Camila Canteiro Leança

O metabolismo de lipoproteínas e a sensibilidade à insulina
são distintamente modulados em indivíduos saudáveis
com concentração alta ou baixa de HDL-colesterol

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

Programa de: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Eder Carlos Rocha
Quintão

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Leança, Camila Canteiro

O metabolismo de lipoproteínas e a sensibilidade à insulina são distintamente modulados em indivíduos saudáveis com concentração alta ou baixa de HDL-colesterol / Camila Canteiro Leança. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientador: Eder Carlos Rocha Quintão.

Descritores: 1.Colesterol HDL 2.Hipoalfalipoproteinemia 3.Diabete melito
4.Resistência à insulina 5.Metabolismo celular de colesterol 6.Aterosclerose

USP/FM/DBD-047/12

Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípidos (LIM10) do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este projeto foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Bolsa de Doutorado Direto 08/50185-9 e Projeto Temático 06/60585-9.

Aos meus pais, Shirley e Aristides (i.m.), meus exemplos maiores.

Ao meu marido Gustavo, a quem amo incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eder Quintão, pela oportunidade, pela confiança na minha capacidade e por todos os ensinamentos, que vão muito além da área científica. Foi uma honra tê-lo como meu orientador.

À Dra. Edna Nakandakare, pela oportunidade, pelas opiniões sempre ponderadas, pelo exemplo como médica, por dividir comigo sua experiência clínica e pelo convívio tão agradável.

À Dra. Marisa Passarelli, por ser uma grande fonte de inspiração na minha vida acadêmica. Suas aulas sobre o transporte reverso de colesterol, que despertaram meu interesse pelo assunto durante a residência médica, e sua paixão pela ciência foram realmente motivadoras para mim.

À Dra. Eliana Cota de Faria, pela parceria neste projeto. Sem a participação do grupo de Campinas, não só na captação de pacientes, mas em várias outras frentes de atuação, este trabalho não seria possível.

À Valéria Suti Nunes, minha grande parceira neste trabalho. Obrigada pelo companheirismo, apoio e por me ensinar grande parte do que sei sobre as metodologias e rotinas do laboratório.

À Dra. Mônica Neves, pela agradável convivência no ambulatório, pelo auxílio na captação dos pacientes, pelas opiniões bem colocadas e pelo interesse que sempre manifestou em relação ao estudo.

À Patricia Cazita, pelo apoio em diversas metodologias, pela amizade, convívio e pela troca de experiências sobre os mais variados temas.

Ao Rodrigo Iborra, pela amizade, pela paciência com minhas dúvidas de ordem prática no laboratório e por me ensinar tudo o que sei sobre a técnica de *Western Blotting*.

À Adriana Saldiba de Lima que, desde os meus primeiros dias de laboratório, me tratou com tanto carