a outra com ^3H -colesterol livre e ^{14}C -triglicérides foram incubadas com 200µl de plasma de cada paciente por 1 hora a 37°C em agitador orbital Gyromax 706R, sob agitação a 40 rpm. Decorrido o tempo, foram adicionados à mistura 250µL de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2% / MgCl_2 3M, v/v). A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm.

A fração HDL foi obtida após precipitação da nanoemulsão juntamente com as lipoproteínas contendo apo B. Alíquotas de 250µL do sobrenadante contendo a fração HDL foram pipetadas em frascos de cintilação e acrescentadas 5,0mL de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA). A radioatividade presente nas amostras foi quantificada em contador Beta (Liquid Scintillation Analyzer, Packard, 1600 TK, Palo Alto, CA) com a utilização do programa Plus Vers 5.01 da Diamond Computers para determinação das contagens de ^3H e ^{14}C nas amostras. O branco, realizado para eliminação de possíveis interferentes neste ensaio, consiste na mistura de 200µL de solução tampão TRIS-HCl (pH 7,4) e 50µL da nanoemulsão incubada e precipitada nas mesmas condições descritas anteriormente.

O valor da radioatividade total presente na amostra foi determinada pela incubação de 200µL de plasma com 50µL de nanoemulsão, seguida de incubação, porém sem adição de reagente de precipitação. A quantificação

dos lípides (EC, PL, TG e CL) transferidos da nanoemulsão lipídica artificial para a HDL plasmática foi expressa em percentagem (%) de ^3H -EC, ^{14}C -PL, ^{14}C -TG e ^3H -CL em relação à radioatividade total incubada (LO PRETE et al., 2009).

Figura 6. Modelo esquemático da transferência *in vitro* dos quatro lípides marcados da nanoemulsão lipídica para a lipoproteína HDL: (A) Incubação do plasma com a nanoemulsão lipídica radioativamente marcada; (B) Precipitação da fração HDL; (C) Obtenção da taxa (em %) dos lípides transferidos da nanoemulsão lipídica para a HDL.

5.8 Segurança radiológica

A dose radiológica injetada foi avaliada de acordo com as normas internacionais de proteção radiológica (SOWBY, 1984). 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 é: $(44,4 \times 10^4 \text{ Bq} / 3 \times 10^9 \text{ Bq}) \times 50 \text{ mSv} = 0,0075 \text{ mSv}$.

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 Dosimetry* (SMITH, 1977). Os dados descritos para ratos pesando 0,4 kg foram ajustados para seres humanos, estimando um peso médio de 70 kg e utilizando um fator de correção com a equação seguinte: $K_{\text{Homem}} = k_{\text{Rato}} \times (70 \text{ kg} / 0,4 \text{ kg})^{1-x}$

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 uma concentração plasmática total de 204 mg/dL e uma excreção diária de colesterol de 1250 mg/dia (BOXENBAUM e RONFELD, 1983). Esse valor está dentro da média descrita em avaliações laboratoriais desses parâmetros em seres humanos (MARANHÃO e QUINTÃO, 1983).

O método descrito permite estimar que os participantes deste estudo receberam, 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), esses valores são muito inferiores ao máximo permitido, que é 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 crânio (ALTMAN e DITTMER, 1974).

5.9 Análise estatística

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas, esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos e do cálculo de médias, desvios-padrão e mediana. Para as variáveis qualitativas, calcularam-se freqüências absolutas e relativas. Para a comparação de médias de dois grupos foi utilizado o teste t de Student. Quando a suposição de normalidade foi rejeitada, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Para se testar a homogeneidade entre as proporções, utilizou-se o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (quando ocorreram freqüências esperadas menores que 5). Para o estudo da correlação entre duas variáveis, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Para o estudo da influência de dois fatores nas variáveis da adiposidade abdominal, foi utilizada a Análise de Variância a dois fatores (ROSNER, 1986).

Tentou-se realizar análise multivariada dos dados, porém o pequeno número amostral limitou a utilização desta análise, impossibilitando encontrar qualquer associação entre as variáveis estudadas.

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

6. DESENHO DO ESTUDO

6. DESENHO DO ESTUDO

O presente estudo foi transversal (FIGURA 7). Inicialmente, os pacientes passaram por consulta médica por endocrinologistas para realização da anamnese clínica e exame físico para excluir àqueles com presença de doença crônica e/ou uso de medicamentos não permitidos para este estudo.

Numa segunda etapa, os pacientes realizaram o teste oral de tolerância à glicose para classificá-los no grupo IG ou controle. Depois, realizaram o eletrocardiograma de esforço a fim de excluir àqueles sintomáticos para DCV, que apresentassem teste alterado (positivo).

Foram selecionados, inicialmente, 41 indivíduos distribuídos em 2 grupos, sendo 21 pacientes do grupo IG (com diagnóstico de intolerância à glicose) e 20 indivíduos do grupo controle (pareados ao grupo IG com valor de glicemia normal). O estudo foi finalizado com uma amostra de 29 pacientes, sendo 14 pacientes IG e 15 indivíduos controles.

No decorrer do estudo e por motivos diversos, foram excluídos 7 pacientes do grupo IG e 5 indivíduos do grupo controle.

No grupo IG, 2 pacientes apresentaram hipertrigliceridemia e/ou hipercolesterolemia que não atendiam aos critérios de inclusão; 1 paciente relatou estar em uso de medicamento hipolipemiante durante uma das etapas do estudo, sub-relatado durante a anamnese clínica; 1 paciente apresentou diagnóstico de DM2 ao realizar o TOTG; 1 paciente manifestou náusea e vômito no dia da cinética do colesterol; 1 paciente apresentou resultado alterado da cinética e 1 paciente foi afastado do estudo por motivos de saúde.

No grupo controle, 1 paciente apresentou hipertrigliceridemia e/ou hipercolesterolemia que não atendiam aos critérios de inclusão; 1 paciente não realizou a cinética; 1 paciente apresentou exame de TSH alterado; 1 paciente apresentou alteração no teste ergométrico e 1 paciente foi afastado do estudo porque precisou realizar duas cirurgias. Além disso, 1 paciente desse grupo não realizou a tomografia computadorizada de abdômen,

porém, como ele participou de todas as etapas anteriores, não precisou ser excluído do estudo.

Os pacientes que se enquadraram nos critérios de inclusão e exclusão de cada grupo realizaram a cinética do colesterol. No mesmo dia da cinética, foi realizada a avaliação antropométrica e foram colhidas amostras de sangue em jejum para dosagem dos exames laboratoriais e avaliação da resistência à insulina. Foi realizado experimento para avaliar a esterificação do colesterol livre e a transferência *in vitro* de lípidos para a HDL. Por último, os pacientes realizaram a tomografia de abdômen para medir a distribuição da gordura abdominal.

Figura 7. Desenho do estudo.

7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1 Avaliação clínica e antropométrica

Ao comparar as características clínicas dos grupos intolerância à glicose (IG) e controle, observa-se que a distribuição em relação à idade, sexo e raça é semelhante. Os grupos não diferem quanto aos parâmetros antropométricos (peso, IMC, circunferências abdominal e do quadril), presença de tabagismo, história familiar para DM2 e DAC, hipertensão e hipotireoidismo (TABELA 1). Dados clínicos individuais de cada grupo encontram-se no ANEXO A.

Tabela 1. Características clínicas dos grupos IG e controle.

Parâmetros	IG (n=14)	Controle (n=15)	p
Idade (anos)	56,6 ± 6,4	52,9 ± 6,4	0,13
Sexo F/M	9/5	8/7	0,71
Raça Branca/Negra	13/1	12/3	0,59
Peso (kg)	78,4 ± 12,9	76,5 ± 8,7	0,63
IMC (kg/m ²)	29,8 ± 4,4	27,6 ± 2,6	0,13
Circunferência (cm)			
Abdominal	99,7 ± 10,8	94,7 ± 12,7	0,26
Quadril	108 ± 9,4	105,7 ± 5,7	0,44
Relação cintura/quadril	0,92 ± 0,05	0,89 ± 0,1	0,36
Tabagismo	1	1	1,00
HF para DAC	7	5	0,46
HF para DM2	8	4	0,13
Hipertensão	8	5	0,27
Hipotireoidismo	2	4	0,65

Dados expressos em média ± desvio padrão e em valores absolutos. Teste qui-quadrado, teste exato de Fisher e teste t de Student. HF = história familiar.

Apesar de apresentar valores médios mais elevados que os do grupo controle, os valores da circunferência abdominal no grupo IG não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa. Entretanto,

observa-se que, individualmente, todos os homens e mulheres do grupo IG apresentam C.A. ≥ 90 cm e ≥ 80 cm, respectivamente, como indicador de obesidade central e risco metabólico, segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2005) (FIGURA 8A), enquanto que no grupo controle a totalidade das mulheres apresentou C.A. ≥ 80 cm e 4 dos 7 homens apresentaram C.A. ≥ 90 cm (FIGURA 9A).

Quanto à RCQ, todos os homens apresentaram índices $\geq 0,9$ e a maioria das mulheres no grupo IG apresentou RCQ $\geq 0,85$, como indicadores de risco metabólico, segundo a Organização Mundial da Saúde (1997) (FIGURA 8B). No grupo controle, a RCQ foi $\geq 0,9$ em 3 homens e $\geq 0,85$ em 5 mulheres (FIGURA 9B).

Em relação ao IMC, dos 14 pacientes no grupo IG, 7 (50%) são obesos (IMC ≥ 30 kg/m²), 6 (42,9%) apresentam sobrepeso (IMC entre 25-29,9 kg/m²) e 1 (7,1%) é eutrófico (IMC 18,5-24,9 kg/m²) (FIGURA 8C). No grupo controle, dos 15 pacientes deste grupo, 4 (26,7%) são obesos, 9 (60%) apresentam sobrepeso e 2 (1,3%) são eutróficos (FIGURA 9C).

Figura 8. Distribuição da circunferência abdominal (A), relação cintura/quadril (B) e índice de massa corpórea (C), segundo o limite de risco proposto pela Federação Internacional de Diabetes, no grupo IG (n=14).

Figura 9. Distribuição da circunferência abdominal (A), relação cintura/quadril (B) e índice de massa corpórea (C), segundo o limite de risco no grupo controle (n=15).

A Tabela 2 mostra a lista de medicamentos em uso pelos pacientes dos grupos IG e controle para o tratamento das comorbidades associadas, especialmente hipertensão e hipotireoidismo. Não foram observadas diferenças no uso dessas medicações entre os grupos. Dados antropométricos individuais de cada grupo encontram-se no ANEXO B.

Tabela 2. Medicamentos utilizados pelos pacientes dos grupos IG e controle para tratamento das comorbidades hipertensão e hipotireoidismo.

Parâmetros	IG (n=14)	Controle (n=15)	p
Betabloqueador	2	0	0,22
Bloqueador do receptor da angiotensina 1	1	2	1,00
Inibidor da enzima de conversão da angiotensina	5	3	0,42
Bloqueador de canal de cálcio	1	3	0,59
Diuréticos Tiazídicos	6	3	0,24
Levotiroxina	3	4	1,00

Dados expressos em valores absolutos. Teste exato de Fisher.

7.2 Exames laboratoriais

A Tabela 3 mostra os parâmetros bioquímicos de perfil lipídico e glicêmico e apolipoproteínas. Os dois grupos apresentaram perfil lipídico e de apolipoproteínas semelhantes. A apo E mostrou uma tendência a ser

maior no grupo IG comparado ao grupo controle, não confirmado significativamente ($p=0,06$). Como esperado, os valores de glicemia de jejum e glicemia de 2 horas (após TOTG) foram maiores no grupo IG ($p<0,01$). A HbA1C também foi significativamente maior no grupo IG ($p=0,02$). Dados laboratoriais individuais de cada grupo encontram-se no ANEXO C.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos dos grupos IG e controle.

Parâmetros	IG (n=14)	Controle (n=15)	p
Glicemia (mg/dL)			
Jejum	102 ± 9	87 ± 5	<0,01
2 horas após TOTG	162 ± 13	106 ± 20	<0,01
HbA1C (%)	6,1 ± 0,5	5,6 ± 0,3	0,02
Colesterol total (mg/dL)	203 ± 26	193 ± 27	0,35
Colesterol ñ-HDL	147 ± 31	137 ± 21	0,34
LDL	121 ± 25	114 ± 22	0,47
HDL	55 ± 17	55 ± 21	0,99
VLDL	26 ± 8	23 ± 7	0,26
Triglicérides (mg/dL)	131 ± 41	115 ± 38	0,26
TG/HDL	2,7 ± 1,4	2,3 ± 1,1	0,39
Apolipoproteínas (mg/dL)			
A1	153 ± 29	150,8 ± 35	0,86
B	99,2 ± 24	91,3 ± 18	0,32
B/A1	0,68 ± 0,23	0,64 ± 0,19	0,57
E	5,1 ± 1,2	4,1 ± 1,3	0,06

Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste t de Student e teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

7.3 Resistência à insulina

A avaliação da capacidade de secreção de insulina (HOMA2 % β), estimativa da sensibilidade à insulina (HOMA2 %S) e da resistência à insulina (HOMA2-IR) nos grupos IG e controle estão descritos na Tabela 4.

Os dois grupos não diferem em relação à capacidade de secreção de insulina pela célula β , indicada pelo HOMA2 % β ($p=0,44$).

O grupo IG apresenta maior concentração de insulina de jejum ($p<0,01$) e maior resistência à insulina ($p<0,01$), indicada pelo HOMA2-IR. O

grupo IG possui menor sensibilidade à insulina ($p=0,01$), expressa pelo HOMA2 %S.

Dados da homeostase glicêmica individuais de cada grupo encontram-se no ANEXO D.

Tabela 4. Valores de homeostase glicêmica avaliada pelo HOMA e insulina de jejum dos grupos IG e controle.

Parâmetros	IG (n=14)	Controle (n=15)	p
HOMA2 % β	112 $\pm$ 28	103 $\pm$ 34	0,44
HOMA2 %S	80 $\pm$ 43,1	139,7 $\pm$ 74,7	0,01
HOMA2-IR	1,5 $\pm$ 0,6	0,9 $\pm$ 0,4	<0,01
Insulina de jejum (μ U/mL)	11,9 $\pm$ 5,1	7,1 $\pm$ 3,7	<0,01

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste t de Student. HOMA2 % β = capacidade de secreção de insulina pela célula β pancreática, HOMA2 %S = sensibilidade à insulina e HOMA2-IR = índice de resistência à insulina.

7.4 Distribuição da adiposidade abdominal

A distribuição da adiposidade abdominal indicada pela área de gordura total, área de gordura visceral, área de gordura subcutânea e a relação entre as áreas de gordura visceral e subcutânea estão descritas na Tabela 5.

Não houve diferença entre os grupos na quantidade de gordura abdominal total e de seus componentes: visceral e subcutâneo. Dados da distribuição da adiposidade abdominal individuais de cada grupo encontram-se no ANEXO E.

Tabela 5. Distribuição da adiposidade abdominal nos grupos IG e controle.

Parâmetros	IG (n=14)	Controle (n=14)	p
Gordura total (cm^2)	475,2 $\pm$ 143,9	396,3 $\pm$ 97,7	0,10
Visceral	171,5 $\pm$ 81,9	144,4 $\pm$ 48,1	0,29
Subcutânea	303,6 $\pm$ 101,7	251,8 $\pm$ 83,1	0,15
Visceral/Subcutânea	0,61 $\pm$ 0,34	0,63 $\pm$ 0,30	0,86

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste t de Student.

7.5 Cinética plasmática do ^3H -colesterol livre e do ^{14}C -éster de colesterol

A Tabela 6 mostra a taxa fracional de remoção (TFR) média e os parâmetros cinéticos médios (K 1,0, K 1,2 e K 2,0) do ^{14}C -EC e ^3H -CL nos grupos IG e controle. A TFR do ^{14}C -EC do grupo IG apresenta valores semelhantes ao do grupo controle ($p=0,39$). Em relação aos demais parâmetros cinéticos do ^{14}C -EC, os valores obtidos no grupo IG não diferiram do grupo controle.

A taxa de remoção do ^3H -CL se mostrou mais rápida ($p=0,04$) quando comparada à obtida para o grupo controle. O parâmetro cinético k 2,0 do ^3H -CL foi maior no grupo IG comparado com o grupo controle ($p=0,03$).

Tabela 6. Taxa fracional de remoção (TFR) e parâmetros cinéticos (K's) dos compartimentos 1 e 2 do ^{14}C -éster de colesterol e do ^3H -colesterol livre da nanoemulsão lipídica nos grupos IG e controle.

Parâmetros	IG (n=14)	Controle (n=15)	p
TFR ^{14}C -EC (h^{-1})	0,05 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01	0,39
K 1,0	0,26 $\pm$ 0,18	0,24 $\pm$ 0,23	0,48
K 1,2	0,33 $\pm$ 0,17	0,59 $\pm$ 0,62	0,91
K 2,0	0,04 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,07	0,96
TFR ^3H -CL (h^{-1})	0,06 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	0,04
K 1,0	0,54 $\pm$ 0,35	0,66 $\pm$ 0,24	0,34
K 1,2	0,48 $\pm$ 0,19	0,44 $\pm$ 0,21	0,62
K 2,0	0,05 $\pm$ 0,10	0,02 $\pm$ 0,009	0,01

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste t de Student.

As Figuras 10 e 11 mostram as curvas de decaimento plasmático da radioatividade presente nas duas marcações lipídicas ao longo de 24 horas. Ambos os grupos apresentaram remoção semelhante do ^{14}C -éster de colesterol (FIGURA 10), mas a remoção do ^3H -colesterol livre do grupo IG foi mais rápida do que no grupo controle (FIGURA 11).

Figura 10. Curvas de decaimento plasmático do ^{14}C -éster de colesterol nos grupos IG (n=14) e controle (n=15).

Figura 11. Curvas de decaimento plasmático do ^3H -colesterol livre nos grupos IG (n=14) e controle (n=15).

7.6 Esterificação do ^3H -colesterol livre presente na nanoemulsão lipídica artificial

Na curva média da taxa de esterificação (%) do ^3H -colesterol livre ao longo de 24h, não se observou uma diferença na porcentagem de esterificação entre os grupos IG e controle (FIGURA 12).

Figura 12. Curva da taxa de esterificação do ^3H -colesterol livre nos grupos IG (n=12) e controle (n=7).

7.7 Transferência *in vitro* de éster de colesterol (CE), fosfolípide (PL), triglicérides (TG) e colesterol livre (CL) da nanoemulsão para a HDL

A transferência dos quatro lípides marcados na nanoemulsão artificial para a fração HDL apresentou valores semelhantes nos grupos IG e controle (TABELA 7).

Tabela 7. Transferência *in vitro* dos lípides marcados da nanoemulsão lipídica para a HDL nos grupos IG e controle.

Parâmetros	IG (n=14)	Controle (n=15)	p
^3H -éster de colesterol (%)	3.5 ± 0.4	3.6 ± 0.6	0.63
^{14}C -fosfatidilcolina (%)	21.6 ± 1.1	22.2 ± 1.2	0.19
^3H -triglicérides (%)	7.0 ± 2.1	6.1 ± 1.3	0.15
^{14}C -colesterol livre (%)	9.0 ± 1.1	9.9 ± 2.0	0.29

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste t de Student e teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

8. DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

O diabetes passou a ser considerado como um importante problema de Saúde Pública, como consequência ao aumento de sua prevalência em níveis epidêmicos observada nas duas últimas décadas e por sua elevada associação com complicações crônicas que constituem importantes causas de mortalidade e de morbidade, de piora de qualidade de vida e de aumento de custos. Das complicações crônicas do diabetes, as cardiovasculares têm sido inegavelmente evidenciadas como as que causam maior impacto. Isso se deve ao fato de que as complicações cardiovasculares estão relacionadas à maior causa de mortalidade dos pacientes com diabetes e têm sido reconhecidas como uma das principais causas contribuintes para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares agudos, como o infarto agudo do miocárdio (IAM).

O crescente papel do diabetes para o desenvolvimento dos eventos coronarianos tem sido demonstrado em vários estudos e levantamentos epidemiológicos, como indica o recente relatório publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos. Nesse relatório, mostra-se que, enquanto tem sido observada uma redução da mortalidade consequente ao IAM na população em geral, tem ocorrido um crescente aumento de mortalidade por IAM em pacientes com diabetes (FANG e ALDERMAN, 2006). Entretanto, estas observações podem ser ainda mais impactantes se considerarmos que o aumento do risco cardiovascular do diabético ocorre já em fases mais precoces da história natural da doença, antes mesmo do seu diagnóstico clínico. Em recente estudo realizado no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas (InCor-HC), foi observado que, de 2262 pacientes com quadro de IAM atendidos na Unidade de Emergência deste Serviço, 868 (37,41%) indivíduos referiam ou foram diagnosticados no período de internação como diabéticos ou apresentando alterações do metabolismo dos carboidratos, como a intolerância à glicose (LERARIO et al., 2008). O estudo europeu DECODE (2001) conclui que o risco cardiovascular em pacientes com hiperglicemia pós-prandial seria ainda

maior do que a de pacientes com diabetes clínico.

Portanto, considerando que as alterações fisiopatológicas do DM2 ocorrem vários anos antes do aparecimento de sua forma clínica, é importante que maiores estudos sejam direcionados para uma melhor compreensão fisiopatológica destas alterações em fases mais precoces e assintomáticas, quando ocorre a intolerância à glicose e a disglucemia.

Apesar de ser reconhecida uma relação entre a elevação das concentrações de hemoglobina glicada, o que indica o grau de controle glicêmico, e o risco de complicações crônicas do diabetes, incluindo a doença cardiovascular, esta relação não tem se mostrado ser linear nos grandes estudos controlados de tratamento intensivo de longo prazo, como o UKPDS (HOLMAN et al., 2008), o ACCORD (2008) e o ADVANCE (2008). Tais estudos não conseguiram demonstrar uma redução significativa da DCV pelo controle glicêmico intensivo em indivíduos diabéticos, indicando ser tal relação mais complexa e dependente de outros fatores, especialmente da presença da síndrome metabólica.

Considerando que o grau de deficiência secretória pancreática de insulina e a intensidade da persistência da hiperglicemia ocorrem em menor intensidade na IG, quando comparadas a essas alterações no DM2, e que a presença das complicações cardiovasculares não difere muito entre estas duas condições (IG e DM2), pode-se inferir um maior papel da resistência à insulina e, conseqüentemente, da síndrome metabólica e seus componentes comuns tanto no diabetes e na IG, para o desenvolvimento da DCV, como demonstram os estudos de HAFFNER et al. (2000) e de ISOMAA et al. (2001).

Para melhor avaliar a presença destes fatores e, mais especificamente, as alterações do metabolismo lipídico em pacientes com IG, estudamos pacientes com diagnóstico de intolerância à glicose, sem manifestação clínica de doença cardiovascular, que não utilizam antidiabéticos orais e hipolipemiantes, em comparação com controles, pareados para idade, sexo, raça, IMC, tabagismo, consumo de álcool, prática de atividade física e doenças associadas, visando afastar outros

fatores de risco para a DCV.

8.1 Avaliação clínica, laboratorial e antropométrica

A análise das características clínicas demonstra não haver diferenças significativas entre os grupos estudados quanto à idade, sexo, história prévia de doença cardiovascular e de diabetes, tabagismo e uso de medicamentos de uso crônico, como diuréticos e hipotensores, demonstrando haver uma uniformização de seleção dos grupos. Apesar de ocorrer a presença de hipotireoidismo, não houve diferença estatística em sua prevalência entre os grupos e estes pacientes estavam devidamente compensados pela utilização de medicação substitutiva com hormônio tireoidiano. A hipertensão arterial esteve presente na maioria (57%) dos pacientes IG, prevalência esta semelhante à observada por NÓVOA et al. (2005), que encontraram 55,5% de pacientes intolerantes à glicose com hipertensão. Quando comparado ao grupo controle, não se observou uma diferença significativa do grupo IG quanto à frequência de hipertensão, fato este explicável pelo usual aumento da presença de hipertensão por diversas causas na faixa etária dos pacientes estudados do grupo controle e/ou devido à pequena amostragem dos grupos.

Como esperado, devido ao critério de seleção dos pacientes, o grupo IG apresentou glicemia de jejum ($p<0,01$), glicemia de 2 horas após TOTG ($p<0,01$) e hemoglobina glicada ($p=0,02$) maiores em comparação ao grupo controle.

O perfil lipídico dos pacientes, que foi um dos objetivos principais do estudo, não diferiu entre os intolerantes e controles e foi semelhante às concentrações plasmáticas de colesterol total, as suas sub-frações LDL, HDL, VLDL e de triglicérides observadas por outros autores (WATANABE et al., 1999; NAGARETANI et al., 2001; HAFFNER et al., 2003; NÓVOA et al., 2005). Portanto, não observamos o padrão de perfil lipídico que é freqüentemente descrito em pacientes diabéticos, caracterizado por uma redução do HDL-colesterol e aumento dos triglicérides (GINSBERG, 1991;

TASKINEN, 2002). A associação da relação TG/HDL com a presença de LDL pequena e densa tem sido descrita indiretamente pela determinação do índice TG/HDL, sendo que pacientes com este índice $>3,8\text{mg/dL}$ possuem 79% da concentração de LDL pequena e densa (fenótipo tipo B) e aqueles com índice TG/HDL $<3,8\text{mg/dL}$ expressam 81% de fenótipo tipo A da fração LDL (HANAK et al., 2004). Em nosso estudo, não houve diferença na relação TG/HDL entre os grupos e o índice encontrado foi $<3,8\text{mg/dL}$. Segundo HANAK et al. (2004), isso indica provável predomínio no número de LDL com fenótipo A, possivelmente porque nossos pacientes IG não apresentavam concentrações elevadas de triglicérides nem baixas de HDL-C. O colesterol não-HDL é a somatória do colesterol contido na LDL, VLDL, IDL e representa o total das partículas consideradas aterogênicas. Neste estudo, não foi obtida diferença do colesterol não-HDL entre os grupos IG e controle.

Não houve diferença no perfil das apolipoproteínas entre os grupos. A concentração das apolipoproteínas B reflete o número de partículas aterogênicas, enquanto a concentração de apo A-I não reflete. A relação apo B/A-I tem sido alvo de investigações epidemiológicas mostrando que elevados índices desta relação se associam com o risco cardiovascular (LAMARCHE et al., 1996; SHARRET et al., 2001; YUSUF et al., 2004; WALLDIUS et al., 2004; ST PIERRE et al., 2006). Em relação aos pontos de corte, WALLDIUS et al. (2004) classificaram a relação apo B/A-I segundo a faixa etária, sugerindo como indicador de risco uma razão apo B/A-I $>0,9$ para homens e apo B/A-I $>0,8$ para mulheres. Ao separar nossos pacientes por sexo, não verificamos índices indicativos de risco da razão apo B/A-I para homens e mulheres, considerando os critérios dos referidos autores. Estes achados podem ser explicados pelo fato de que, em nosso grupo de pacientes, os níveis séricos de triglicérides e de LDL colesterol não estão suficientemente elevados. A apo E é encontrada em QM, VLDL e HDL e participa da cascata lipolítica de conversão da VLDL em IDL e LDL. Nesse processo, apo E é transferida da HDL para lipoproteínas ricas em triglicérides e também está envolvida na remoção dessas partículas por meio

de seu reconhecimento por receptores hepáticos (BACK-NGOHOU et al., 2002). Houve uma tendência da apo E ser discretamente maior no intolerante à glicose em relação ao controle, mas este dado não foi confirmado pela análise estatística. Maiores concentrações de apo E em pacientes com IG foram observados por PIETZSCH e FUECKER (2003) em comparação com controles com glicemia normal. Nossos achados em relação ao perfil lipídico podem ser explicados pela casuística pequena ou pelo fato de nossos pacientes não apresentarem um quadro de dislipidemia importante.

Na avaliação antropométrica dos nossos pacientes, embora tenhamos observado uma maior quantidade de pacientes IG com sobrepeso do que controles e um valor médio de IMC do grupo IG em nível de sobrepeso e maior do que o IMC médio do grupo controle, o índice de massa corpórea não se mostrou diferente entre os grupos. A maior presença de sobrepeso e de obesidade em pacientes IG também foi descrita nos estudos SAYDAH et al. (2001) e QIAN et al. (2009). De forma semelhante, outros parâmetros antropométricos, tais como valores médios da circunferência abdominal e da relação cintura/quadril, apesar de se apresentarem maiores no grupo IG em comparação ao grupo controle, também não foram diferentes significativamente entre esses grupos. Esses achados também foram obtidos por outros autores, que observaram valores médios destes parâmetros mais elevados em pacientes com IG quando comparados a indivíduos com glicemia normal (SAYDAH et al., 2001; HAFFNER et al., 2003). O fato de não termos observado uma diferença estatística nos valores de IMC, circunferência abdominal e relação cintura/quadril entre os dois grupos estaria relacionado, provavelmente, ao aumento destes parâmetros no grupo controle que, segundo os critérios descritos pelas recomendações da Organização Mundial da Saúde (WHO/OMS, 1997) e da Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2005), os quais classifica os controles como sobrepeso, aumento da circunferência abdominal e da relação cintura/quadril. Além disso, os valores destes parâmetros nos pacientes IG

são similares aos observados por outros autores (SAYDAH et al. 2001; HAFFNER et al., 2003).

A presença de sobrepeso nos indivíduos do grupo controle demonstra a maior prevalência de sobrepeso e obesidade que vem ocorrendo nas últimas décadas em nossa população nesta faixa etária. Esta população com elevação do peso é mais vulnerável ao desenvolvimento do diabetes (BRAY, 1985). A manifestação clínica do diabetes depende da ocorrência de uma menor reserva pancreática individual de insulina para conseguir manter o controle glicêmico frente ao aumento da resistência à insulina, que geralmente se associa ao aumento do peso, que também depende de fatores genéticos.

8.2 Distribuição da adiposidade abdominal

Estudos epidemiológicos demonstram que as anormalidades da distribuição da gordura corporal, mais do que o grau de obesidade, associam-se ao maior risco cardiovascular. O tecido gorduroso visceral está relacionado com diversos fatores da síndrome metabólica, hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina, por isso ele é o mais deletério (DESPRÉS, 1996; YAMASHITA et al., 1996; WAJCHENBERG, 2000; ASAKAWA et al., 2002; KAHN et al., 2006; RIBEIRO FILHO et al., 2006). Os métodos indiretos de estimar a adiposidade corporal são por meio de medidas de IMC, circunferência abdominal e do quadril. Técnicas diretas mais precisas de quantificar o tecido gorduroso corporal têm sido utilizadas. A tomografia computadorizada da região abdominal utiliza alta resolução anatômica para obter os componentes gordurosos no plano do umbigo, baseado no fato de que tal plano contém o maior percentual de gordura no corpo, permitindo fácil delimitação e mensuração do tecido gorduroso abdominal e seus componentes, visceral e subcutâneo. Por isso, a TC é considerada “padrão-ouro” para caracterização e localização do tecido gorduroso (BORKAN et al., 1982; HEYMSFIELD, 2008).

Em nosso estudo, o grupo IG apresentou gordura total, visceral e subcutânea semelhantes ao grupo controle, em valores absolutos (TABELA 5) ou relativos (IG= 36% visceral, 64% subcutânea e controle= 37% visceral, 63% subcutânea). Apesar de não mostrada diferença significativa entre os grupos, esses valores foram considerados elevados comparados aos valores preconizados por ROCHA (1993) (gordura visceral= $28,27 \pm 17,54 \text{ cm}^2$), (ROCHA, 1993). Portanto, a consideração válida para explicar os aumentos, sem diferença estatística, do IMC e da circunferência abdominal no grupo IG em comparação ao grupo controle, pode ser também válida para explicar porque não encontramos aumento da gordura visceral no grupo IG.

MATSUZAWA et al. (1987) estudaram extensivamente a obesidade por meio da TC e classificaram indivíduos como portadores de obesidade visceral ou subcutânea baseado na relação entre essas duas áreas. Para tanto, consideraram indivíduos portadores de obesidade visceral se tal relação $\geq 0,4$ e indivíduos portadores de obesidade subcutânea se $< 0,4$. Quando avaliamos este índice no nosso estudo, observamos valor médio superior a 0,4 nos pacientes IG e nos controles, sugerindo um predomínio de obesidade visceral em ambos os grupos, segundo classificação de MATSUZAWA et al. (1987). Observamos também correlações estatisticamente significativas do tecido adiposo visceral com alguns parâmetros metabólicos indicativos de risco cardiovascular nos pacientes IG, tais como as concentrações plasmáticas de insulina ($r=0,58$, $p=0,02$), hemoglobina glicada ($r=0,54$, $p=0,04$), apo B ($r=0,57$, $p=0,03$) e índice de resistência à insulina ($r=0,55$, $p=0,03$). Associações desses parâmetros com a gordura visceral também foram verificadas por outros autores (FUJIOKA et al., 1987; DESPRÉS et al., 1989; PEIRIS et al., 1989; ROCHA, 1993; NAGARETANI et al., 2001; WATTS et al., 2003; MATSUZAWA, 2008).

8.3 Resistência à insulina

A resistência à insulina está envolvida na patogênese da intolerância à glicose e do diabetes tipo 2. A manutenção da glicemia nos valores

normais depende principalmente da capacidade funcional das células β pancreáticas em secretar insulina compensando a menor sensibilidade tecidual à ação da insulina (GINSBERG, 2000; MATTHEWS, 1985). A técnica “padrão-ouro” para determinação da resistência à insulina é o clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico, que mede a taxa de captação de glicose mediante infusão de insulina e glicose. No entanto, esta metodologia é dispendiosa, demorada, invasiva e de alta complexidade (VASQUES et al., 2008), o que tornou inviável sua utilização neste estudo. Utilizamos, portanto, o modelo HOMA, baseado no cálculo matemático de homeostase glicêmica, que prediz a sensibilidade e resistência à insulina a partir de concentrações plasmáticas de glicemia e insulina de jejum. Neste estudo, os índices de homeostase glicêmica mostraram que o grupo IG apresentou menor sensibilidade à insulina (HOMA2-%S), também verificado por outros autores (ARTEAGA et al., 2009; QIAN et al., 2009). Os pacientes IG apresentaram um índice de resistência à insulina (HOMA2-IR) maior do que o do grupo controle, em concordância com os achados de outros autores (NAGARETANI et al., 2001; NÓVOA et al., 2005). NAGARETANI et al. (2001) mostraram médias do índice de RI muito semelhantes às observadas em nossos pacientes. Na presença da resistência à insulina, os tecidos respondem menos à ação desta e o pâncreas começa a produzir volumes de insulina maiores, como um mecanismo de hiperinsulinemia compensatória e de adaptação, na tentativa de vencer a resistência insulínica presente e manter os valores de glicemia normal (GINSBERG, 2000). Em nosso grupo de pacientes IG, as concentrações plasmáticas de insulina de jejum foram elevadas ($p < 0,01$), como também NAGARETANI et al. (2001) observaram em seu estudo. Porém, apesar da média do HOMA2-% β ser mais elevada no grupo IG, ela não diferiu significativamente do grupo controle (IG = 112 ± 28 e controle = 103 ± 34 , $p = 0,44$). Isto indica que nos nossos pacientes IG, provavelmente esta hiperinsulinemia compensatória foi insuficiente para manter de forma adequada os níveis glicêmicos do jejum (que se mostraram mais elevados no grupo IG), frente ao estado de resistência à insulina,

indicando já existir uma incapacidade secretória relativa da secreção pancreática de insulina.

Como observado no nosso estudo, os pacientes IG apresentam uma maior resistência à insulina e uma menor sensibilidade à insulina, comparados com os controles. Evidências demonstram que a RI é considerada como um fator de risco para a DAC, uma vez que se associa à hiperinsulinemia, hipertensão arterial e perfil lipídico desfavorável, caracterizado por menores partículas de LDL e seu enriquecimento com triglicérides, aumento nas concentrações plasmáticas de VLDL e triglicérides e diminuição de HDL-C (REAVEN et al., 1989; STERN, 1995; GINSBERG, 2000; GINSBERG e HUANG, 2000; REAVEN, 2005). Em 1988, REAVEN propôs à associação desses fatores a denominação de síndrome metabólica. Aplicando os critérios da Federação Internacional de Diabetes (2005), observamos que 9 (64%) dos 14 pacientes intolerantes à glicose, contra apenas 4 (27%) dos 15 pacientes controles, apresentam a síndrome metabólica. Nossos pacientes IG apresentam componentes da síndrome metabólica, os quais estão intimamente relacionados com a presença da resistência à insulina nestes pacientes. O índice de resistência à insulina (HOMA2-IR) não se correlacionou com o metabolismo de lípidos (cinética do colesterol, esterificação do colesterol livre e transferência de lípidos) nem com parâmetros bioquímicos da RI, provavelmente devido ao pequeno intervalo de variabilidade dos níveis lipídicos considerado nos critérios de seleção de pacientes (exclusão de pacientes com níveis elevados destes parâmetros). A única associação encontrada foi da RI com a circunferência abdominal e também com o tecido gorduroso visceral, o que mostra o papel influente dos adipócitos viscerais na presença da RI (GOFF et al., 2005), um fator de risco reconhecido para o desenvolvimento da IG e que provavelmente expõe estes paciente a um maior risco de desenvolver a doença coronária (STERN, 1995; DECODE, 2001).

8.4 Cinética plasmática do ^3H -colesterol livre e do ^{14}C -éster de colesterol

No estudo cinético, a nanoemulsão lipídica possui composição lipídica semelhante à LDL natural, mas é preparada sem proteína. Uma vez injetada na circulação sanguínea, a nanoemulsão entra em contato com outras classes de lipoproteínas do plasma, adquire apolipoproteínas, preferencialmente a apo E e, possibilitando sua captação por receptores de LDL, de onde migra do compartimento intravascular para o espaço extravascular (MARANHÃO et al., 1997). Em relação à LDL nativa, a nanoemulsão artificial é removida mais rapidamente do plasma e isso se deve às diferenças no perfil de apolipoproteínas na superfície dessas partículas (GINSBURG et al., 1982; MARANHÃO et al., 1993; MARANHÃO et al., 1994; HIRATA et al., 1999).

Estudos anteriores mostraram que a apo E, responsável por se ligar à superfície da nanoemulsão, tem mais afinidade pelo receptor do que a própria LDL natural que contém apo B-100. Isso porque quando a apo B-100 foi incorporada à nanoemulsão antes da injeção em ratos, sua remoção foi reduzida em comparação à LDL natural, e também houve menor captação hepática. *In vivo*, este estudo mostra que a partícula artificial possui mais afinidade pelos receptores de LDL do que a própria LDL natural (HIRATA et al., 1999). Estudos em linfócitos mostraram que a LDL natural compete com a nanoemulsão pela captação celular, comprovando que a remoção de ambas se dá pelo mesmo receptor específico (MARANHÃO et al., 1997). A descoberta de que a nanoemulsão se liga aos receptores de LDL levantou a possibilidade de usá-la como substituto da LDL natural em estudos cinéticos.

MARANHÃO et al. (1997) mostraram que, quando injetada em indivíduos normolipidêmicos e hipercolesterolêmicos, a partícula artificial era removida mais lentamente da circulação nos hipercolesterolêmicos. Sabendo-se que a hipercolesterolemia é uma doença cujo defeito está nos receptores B/E e na deficiente captação da LDL, o que resulta em acúmulo

de LDL-C no plasma e depósito nos vasos, os achados desse estudo confirmam o comportamento esperado na hipercolesterolemia, revelando o potencial uso da nanoemulsão como instrumento para investigação nas dislipidemias (MARANHÃO et al., 1997). O fato de a nanoemulsão ser removida mais rapidamente da circulação comparativamente à LDL natural mostra uma vantagem metodológica muito grande, já que encurta o tempo necessário para avaliar o estudo cinético, o qual fica reduzido a apenas algumas horas de acompanhamento. Outra vantagem é que, a partir de um mesmo preparo, a nanoemulsão pode ser usada em diferentes indivíduos. Isso não pode ser feito em estudo cinético quando se utiliza lipoproteínas naturais (autólogas). Todos esses benefícios operacionais tornam o estudo cinético sistematizado e prático, facilitando sua aplicação em uma população heterogênea de indivíduos.

No nosso estudo, após a injeção da nanoemulsão duplamente marcada, a curva de decaimento plasmático do ^3H -colesterol livre foi maior no grupo IG comparado ao grupo controle, como confirmado pela maior taxa fracional de remoção do colesterol livre (IG= $0,06 \pm 0,02$ e controle= $0,04 \pm 0,02$, $p=0,04$). Por outro lado, a remoção do ^{14}C -éster de colesterol foi igual entre os grupos (IG= $0,05 \pm 0,01$ e controle= $0,05 \pm 0,01$, $p=0,40$). O fato da curva de decaimento plasmático do colesterol livre da nanoemulsão ser maior que a do grupo controle indica que o colesterol livre está sendo removido mais rapidamente do compartimento plasmático. O parâmetro cinético $K_{2,0}$ do ^3H -colesterol livre, que expressa a remoção desta marcação do compartimento plasmático para o espaço extravascular, foi maior no grupo IG em comparação ao grupo controle (TABELA 6, $p=0,01$), indicando que, mesmo após a nanoemulsão adquirir apolipoproteínas no meio plasmático, a saída do colesterol livre foi mais rápida que a do éster de colesterol.

O colesterol existe em duas formas no organismo, a forma livre e a esterificada. O colesterol esterificado é a forma de armazenamento intracelular e, enquanto no plasma, o mesmo pode ser deslocado para o centro de outras lipoproteínas pela ação da CETP. Por outro lado, em função

da sua característica apolar, o colesterol livre está localizado na superfície da partícula e por isso é mais instável do que a forma esterificada, que fica no centro hidrofóbico da estrutura lipoprotéica. Devido a essas características físico-químicas, as duas formas de colesterol podem apresentar diferentes comportamentos metabólicos. Essa instabilidade atribuída ao colesterol livre pode favorecer sua dissociação da partícula e eventualmente precipitar na parede dos vasos sanguíneos (GARRET e GRISHAM, 1995).

A marcação ^{14}C -éster de colesterol mostra a remoção das partículas da nanoemulsão da circulação. O fato de que a remoção do éster de colesterol no grupo IG foi semelhante a dos controles reflete os níveis normais de LDL colesterol encontrados nesses pacientes. Estudos prévios relataram que, em pacientes com síndrome metabólica, a remoção da LDL com a apo B marcada com isótopo estável foi menor comparada com controles. Entretanto, esses pacientes apresentavam LDL colesterol e triglicérides elevadas, diferente dos nossos pacientes (RICHES et al., 1998; CHAN et al., 2002; CHAN et al., 2005).

PONT et al. (2002) encontraram menor clearance da LDL marcada com ^{13}C -leucina-apo B-100 em pacientes obesos ($\text{IMC}=40 \text{ kg/m}^2$) com resistência à insulina. Porém, esses pacientes apresentavam concentrações de LDL colesterol mais elevadas que a dos nossos pacientes. Além disso, os autores desse estudo avaliaram uma pequena amostra só de mulheres, mais jovens e sem alteração glicêmica, diferente dos nossos pacientes. Portanto, esse estudo não reflete o comportamento intravascular da LDL em indivíduos com intolerância à glicose.

A remoção mais rápida do colesterol livre do que a do éster de colesterol sugere dissociação do colesterol livre das partículas da nanoemulsão lipídica. Um cenário semelhante a este foi previamente observado por SANTOS et al. (2003) em pacientes normolipidêmicos com doença arterial coronária diagnosticada e sem diabetes *mellitus* ou intolerância à glicose. Portanto, os pacientes com IG exibiram um comportamento alterado da nanoemulsão lipídica que pode ser associado

com mecanismos aterogênicos, embora eles não apresentem dislipidemia e ainda não apresentem manifestações clínicas de DAC. Esses achados de SANTOS et al. (2003) mostram uma remoção acelerada do colesterol livre do plasma de pacientes normolipidêmicos com DAC, podendo interpretar que este componente esteja se desprendendo da superfície da lipoproteína e eventualmente se depositando na parede de vasos sanguíneos. Posteriormente, COUTO et al. (2007) mostraram, através da análise de fragmentos retirados de pacientes com DCV submetidos à cirurgia de revascularização, uma maior captação do colesterol na forma livre em comparação com a esterificada da nanoemulsão, confirmando esta hipótese.

Um achado do nosso estudo estatístico foi uma correlação dos dados cinéticos com a hemoglobina glicada. As elevadas concentrações de hemoglobina glicada observadas no grupo IG em comparação ao grupo controle ($p=0,02$) se correlacionaram de maneira positiva com o parâmetro cinético $K_{1,0}$ do ^3H -colesterol livre ($r=0,65$, $p=0,04$). Esse parâmetro reflete a remoção inespecífica do colesterol livre, sugerindo que possivelmente os maiores níveis hiperglicêmicos presentes nesses pacientes intolerantes à glicose também podem ter contribuído com as maiores taxas de remoção desta forma de colesterol.

Não encontramos correlações dos dados cinéticos com a esterificação do colesterol livre da nanoemulsão, com a transferência *in vitro* de lípidos para a HDL e nem com parâmetros metabólicos de risco, tais como as concentrações plasmáticas lipídicas, a resistência à insulina e a adiposidade abdominal no grupo IG.

No nosso trabalho, a proposta foi avaliar se o indivíduo com intolerância à glicose apresenta alterações no metabolismo intravascular da lipoproteína LDL que poderiam explicar o elevado risco cardiovascular nesses pacientes. Estudamos pacientes IG que diferem do grupo controle somente nas concentrações de glicemia e, portanto, outras variáveis que poderiam influenciar nos resultados encontrados, como idade, sexo, concentrações séricas de lípidos e comorbidades, não diferem entre os grupos. Observamos uma remoção mais rápida do colesterol livre no grupo

IG comparado ao controle, ao passo que a remoção do éster de colesterol foi semelhante entre os grupos. A maior remoção do colesterol livre pode sinalizar, provavelmente, o início de uma alteração que se mostra presente antes deste paciente manifestar o diabetes clínico. Porém, nossos resultados requerem mais investigações para melhor compreender e confirmar tais achados como possível mecanismo pró-aterogênico no paciente IG.

8.5 Esterificação do ^3H -colesterol livre presente na nanoemulsão lipídica artificial

Neste estudo, a remoção mais acelerada do ^3H -CL no grupo IG pode indicar que esta forma de colesterol esteja se desprendendo da nanoemulsão mais expressivamente que no grupo controle, podendo ou não sofrer esterificação.

O colesterol livre é continuamente esterificado pela ação das duas enzimas: a LCAT no compartimento plasmático, que utiliza apo A1 como co-fator, e pela ACAT, no meio intracelular. Uma vez esterificado, o colesterol é deslocado da superfície para o núcleo da lipoproteína, reduzindo a possibilidade de deposição na parede arterial (GLOMSET, 1968; DOBIASOVA e FROHLICH, 1998; JIN et al., 2002; COUTO et al., 2007).

O processo de esterificação do colesterol ocorre principalmente na fração HDL, em que a presença da apo A-I e da LCAT associadas às partículas de HDL estabelecem condições necessárias para a reação enzimática ocorrer (DOBIASOVA e FROHLICH, 1998). Após o colesterol livre ser captado pela HDL e sofrer esterificação, moléculas de éster de colesterol são geradas e armazenadas no centro da HDL, em função de sua característica hidrofóbica. Este processo é fundamental para manter a estabilização e transporte desta lipoproteína no plasma (DANIELS et al., 2009).

O fato da nanoemulsão, em contato com o meio intravascular, adquirir apolipoproteínas, inclusive apo A-I, prova a ocorrência da esterificação do

colesterol *in vivo* no plasma (MARANHÃO et al., 1993; MARANHÃO et al., 1994). Entretanto, apesar da LCAT também esterificar o colesterol livre presente na partícula de LDL, a reação de esterificação ocorre em taxas menores. Isso porque o local de maior eficiência de esterificação do colesterol no plasma se dá na fração HDL, pois contém a apo A-I, proteína ausente na LDL, principal co-fator dessa reação (DOBIASOVA e FROHLICH, 1998; DANIELS et al., 2009).

O fato de não haver diferenças nas taxas de esterificação do colesterol livre da nanoemulsão nos pacientes IG, em comparação aos controles, sugere que a esterificação não foi determinante no processo de dissociação das partículas de colesterol livre da nanoemulsão. Além disso, não encontramos correlações das taxas de esterificação com dados da cinética das duas formas de colesterol nem com parâmetros metabólicos, tais como o perfil lipídico, a resistência à insulina e a adiposidade abdominal avaliada pela TC.

Em estudos prévios, a ação da LCAT não foi encontrada alterada em pacientes com resistência à insulina e em pacientes com DM2 (BHATNAGAR et al., 1996; DE VRIES et al., 2003).

A transferência de colesterol livre das outras frações de lipoproteínas HDL pode favorecer o processo de esterificação. No entanto, em nosso ensaio de transferência *in vitro*, a transferência de colesterol livre da nanoemulsão para a HDL foi igual em ambos os grupos avaliados e isso pode também ter contribuído para as taxas de esterificação similares encontradas.

8.6 Transferência *in vitro* de éster de colesterol (EC), fosfolípide (FL), triglicérides (TG) e colesterol livre (CL) da nanoemulsão para a HDL

A transferência simultânea de lípides marcados foi avaliada *in vitro* utilizando-se uma técnica que consiste, resumidamente, na incubação do plasma total do paciente com a nanoemulsão lipídica artificial como doadora de quatro lípides radioativos. Após precipitação das lipoproteínas que

contêm apo B e da nanoemulsão, a porcentagem dos lípidos transferidos para a fração HDL é determinada pela contagem da radioatividade contida no sobrenadante. O processo de transferência atua no remodelamento e determina a composição da HDL, fundamentais para a manutenção da estrutura, estabilidade e funções ateroprotetoras desta lipoproteína (BRUCE et al., 2008). A transferência de lípidos entre as lipoproteínas é um processo bidirecional e dinâmico e é facilitado pelas proteínas de transferência, nomeadas CETP e PLTP. Outros fatores, tais como a concentração e composição das lipoproteínas doadoras (VLDL, LDL) e a lipoproteína aceptora (HDL), podem afetar a habilidade das lipoproteínas em doar e receber lípidos (GLOMSET, 1970; MARCEL et al., 1980; MASSON et al., 2009). Neste trabalho, a taxa percentual dos quatro lípidos marcados radioativamente que foram transferidos da nanoemulsão lipídica artificial para a fração HDL não diferiram entre os grupos.

Em relação às proteínas de transferência, que são um dos fatores que podem influenciar a transferência de lípidos, evidências mostram um aumento na atividade da CETP em pacientes com intolerância à glicose (PIETZSCH et al., 1999; PIETZSCH e FUECKER, 2003; JULIUS et al., 2007). Já estudos em diabéticos tipo 2 e com resistência à insulina são controversos. A CETP nesses pacientes pode estar aumentada (BEGDADE et al., 1997; RIEMES et al., 1998) ou inalterada (JONES et al., 1996; LOTTENBERG et al., 1996; GUÉRIN et al., 2001; BORGGREVE et al., 2003; DULLAART et al., 2004). Como não foi observado aumento da transferência de éster de colesterol nem de triglicérides para a HDL e dados da literatura apontam aumento de atividade da CETP no intolerante à glicose, sugere-se, portanto, que a ação da CETP *per se* não influenciou na transferência destes lípidos para a HDL. Ainda analisando as proteínas de transferência que podem estar interferindo no processo de transferência de lípidos, a PLTP facilita a transferência de colesterol livre e de fosfolípidos de outras lipoproteínas para a HDL (HUUSKONEN et al., 2001). JULIUS et al. (2007) verificaram que a PLTP está inalterada em indivíduos com intolerância à

glicose, o que pode justificar porque não encontramos diferença na transferência de lípides de superfície para a HDL nos grupos IG e controle.

No nosso laboratório, um estudo avaliou a transferência em indivíduos com síndrome metabólica e constatou também maior transferência de CL e FL da nanoemulsão para a HDL (dados não publicados). Porém, foram estudados somente homens, com concentrações de triglicérides e colesterol maiores, comparados com controles sem a síndrome, e também maiores comparados com nossos pacientes intolerantes à glicose. A transferência de fosfolípides no grupo com síndrome metabólica se correlacionou de forma positiva com as concentrações plasmáticas de triglicérides. O aumento da concentração de triglicérides está relacionado à presença de HDL rica em triglicérides e ao aumento do catabolismo dessas lipoproteínas (ADELI et al., 2001). A correlação positiva encontrada mostra que a hipertrigliceridemia influenciou na maior transferência dos lípides de superfícies na síndrome metabólica.

A transferência de lípides é influenciada pela concentração das lipoproteínas plasmáticas doadoras eceptoras. Como a concentração em lípides da nanoemulsão é constante e a concentração das lipoproteínas foi semelhante entre o grupo IG e controle, provavelmente este aspecto pode explicar o resultado encontrado neste estudo em relação à transferência de lípides. Outro fator que pode interferir no processo de transferência é a composição da HDL (lipoproteína aceptora).

PIETZSCH e FUECKER (2003) mostraram que a composição em lípides da HDL de indivíduos portadores de intolerância à glicose está alterada. Dentre seus constituintes, os autores mostraram que o conteúdo de éster de colesterol da HDL está aumentado, o conteúdo de triglicérides e fosfolípides está diminuído e o teor de colesterol livre está inalterado em intolerantes à glicose em comparação com controles com glicemia normal. Entretanto, os pacientes deste estudo diferiram quanto às concentrações plasmáticas das lipoproteínas, o que pode influenciar na alteração da composição da HDL encontrada no estudo em questão. Este dado da

literatura mostra que a composição da HDL é muitas vezes influenciada pela concentração das lipoproteínas plasmáticas.

Portanto, a transferência de lípidos para a HDL não está afetada nos pacientes intolerantes à glicose do nosso estudo. O processo de transferência é determinado pela combinação de vários fatores inter-relacionados, tais como proteínas de transferência, a composição lipídica das lipoproteínas doadoras e da HDL e a concentração das lipoproteínas. Podemos inferir, a partir dos nossos dados, que provavelmente o fato de nossos pacientes não apresentarem diferenças nas concentrações plasmáticas das lipoproteínas pode ter influenciado o resultado encontrado.

9. CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

Foram estudados indivíduos com intolerância à glicose, sem manifestação clínica de doença cardiovascular, que não utilizam antidiabéticos orais e hipolipemiantes, com médias de concentrações plasmáticas de lípides normais, em comparação com indivíduos controles pareados para idade, sexo, raça, IMC e comorbidades.

- O grupo intolerante à glicose apresentou uma maior resistência à insulina avaliada pelo HOMA.

- A taxa fracional de remoção do ^3H -colesterol livre foi maior no grupo intolerante à glicose.

- A taxa fracional do ^{14}C -éster de colesterol foi semelhante entre os grupos.

- Não houve diferença na taxa de esterificação do ^3H -colesterol livre e na transferência *in vitro* de lípides da nanoemulsão para a fração HDL.

- Não foram observadas relações do aumento da remoção ^3H -colesterol livre e da transferência *in vitro* de lípides para a HDL, no grupo intolerante à glicose, com a resistência à insulina, a distribuição da adiposidade abdominal e a presença de outros componentes clínicos da síndrome metabólica.

A dissociação observada do colesterol livre e do éster de colesterol da nanoemulsão lipídica no grupo intolerante à glicose pode, provavelmente, estar relacionada com a aterogênese nesses pacientes. Mais investigações são necessárias para esclarecer os mecanismos envolvidos no surgimento da doença cardiovascular nos pacientes intolerantes à glicose.

10. ANEXOS

Nos anexos A, B, C, D e E estão descritas as características clínicas (ANEXO A), antropométricas (ANEXO B), exames laboratoriais (ANEXO C), dados da homeostase glicêmica (ANEXO D) e distribuição da adiposidade abdominal (ANEXO E) individuais dos grupos IG e controle. O Anexo F consta o termo de consentimento dado aos participantes com informações detalhadas do protocolo de pesquisa.

Anexo A: Características clínicas dos grupos IG e controle

Tabela A1: Características clínicas do grupo IG (n=14).

N	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tabagismo	HF DAC	HF DM2	HAS	Hipotireoidismo compensado
1	67	F	B	n	s	n	s	n
2	53	F	B	n	s	s	n	n
3	48	F	N	s	n	s	n	n
4	59	F	B	n	n	n	s	n
5	56	M	B	n	s	s	n	s
6	61	F	B	n	n	s	s	s
7	52	F	B	n	n	s	n	n
8	52	F	B	n	s	n	s	n
9	63	M	B	n	n	n	s	n
10	59	M	B	n	n	n	n	n
11	56	M	B	n	s	s	s	n
12	49	M	B	n	n	s	s	n
13	50	F	B	n	s	n	n	n
14	68	F	B	n	s	s	s	n

n= não; s= sim; HF = história familiar.

Tabela A2: Características clínicas do grupo controle (n=15).

N	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tabagismo	HF DAC	HF DM2	HAS	Hipotireoidismo compensado
1	55	M	N	n	n	n	s	n
2	46	M	B	n	s	n	n	n
3	41	M	B	n	n	n	s	n
4	56	F	B	n	s	s	n	s
5	48	F	B	n	n	s	n	n
6	53	M	N	n	n	n	n	n
7	51	F	B	n	n	n	s	n
8	62	F	B	n	s	n	s	n
9	64	M	B	n	n	n	s	n
10	47	F	N	n	s	n	n	n
11	49	M	B	n	n	n	n	n
12	53	F	B	n	n	n	n	s
13	60	M	B	n	s	n	n	n
14	50	F	B	s	n	s	n	s
15	59	F	B	n	n	s	n	s

n= não; s= sim; HF = história familiar.

Anexo B: Características antropométricas dos grupos IG e controle

Tabela B1: Características antropométricas do grupo IG (n=14).

N	Peso (kg)	IMC (kg/m ²)	C.A. (cm)	C.Q. (cm)	RCQ
1	69	26,95	89	105,5	0,84
2	82,4	32,19	112,5	123,5	0,91
3	59	20,90	80	87	0,92
4	91,5	36,65	107	119	0,90
5	79	30,29	102	107	0,95
6	65,3	26,83	86	98,5	0,87
7	79,4	30,07	101	111	0,91
8	77,2	34,31	99	112,5	0,88
9	76	27,25	103,5	100,5	1,03
10	99,7	28,51	110	114	0,96
11	88,8	34,26	110	114	0,96
12	100	35,86	114	115	0,99
13	67	27,33	95	103	0,92
14	65	26,20	87	102	0,85

Tabela B2: Características antropométricas do grupo controle (n=15).

N	Peso (kg)	IMC (kg/m ²)	C.A. (cm)	C.Q. (cm)	RCQ
1	80,8	27,31	97	110	0,88
2	81,1	27,10	67	102	0,66
3	95,8	31,28	110,5	113,5	0,97
4	75,1	27,42	93,5	102	0,92
5	64,6	25,08	89,5	107	0,84
6	78,6	25,09	85	99	0,86
7	82	29,05	94,5	115	0,82
8	73,8	30,33	109	112	0,97
9	74,7	25,19	91,5	96,5	0,95
10	63,7	23,68	82,5	98	0,84
11	88,3	30,92	106	102	1,04
12	67,9	29,01	90	105	0,86
13	69,7	23,84	89	107,5	0,83
14	80,4	30,64	119	110	1,08
15	71,4	29,34	96,5	107	0,90

Anexo C: Exames laboratoriais dos grupos IG e controle

Tabela C1: Perfil lipídico e de apolipoproteínas do grupo IG (n=14).

N	CT	LDL-C	HDL-C	TG	VLDL-C	TG/ HDL	Col ã- HDL	Apo A1	Apo B	Apo E
1	176	99	64	63	13	0,98	112	151,6	72,6	4,7
2	223	152	35	182	36	5,20	188	114,7	110,4	5,8
3	203	90	96	83	17	0,86	107	192,5	67,3	7,7
4	225	121	81	113	23	1,40	144	183,3	87,6	5,7
5	210	134	43	164	33	3,81	167	137,1	105,8	6,4
6	229	156	47	132	26	2,81	182	141,3	135,9	4,8
7	239	155	52	158	32	3,04	187	152,6	117,3	5,8
8	153	84	46	116	23	2,52	107	141,2	76,0	4,3
9	238	157	47	172	34	3,66	191	153,3	142,5	5,7
10	173	114	32	135	27	4,22	141	102,2	94,4	3,8
11	189	106	59	120	24	2,03	130	151,2	92,3	2,7
12	202	120	43	195	39	4,53	159	135,3	123,7	5,3
13	184	105	66	67	13	1,02	118	174,9	74,6	3,8
14	198	101	67	148	30	2,21	131	211,2	88,5	4,9

Dados expressos em mg/dL.

Tabela C2: Perfil glicêmico do grupo IG (n=14).

N	Glicemia de jejum (mg/dL)	Glicemia de 2 horas (mg/dL)	HbA1C (%)
1	96	167	5,6
2	102	147	5,8
3	116	163	6,7
4	91	153	6,3
5	101	161	5,9
6	108	177	6,2
7	115	175	6,3
8	113	166	4,9
9	85	183	5,6
10	107	163	7,1
11	110	144	6,7
12	100	160	6,4
13	102	141	6,0
14	89	180	6,0

Tabela C3: Perfil lipídico e de apolipoproteínas do grupo controle (n=15).

N	CT	LDL-C	HDL-C	TG	VLDL-C	TG/ HDL	Col ñ- HDL	Apo A1	Apo B	Apo E
1	231	106	95	148	30	1,56	136	229,7	87,4	6,3
2	199	114	60	126	25	2,10	139	160,4	86,3	3,6
3	170	111	39	102	20	2,62	131	111,6	86,5	2,8
4	218	98	109	53	11	0,49	109	206,4	70,9	4,6
5	159	110	35	69	14	1,97	124	107,4	74,4	2,4
6	183	121	46	81	16	1,76	137	115,1	83,2	3,2
7	133	62	35	179	36	5,11	98	131,1	82,5	3,1
8	176	102	49	124	25	2,53	127	140,2	73,9	3,1
9	199	118	62	96	19	1,55	137	185,7	99,2	3,4
10	165	89	56	102	20	1,82	109	149,5	62,1	6,6
11	207	131	60	79	16	1,32	147	168,0	98,6	5,1
12	217	152	41	119	24	2,90	176	116,1	127,5	3,1
13	224	130	56	190	38	3,39	168	148	111,4	5,2
14	215	145	41	146	29	3,56	174	143,5	112,2	5,5
15	201	128	50	114	23	2,28	151	150,4	113,6	4,8

Dados expressos em mg/dL.

Tabela C4: Perfil glicêmico do grupo controle (n=15).

N	Glicemia de jejum (mg/dL)	Glicemia de 2 horas (mg/dL)	HbA1C (%)
1	95	108	6,2
2	85	92	5,7
3	85	68	5,2
4	94	99	5,4
5	82	97	5,6
6	79	70	5,6
7	90	128	4,7
8	96	128	5,7
9	81	126	6,0
10	79	98	6,2
11	91	109	6,0
12	85	98	5,9
13	94	128	5,7
14	90	119	5,8
15	91	130	5,5

Anexo D: Dados da homeostase glicêmica dos grupos IG e controle

Tabela D1: Valores de insulina, HOMA2 % β , HOMA2 %S e HOMA2-IR no grupo IG (n=14).

N	HOMA2 % β	HOMA2 %S	HOMA2-IR	Insulina (μ U/mL)
1	133,5	74,2	1,3	10,6
2	98,3	63,6	1,6	11,8
3	56,0	170,2	0,6	4,4
4	154,5	56,3	1,8	14,0
5	154,1	41,8	2,4	18,5
6	119,6	53,6	1,9	14,2
7	92,5	54,0	1,9	13,7
8	100	82,2	1,2	9,3
9	111,7	163,1	0,6	5,0
10	134,2	32,8	3,1	23,3
11	116,6	52,6	1,9	14,4
12	107,7	62,1	1,6	12,2
13	71,6	125,9	0,8	6,0
14	117,2	88,0	1,1	8,9

Tabela D2: Valores de insulina, HOMA2 % β , HOMA2 %S e HOMA2-IR no grupo controle (n=15).

N	HOMA2 % β	HOMA2 %S	HOMA2-IR	Insulina (μ U/mL)
1	68,4	143,1	0,7	5,3
2	103,9	107,1	0,9	7,3
3	112,3	109,9	0,9	7,2
4	103,7	123,6	0,8	6,4
5	118,7	137,3	0,7	5,9
6	90,1	176,9	0,6	4,5
7	86,4	131,3	0,8	5,9
8	197,6	45,1	2,2	17,8
9	83	331,6	0,3	2,5
10	58,5	269,4	0,4	2,9
11	84,1	112,5	0,9	6,8
12	145,6	75,1	1,3	10,6
13	74,6	164,7	0,6	4,7
14	111,5	96,6	1,0	8,1
15	105,3	72,0	1,4	10,6

Anexo E: Distribuição da adiposidade abdominal dos grupos IG e controle

Tabela E1: Distribuição da adiposidade abdominal no grupo IG (n=14).

N	A-GT (cm ²)	A-VIS (cm ²)	A-SUB (cm ²)	R V/S
1	321,5	82,55	238,94	0,34
2	479,4	132,5	346,92	0,38
3	193,0	74,9	118,1	0,63
4	649,5	227,48	421,97	0,53
5	501,7	169,9	331,8	0,51
6	317,7	164,1	207,6	0,79
7	565,8	138,0	427,8	0,32
8	609,5	148,08	461,46	0,32
9	408,2	182,06	226,09	0,80
10	502,5	309,1	193,44	1,59
11	483,8	177,05	306,76	0,57
12	761,6	364,94	396,65	0,92
13	413,9	93,6	320,3	0,29
14	390,8	137,7	253,1	0,54

Tabela E2: Distribuição da adiposidade abdominal no grupo controle (n=14).

N	A-GT (cm ²)	A-VIS (cm ²)	A-SUB (cm ²)	R V/S
1	289,7	126,04	163,61	0,77
2	327,6	132,52	195,05	0,67
3	459,0	105,5	353,5	0,29
4	407,5	101,06	306,39	0,32
5	367,3	120,12	247,16	0,48
6	255,6	113,48	142,07	0,79
7	376,1	119,3	256,75	0,46
8	484,9	194,84	290,1	0,67
9	404,4	239,27	165,11	1,44
10	217,6	85,89	131,74	0,65
11	438,0	213,21	224,75	0,94
12	465,1	133,7	331,4	0,40
13	561,0	208,2	352,8	0,59
14	494,1	129,0	365,1	0,35

Anexo F: Termo de consentimento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Cinética plasmática do colesterol livre e do colesterol esterificado e transferência *in vitro* de lípidos para a HDL, utilizando uma nanoemulsão lipídica artificial, em indivíduos com intolerância à glicose.

PESQUISADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Lerario

CARGO/FUNÇÃO: Médico assistente.

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 13821

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Endocrinologia – Equipe Médica de Diabetes

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : Três anos (para o pesquisador)

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO

Indivíduos com glicemia pós-prandial elevada apresentam um alto risco para desenvolver a doença cardiovascular – infarto, angina, derrame. Inicialmente, iremos avaliar em pacientes com intolerância à glicose (pré-diabetes) aparentemente sem sintomas de dor no peito, angina e infarto prévio, a presença de alterações em vasos do coração que possam aumentar o risco de ter um infarto, mesmo sem sentir nada previamente por meio de um exame de eletrocardiograma de esforço, chamado de teste ergométrico.

Sabe-se também que pacientes hipertensos, com excesso de peso e mesmo com alterações discretas nas gorduras no sangue (colesterol, triglicérides) também possuem risco aumentado para infarto. Por isso, vamos avaliar o comportamento do colesterol no sangue dos pacientes para verificar se existe ou não alguma alteração relacionada com o comprometimento dos vasos do coração que leve-o a desenvolver alguma doença cardiovascular.

O excesso de peso e a obesidade é um importante fator que contribui para o surgimento de gorduras elevadas no sangue e de doenças como hipertensão arterial, infarto, angina, derrame, dentre outras. Portanto, iremos avaliar a composição corporal (quantidade de gordura, água, massa magra) dos pacientes e relacioná-la com o risco de desenvolver essas doenças. Para isso, serão tomadas algumas medidas do paciente (peso, altura, calculado IMC, circunferência abdominal e circunferência do quadril); será realizado exame de tomografia de abdômen sem contraste que consiste em um exame de raio x para medir o tecido gorduroso do corpo e, a partir daí, relacionar com o risco de desenvolver doenças. Este último exame é realizado no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas.

Para participar da pesquisa, será necessário que o senhor (a) compareça em algumas consultas clínicas. Na primeira consulta, iremos conversar sobre seu estado geral (uso de medicação, exames) e um médico será responsável por checar os sintomas que possam sugerir angina ou infarto. Avaliaremos também a pressão arterial e as gorduras do sangue. Serão tomadas as medidas de circunferência do seu corpo, bem como peso e altura. Nas demais consultas serão realizadas coleta de sangue para análise da glicose, das gorduras do sangue, dos hormônios da tireóide e dos rins. E serão ainda agendadas outras consultas para a realização do exame de eletrocardiograma de esforço (teste ergométrico) e da tomografia de abdômen.

O senhor (a) será submetido a um eletrocardiograma de esforço, no setor específico do InCor, exame este seguro, que determina se há ou não alteração dos vasos do coração. Esse exame é de fácil realização e necessita de uma visita a ser agendada com duração média de 1 hora. A realização do eletrocardiograma de esforço nos dá benefício de detectar alguma alteração nos batimentos do coração (arritmias) prever uma possível doença arterial coronariana, e desta forma orientar para tratamento adequado. O exame é realizado em esteira rolante em que o paciente é orientado a caminhar lentamente sobre ela no início e conforme o tempo passa, a velocidade da esteira vai aumentando gradativamente, sempre respeitando os limites e as condições de preparo físico de cada paciente. A todo tempo, são medidos e acompanhados os batimentos cardíacos, a pressão arterial e a frequência cardíaca do paciente durante a realização do exercício por médico especializado e preparado a realizar tal exame.

Em seguida, o senhor (a) será submetido à avaliação do comportamento do colesterol no sangue. Para tal avaliação, também será agendado um dia previamente, no qual o senhor (a) ficará por 12 horas no hospital. Para este exame, será necessário a cateterização de um vaso em antebraço que é semelhante uma coleta de sangue simples para ser injetada uma solução contendo microemulsão de colesterol ou nanoemulsão marcada com radioisótopo.

A nanoemulsão é fabricada no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração (InCor) – HC FMUSP, e é semelhante ao colesterol existente no nosso organismo - o LDL. O estudo de colesterol com a nanoemulsão é baseado em protocolo já realizado em pesquisa clínica, é uma técnica segura e sem complicações. Esta injeção não causa nenhum efeito colateral ou alérgico e já foi testada em várias pessoas antes e em vários outros estudos.

Em seguida, através do cateter do braço coletamos amostras de cerca de 5 mL de sangue em 8 momentos pré-estabelecidos, para análise de alguns dados laboratoriais, principalmente referentes ao processamento do colesterol no organismo. Em outros estudos desenvolvidos, esta substância não trouxe qualquer problema para o paciente. Vale salientar que a nanoemulsão não é um medicamento e, por isso, ela só tem fins diagnósticos.

O radioisótopo da nanoemulsão possui baixa radioatividade, menor do que um raio X comum de tórax, por exemplo e, dessa forma, não implica em qualquer risco de radiação ao paciente. A coleta sanguínea e a injeção intravenosa podem causar um pequeno hematoma no local da punção, de modo semelhante ao que pode ocorrer com qualquer punção para coleta de exames sanguíneos comuns. Este pequeno hematoma se desfaz naturalmente em poucos dias.

Com os dados conseguidos com esta pesquisa, teremos informações da condição de funcionamento do coração e do comportamento do colesterol em seu organismo, bem como da composição do seu corpo em massa gorda e massa magra, o que podem contribuir para uma melhor abordagem no seu tratamento, o que inclui avaliação da sua glicemia, pressão arterial, colesterol plasmático e demais fatores de risco para a doença arterial coronariana (angina e/ou infarto).

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO

O senhor (a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, a fim de diminuir eventuais dúvidas que possam surgir no decorrer do estudo.

O senhor (a) tem liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do mesmo estudo a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade da assistência médica já efetuada na rotina dos serviços a qual ele freqüenta, nesta instituição.

Para aqueles que participarem do estudo está garantido a confidencialidade, o sigilo e privacidade, dos exames realizados, bem como futuros diagnósticos decorrentes do estudo, e/ou complicações.

O serviço da disciplina de Endocrinologia - Unidade de Diabetes, bem como o de Eletrocardiograma do InCor, de Radiologia do Hospital das Clínicas e o Laboratório de Metabolismo de Lípidos do InCor, garantem a disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Antonio Carlos Lerario

Pesquisador Executante: Marina da Paz Bertato

Endereço:

Instituto do Coração (InCor)

Av Dr. Enéas de Carvalho, 44 - telefone 3069-5108/ 3069-5927

Cep: 05403000 - SÃO PAULO-SP

VI - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

O participante da pesquisa deverá comparecer ao serviço, em datas previamente agendadas, para entrevista e acompanhamento clínico com o pesquisador, sendo fundamental tal comparecimento para seguimento da pesquisa.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 200..... .

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathophysiology of prediabetes. *Curr Diab Rep.* 2009;9(3):193-9.
- ACCORD Study Group. Action to control cardiovascular risk in diabetes study group. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;358:2545-2559.
- Adeli K, Taghibiglou C, Iderstine SCV, Lewis GF. Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance. *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11(5):170-76.
- Adiels M, Boren J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, et al. Overproduction of VLDL₁ driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1697–1703.
- ADVANCE Collaborative Group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;358:2560-2572.
- Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes.* 2003;52:1210-4.
- Altman PL, Dittmer DS. Biology Data Book. In: Altman PL, Dittmer DS. (eds). *Fed Amer Soc Exp Biol*, Vol.III, Bethesda, Maryland, USA.1974.
- Altomonte J, Cong L, Harbaran S, et al. Foxo 1 mediates insulin action on apo C-III and triglyceride metabolism. *J Clin Invest.* 2004;114:1493-503.
- American Diabetes Association (ADA): Standards of medical care in diabetes. (Position Statement). *Diabetes Care.* 2008;31(supl.1):S55-60.
- Arteaga LA, Pollak F, Robres L, Velasco N. Clinical and metabolic features of subjects with glucose intolerance and high fasting glucose levels. *Rev Med Chil.* 2009;137(2):193-9.
- Asakawa H, Tokunaga K, Kawakami F. Relationship of abdominal fat with metabolic disorders in diabetes mellitus patients. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2002;55:139-49.
- Assmann G, Gotto AMJ. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation.* 2004. 109:III8-III14.
- Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistance states. *Clinica Chimica Acta.* 2006;368:1-19.
- Bach-Ngohou K, Ouguerram K, Nazih H, Maugère P, Ripolles-Piquer B, Zaïr Y, Frénais R, Krempf M, Bard JM. Apolipoprotein E kinetics: influence of insulin resistance and type 2 diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(11):1451-8.
- Bagdade JD, Kelley DE, Henry RR, Eckel RH, Ritter MC. Effects of multiple daily insulin injections and intraperitoneal insulin therapy on cholesteryl

- ester transfer and lipoprotein lipases activities in NIDDM. *Diabetes*. 1997; 46:414 – 420.
- Balkau B, Forhan A, Eschwege E. Two hour plasma glucose is not unequivocally predictive for early death in men with impaired fasting glucose: more results from the Paris Prospective Study. *Diabetologia*. 2002; 45:1224–1230.
- Barter P; Kastelein J, Nunn A, Hobbs R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis, the unanswered questions. *Atherosclerosis*. 2003; 168:195-211.
- Bhatnagar D, Durrington PN, Kumar S, Mackness MI, Boulton AJM. Plasma lipoprotein composition and cholesterol ester transfer from high density to very low density lipoproteins in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1996;13:139-44.
- Bjorkegren J, Packard CJ, Hamsten A. et al. Accumulation of large very low density lipoprotein in plasma during intravenous infusion of a chylomicron-like triglyceride emulsion reflects competition for a common lipolytic pathway. *J Lipid Res*. 1996;37:76-86.
- Bonora E, Muggeo M. Postprandial blood glucose as a risk factor for cardiovascular disease in type II diabetes: the epidemiological evidence. *Diabetologia*. 2001;44:2107-14.
- Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin: cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest*. 2003; 33:1051–69.
- Borkan GA, Gerzoi SG, Robbins AH, Hulst DE, Silbert CK, Silbert JE. Assessment of abdominal fat content by computed tomography. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1982;36:172-7.
- Boxenbaum H, Ronfeld R. Interspecies pharmacokinetic scaling and the Dedrick plots. *Am J Physiol*. 1983;245:R768-775.
- Bray GA. Complications of obesity. *Ann Intern Med*. 1985. 103: 1052-1062.
- Bruce C, Chouinard RA, Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr*. 1998; 18:297-330.
- Castelli WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease – The Framingham Heart Study. *Can J Cardiol*. 1988;4 Suppl A:5A-10A.
- Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:816-23.
- Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2006;35:491-510.
- Chan DC, Barret PH, Watts GF. Recent studies of lipoprotein kinetics in the metabolic syndrome and related disorders. *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17(1):28-36.

- Chan DC, Watts GF, Ng TWK, Uchida Y, Sakai N, Yamashita S, Barret PHR. Apolipoprotein B-100 kinetics and static plasma indices of triglyceride-rich lipoprotein metabolism in overweight men. *Clinical Biochemistry*. 2005; 38:806 – 812.
- Chan DC, Watts GF, Redgrave TG, Mori TA, Barrett PHR. Apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity: associations with plasma apolipoprotein C-III concentration. *Metabolism*. 2002;51(8):1041-46.
- Cohn JS, Patterson BW, Uffelman KD, Davignon J, Steiner G. Rate of production of plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of production of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:3949-55.
- Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) – Diretrizes básicas de radioproteção. São Paulo: [Norma 3.01]; 1988.
- Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events: a metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care*. 1999;22:233–240.
- Couto RD, Dallan LAO, Lisboa LAF, Mesquita CH, Vinagre CGCM, Maranhão RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. *Lipids*. 2007;42:411-418.
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright Jr. RW, Jiang Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *Int J Biol Sci*. 2009;5(5):474-88.
- DCCT. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Influence of intensive diabetes treatment on body weight and composition of adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2001;24:1711-21.
- De Vegt F, Dekker JM, Jager A, et al. Relations of impaired fasting and postload glucose with incident type 2 diabetes in a Dutch populations: the Hoorn Study. *JAMA*. 2001;285:2109-2113.
- De Vries R, Borggreve SE, Dullaart RP. Role of lipases, lecithin cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in abnormal high density lipoprotein metabolism in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab*. 2003;49(11-12): 601-13.
- DECODE Study Group, the European Diabetes Epidemiology Group. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med*. 2001;161(3):397-405.
- Després JP, Nadeau A, Tremblay A, Ferland M, Moorjani S, Lupien PJ, Thériault G, Pinault S, Bouchard C. Role of deep abdominal fat in the association between regional adipose tissue distribution and glucose tolerance in obese women. *Diabetes*. 1989;38:304-9.

- Després JP. Visceral obesity and dyslipidemia: contribution of insulin resistance and genetic susceptibility. In: Angel A, Anderson H, Bouchard C, Lau D, Leiter L, Mendelson R. Progress in obesity research: Proceeding of the Seventh International Congress on Obesity (Toronto, Canada, August 20-25, 1994). John Libbey e Company, London. 1996; 7:525-32.
- Dobiasova M, Frohlich J. Understanding the mechanism of LCAT reaction may help to explain the high predictive value of LDL/HDL cholesterol ratio. *Physiol Res*. 1998;47:387–397
- Dullaart RP, De Vries RP, Scheek L, Borggreve S, et al. Type 2 diabetes mellitus is associated with differential effects on plasma cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein activities and concentrations. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64(3):205-15.
- Duvillard L, Pont F, Florentin E, Gambert P, Vergés B. Inefficiency of insulin therapy to correct apolipoprotein A-I metabolic abnormalities in non insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2000;152:229–237.
- Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 1984;25(10):1017-58.
- Eschwége E, Richard JL, Thibult N, et al. Coronary heart disease mortality in relation with diabetes, blood glucose and plasma insulin levels. The Paris Prospective Study, ten years later. *Horm Metab Res*. 1995;17 (Suppl):41-6.
- Faerch K, Borch-Johnsen K, Holst JJ, Vaag A. Pathophysiology and aetiology of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance: does it matter for prevention and treatment of type 2 diabetes? *Diabetologia*. 2009;52:1714-1723.
- Fang J, Alderman MH. Impact of the increasing burden of diabetes on acute myocardial infarction in New York City: 1990-2000. *Diabetes*. 2006;55:768-773.
- Ferrera CP, Jarrouge MG, Domingos MD, Tonussi M, Martin NF. Metabolismo de Lipídeos. Bioquímica Básica. 3ª ed. p. 81- 95; 1999.
- Festa A. Small, dense low density lipoprotein (LDL) and the insulin resistance syndrome (IRS). *Clin Lab*. 2001;47:111-8.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.
- Fontbonne A, Eschwege E, Cambien F, Richard JL, Ducimetiere P, Thibult N, Warnet JM, Claude JR, Rosselin GE. Hypertriglyceridemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. Results from the 11-year follow-up of the Paris Prospective Study. *Diabetologia*. 1989;32(5):300-4.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third national health and nutrition examination survey. *JAMA*. 2002;287:356–359.

- Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care*. 2005;28:1769–1778.
- Franklin GM, Kahn LB, Bender J, Marshall JA, Hamman RF: Sensory neuropathy in non-insulin-dependent diabetes *mellitus*. The San Luis Valley Diabetes Study. *Am J Epidemiol*. 1990;131:633-43.
- Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K, Tarui S. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism*. 1987;36:54-9.
- Fuller JH, Shipley MJ, Rose G, Jarret RJ, Keen H. Coronary heart disease risk and impaired glucose tolerance. The Whitehall study. *Lancet*. 1980;28;1(8183):1376-6.
- Ganong WF. Fsiologia Médica. 5ª ed: Editora Atheneu. p. 255-63;1989.
- Garret RH, Grisham CM. Biochemistry. Florida: Saunder College Publishing; 1995.
- Gerich JE. Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia. *Arch Intern Med*. 2003;163:1306-1316.
- Ginsberg HN, Huang LS. The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk*. 2000;7: 325-31.
- Ginsberg HN, Zhang Y, Hernandez-Ono A. Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity*. 2006;Suppl 14: 41S-49S.
- Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest*. 2000;106:453-8.
- Ginsberg HN. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states: relationship to atherogenesis. *Diabetes Care*. 1991;14:839-55.
- Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipds and cholesterol esters. Protein free models of low density lipoprotein. *J Bio Chem*. 1982;257:8216-8227.
- Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand*. 2005;183:13-30.
- Gjone E. Familial lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1983;18:423-31.
- Glomset JA. Physiological role of lecithin-cholesterol acyltransferase. *Am J Clin Nutr*. 1970;23:1129-36.
- Glomset JA. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968;9:155–162.
- 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.

- Golay A, Zech L, Shi MZ. et al. High density lipoprotein (HDL) metabolism in non insulin dependent diabetes mellitus: measurement of HDL turn-over using tritiated HDL. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;65:512–518.
- Goldstein BJ. Insulin resistance :from benign to type 2 diabetes mellitus. *Rev Cardiovasc Med.* 2003;90:30-47i.
- Guérin M, le Goff W, Lassel TS, van Tol A, Steiner G, Chapman MJ. Proatherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL1 and dense LDL in type 2 diabetes. Impact of the degree of triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:282–8.
- Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. *Curr Diab Rep.* 2009;9(1):26-32.
- Gylling H, Miettinen TA. Cholesterol absorption synthesis and LDL metabolism in NIDDM. *Diabetes Care.* 1997;20(1):90-95.
- Haffner SM, Mykkaenen I, Festa A, Burke JP, Stern MP. Insulin resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects. *Circulation.* 2000;101:975-80.
- Haffner SM. Lipoprotein disorders associated with type 2 diabetes *mellitus* and insulin resistance. *Am J Cardiol.* 2002;90 (Suppl):55i-61i.
- Haffner, SM, D'agostino Jr R, Festa, A, Bergman, RN, Anen, LM, Karter, A, Saad, MF, Wagenknecht, LE. Low insulin sensitivity ($S_i = 0$) in diabetic and nondiabetic subjects in the insulin resistance atherosclerosis study: Is it associated with components of the metabolic syndrome and nontraditional risk factors? *Diabetes Care.* 2003;26(10):2796-2803.
- Hanak V, Munoz J, Teague J, Stanley AJ, Bittner V. Accuracy of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio for prediction of the low-density lipoprotein phenotype B. *Am J Cardiol.* 2004;94:219-222.
- Hansson GK, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-95.
- Harmelen VV, Reynisdottir S, Eriksson P, Thörne A, Hoffstedt J, Lönnqvist F, et al. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes.* 1998;47:913-7.
- Havel RJ. The formation of HDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res.* 1984;25:1570-76.
- Heymsfield SB. Development of imaging methods to assess adiposity and metabolism. *International Journal of Obesity.* 2008;32:S76-S82.
- Hirata RDC, 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;1437:53-62.
- Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359:1577-1589.

- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
- Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes *mellitus*. *J Lipid Res*. 1997; 28:613-628.
- Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*. 2001;155:269-81.
- II Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Teste Ergométrico. *Arq Bras Cardiol*. 2002;78(Suppl 2):1-18.
- International Diabetes Federation. IDF. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059-62.
- Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001;24:683-9.
- Jin W, Marchadier D, Rader DJ. Lipases and HDL metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13:174-178.
- Jones RJ, Owens D, Brennan C, Collins PB, Johnson AH, Tomkin GH. Increased esterification of cholesterol and transfer of cholesteryl ester to apo B-containing lipoproteins in type 2 diabetes: relationship to serum lipoproteins A-I and A-II. *Atherosclerosis*. 1996;119:151-7.
- Julius U, Dittrich M, Pietzsch J. Factors influencing the formation of small dense low-density lipoprotein particles in dependence on the presence of the metabolic syndrome and on the degree of glucose intolerance. *Int J Clin Pract*. 2007a;61(11):1798-1804.
- Julius U, Jauhiainen M, Ehnholm C, Pietzsch J. Lipid transfer protein activities in subjects with impaired glucose tolerance. *Clin Chem Lab Med*. 2007b;45(2):237-43.
- Juutilainen A, Kortelainen S, Lehto S, et al. Gender difference in the impact of type 2 diabetes on coronary heart disease risk. *Diabetes Care*. 2004;27(12):2898-904.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444:840-46.
- Kissebah AH. Low density lipoprotein metabolism in non-insulin dependent diabetes *mellitus*. *Diabetes Metabolism Reviews*. 1987;3:619-651.
- Koba S, Hirano T, Ito Y et al. Significance of small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations in relation to the severity of coronary heart diseases. *Atherosclerosis*. 2006;189:206-14.
- Kreisberg RA. Diabetic dyslipidemia. *Am J Cardiol*. 1998;82:67U-73U.
- Kuller LH, Velentgas P, Barzilay J, Beauchamp NJ, O'Leary DH, Savage PJ. Diabetes *mellitus*: subclinical cardiovascular disease and risk of incident cardiovascular disease and all-cause mortality. *Arterioscler Thrombo Vasc Biol*. 2000;20:823-29.

- Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ, Cantin B, Bernard PM, Dagenais GR, et al. Apolipoprotein A-I and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five year follow-up of men in the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation*. 1996;94(3):273-8.
- Lerario AC, Coretti FMLM, Oliveira SF, Betti RTB, Ferri LAF, Garcia RMR, Wajchenberg BL. Avaliação da prevalência do diabetes e da hiperglicemia de estresse no infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52/3:465-472.
- Levitan EB, Song Y, Ford ES, Liu S. Is non-diabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease? A meta-analysis of prospective studies. *Arch Intern Med*. 2004;164:2147–2155.
- Lo Prete AC, Dina CH, Azevedo CH, Puk CG, Lopes NH, Hueb WA, Maranhão RC: In vitro simultaneous transfer of lipids to HDL in coronary artery disease and in statin treatment. *Lipids*. 2009;44:917-924.
- Lottenberg SA, Lottenberg AMP, Nunes VS, McPherson R, Quintao ECR. Plasma cholesteryl ester transfer protein concentration, high-density lipoprotein cholesterol esterification and transfer rates to lighter density lipoproteins in the fasting state and after a test meal are similar in type II diabetics and normal controls. *Atherosclerosis*. 1996;127:81–90.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.
- Maciel RMB, Mendonça RB, Saad MJA. Endocrinologia. capítulo 7: Editora Atheneu; 2007.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura L, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*. 1997;190:227-32.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Farese RV. Disorders of lipid metabolism. In: Williams textbook of endocrinology, 10th edition. New York: Elsevier Science; 2003.
- Maranhão RC, Cesar TB, Pedrosa-Mariani S, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a non-protein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*. 1993;28:691-6.
- Maranhão RC, Garicochea B, Silva EL, Dorlhiac-Llacer P, Cadena, SM, Coelho IJ, Meneghetti JC, Pileggi FJ, Charmone DA. Plasma kinetics and biodistribution of a lipid emulsion resembling low-density lipoprotein in patients with acute leukemia. *Cancer Res*. 1994;54:4660-66.
- Maranhão RC, Quintão ECR. Long term steroid metabolism balance studies in subjects on cholesterol-rich diets: comparison between normal and hypercholesterolemic individuals. *J Lipid Res*. 1983;24:167-73.
- Maranhão RC, Roland IA, Toffoletto O, Ramires JA, Gonçalves RP, Mesquita CH, Pileggi F. Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors. *Lipids*. 1997;32:627-33.

- Marcel, YL, Vezina C, Teng B, Sniderman A. Transfer of cholesterol esters between human high density lipoproteins and triglyceride-rich lipoproteins controlled by a plasma protein factor. *Atherosclerosis*. 1980;35:127-33.
- Masson D, Jiang XC, Lagrost L, Tall AR. The role of plasma lipid transfer proteins in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research*. 2009;Suppl: S201-S206.
- Matsuzawa Y, Fujioka S, Tokunaga K, Tarui S. A novel classification: visceral fat obesity and subcutaneous fat obesity. In: Berry EM. ed. Recent advances in obesity research V. Londres:John Libbey; 1987;92-96.
- Matsuzawa Y. The role of fat topology in the risk of disease. *International Journal of Obesity*. 2008;32:S83-S92.
- Matthews, DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-9.
- Meigs JB, Nathan DM, D'Agostino RB Sr, Williams PW. Fasting and post-challenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 2002;25:1845–1850.
- Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res*. 2002;43:1997-2006.
- Mesquita CH. Cinética da LDL marcada com ^3H -CL e ^{14}C -CE. Análise compartimental auxiliar. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). [Publicações IPEN]; 1994.
- Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes*. 1998;22:1145-58.
- Mori Y, Hoshino K, Yokota K, Yokose T, Tajima N. Increased visceral fat and impaired glucose tolerance predict the increased risk of metabolic syndrome in Japanese middle-aged men. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005;113(6):334-9.
- Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*; 2001;44 (suppl. 2):S14-S21.
- Nagaretani H, Nakamura T, Funahashi T, Kotani K, Miyanaga M, Tokunaga K, Takahashi M, Nishizawa H, Kishida K, Kuriyama H, Hotta K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Visceral fat is a major contributor for multiple risk factor clustering in Japanese men with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*. 2001;24(12):2127-33.
- Nathan DM, Davidson MB, De Fronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, Zinman B. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance implications for care. *Diabetes Care*. 2007;30 (3):753-57.
- Nordestgaard BG, Nielsen LB. Atherosclerosis and arterial influx of lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5:252-57.
- Nóvoa FJ, Boronat M, Saavedra P, D'íaz-Cremades JM, Varillas VF, La Roche F, Alberiche MP, Carrillo A. Differences in cardiovascular risk

- factors, insulin resistance, and insulin secretion in individuals with normal glucose tolerance and in subjects with impaired glucose regulation. *Diabetes Care*. 2005;28(10):2388-93.
- Oram JF. The cholesterol mobilizing transporter ABCA1 as a new therapeutic target for cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:170-175.
- Organização Mundial da Saúde (WHO/OMS). World Health Organization. Report of a WHO Consultation on Obesity. Obesity, Preventing and Management the Global Epidemic: Geneva; 1997.
- Packard CJ. Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:1066-9.
- Parhofer KG, Barrett PHR. What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies. *J Lipid Res*. 2006;47:1620-1630.
- Patsch J. Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels. *Eur Heart J*. 1998;19 (Suppl H):H2-H6.
- Peiris AN, Sothmann MS, Hoffmann RG, Hennes MI, Wilson CR, Gustafson AB, Kissebah AH. Adiposity, fat distribution, and cardiovascular risk. *Annals of Internal Medicine*. 1989;110:867-72.
- Pietzsch J, Fuecker K. Increased cholesteryl ester transfer protein activity in impaired glucose tolerance: relationship to high density lipoprotein metabolism. *Croat Med J*. 2003;44(2):171-7.
- Pietzsch J, Julius U, Hanefeld M. Metabolic basis of low high density lipoprotein in subjects with impaired glucose tolerance. *Annals New York Academy of Sciences*. 1999a;323-26.
- Pietzsch J, Julius U, Kirck C, Fisher S, Hanefeld M. Very low density lipoprotein overproduction is maximally expressed in early insulin resistant states. *Annals New York Academy of Sciences*. 1999b;319-22.
- Pietzsch J, Julius U, Nitzsche S, Hanefeld M. In vivo evidence for increased apolipoprotein A-I catabolism in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes*. 1998;47(12):1928-34.
- Pont F, Duvillard L, Florentin E, Gambert P, Vergés B. Early kinetic abnormalities of apo B-containing lipoproteins in insulin-resistance women with abdominal obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:1726-32.
- Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. 2007;21(12):1443–1455.
- Qian L, Xu L, Wang X, Fu X, Gu Y, Lin F, Peng Y, Li G, Luo M. Early insulin secretion failure leads to diabetes in chinese subjects with impaired glucose regulation. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;25:144–149.
- Qiao Q, Nakagami T, Tuomilehto J, Borch-Johnsen K, Balkau B, Iwamoto Y, Tajima N. and The DECODE Study Group on behalf of the International Diabetes Epidemiology Group. Comparison of the fasting and the 2-h

- glucose criteria for diabetes in different Asian cohorts. *Diabetologia*. 2000; 43(12):1470-75.
- Rajala MW, Scherer PE. Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Neuroendocrinol*. 2003;144(9):3765-73.
- Reaven GM, Hollenbeck CB, Chen YDI. Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. *Diabetologia*. 1989;32:52-55.
- Reaven GM. Compensatory hyperinsulinemia and the development of an atherogenic lipoprotein profile: the price paid to maintain glucose homeostasis in insulin-resistance individuals. *Endocrinol Metabol Clin N Am*. 2005;34:49-62.
- Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37:1595-607.
- Reaven GM. The role of insulin resistance in human disease (Syndrome X): expand deffinition. *Ann Rev Med*. 1993;14:121-131.
- Ribeiro Filho FF, Mariosa LS, Ferreira SRG, Zanella MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(2):230-238.
- Riches FM, Watts GF, Naoumova RP, Kelly JM, Croft KD, Thompson GR. Hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 studied with a stable isotope technique in men with visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998;22(5):414-23.
- Riemens SC, Van Tol A, Sluiter W, Dullaart RPF. Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM. Relationships with apolipoprotein B-containing lipoproteins and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis*. 1998;140:71-9.
- Rocha MS. Contribuição da tomografia computadorizada ao estudo da distribuição de gordura abdominal em mulheres obesas. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina. Patologia; 1993.
- Rosamond WD, Chambless LE, Folsom AR, Cooper LS, Conwill DE, Clegg L, Wang CH, Heiss G. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. *N Engl J Med*. 1998;339:861-867.
- Rosner B. Fundamentals of Biostatistics. Second edition: Boston, PWS Publishers; 1986.
- Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*. 1999;340:115-26.
- Santos RD, Hueb W, Oliveira AA, Ramires JAF, Maranhão RC. Plasma kinetics of cholesterol-rich emulsions in subjects with or without coronary artery disease. *Journal of Lipid Research*. 2003;44:464-69.
- Saydah SH, Loria CM, Eberhardt MS, Brancati FL. Subclinical states of glucose intolerance and risk of death in the U.S. *Diabetes Care*. 2001;24:447-453.

- Schmidt MI, Duncan BB, Bang H, et al. Identifying individuals at high risk for diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Care*. 2005;28:2013-8.
- Sharret AR, Ballantyne CM, Coady AS, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, et al. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein (a), apolipoprotein A-I and B, and HDL subfractions. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2001;104 (10):1108-13.
- Shaw JE, Zimmet PZ, De Courten M, et al. Impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance: what best predicts future diabetes in Mauritius? *Diabetes Care*. 1999;22:399-402.
- Singleton JR, Smith AG, Russel JW, Feldman EL. Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes*; 2003;52:2867-73.
- Smith EM. Dose estimate techniques. In: Nuclear medicine physics, instrumentation and agents: Mosby; 1977.
- Sowby FS. Radiation Protection. ICRP publication 30. Part I. LIMITS FOR INTAKES OF RADIONUCLIDES BY WORKERS. In: SOWBY FS. England: ed. Pergamon, Oxford; 1984.
- St. Pierre AC, Cantin B, Dagenais G, Després JP, Lamarche B. Apolipoprotein B, low-density lipoprotein cholesterol, and the long-term risk of coronary heart disease in men. *Am J Cardiol*. 2006;97(7):997-1001.
- Stern MP, Fatehi P, Williams K, Haffner SM. Predicting future cardiovascular disease: do we need the oral glucose tolerance test? *Diabetes Care*. 2002;25:1851–1856.
- Stern MP. Diabetes and cardiovascular disease. The common soil hypothesis. *Diabetes*. 1995;44:369-74.
- Strong JP. The natural history of atherosclerosis in childhood. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;623:9-15.
- Stryer L. Biosynthesis of membrane lipids and steroids. In: Stryer L, editor. Biochemistry. 4th edition. New York: WH Freeman; 1996.
- Tan KCB: Reverse cholesterol transport in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2009;1-10.
- Taskinen MR. Diabetic dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 2002;3:S47-51.
- Tominaga M, Eguchi H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A: Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose: the Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care*. 1999;22:920-24.
- Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterios Thromb Vasc Biol*. 2003;23(10):1732-8.
- Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, et al. The Finnish Diabetes Prevention Study Group: Prevention of type 2 diabetes

- mellitus* by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2001;344:1343-1350.
- UKPDS 35. United Kingdom Prospective Diabetes Study Group: Association of glycemia with microvascular and macrovascular complications of type 2: Prospective Observational Study. *BMJ*. 2000;321:405-12.
- Vasques ACJ, Rosado LEFPL, Alfenas RCG, Geloneze B. Análise crítica do uso dos índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na avaliação da resistência à insulina e capacidade funcional das células- β pancreáticas. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;51(1):32-7.
- Vendrame F, Gottlieb PA. Prediabetes: prediction and prevention trials. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004;33:75-92.
- Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2000;21:697-738.
- Wajchenberg BL, Bosco A, Arone MM, Levin S, Rocha MS, Lerario AC, Nery M, Goldman J, Liberman B. Estimation of body fat and lean tissue distribution by dual energy x-ray absorptiometry and abdominal body fat evaluation by computed tomography in cushing's disease. *Journal of Clin End Metab*. 1995;80:2791-2794.
- Walldius G, Jungner I. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid modifying therapy. *J Intern Med*. 2004;255 (2):188-205.
- Wang CS, Briggs MR. HDL: the metabolism, function, and therapeutic importance. *Chem Rev*. 2004;104(1):119-37.
- Watanabe N, Taniguchi T, Taketoh H, Kitagawa Y, Namura H, Yoneda N, Kurimoto Y, Yamada S, Ishikawa Y. Elevated remnant-like lipoprotein particles in impaired glucose tolerance and type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 1999;22(1):152-56.
- Watts GF, Chan DC, Barret PHR, Susekov AV, Huan J, Song S. Fat compartments and apolipoprotein B-100 kinetics in overweight-obese men. *Obesity Research*. 2003;11(1):152-59.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047-1053.
- Wyne KL. Free fatty acids and type 2 diabetes mellitus. *Am J Med*. 2003;115:29S-36S.
- Yamashita S, Nakamura T, Shimomura I, Nishida M, Yoshida S, Kotani K, Kameda-Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y. Insulin resistance and body fat distribution: Contribution of visceral fat accumulation to the development of insulin resistance and atherosclerosis. *Diabetes Care*. 1996;19(13):287-91.
- Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the InterHeart Study): case – control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937-52.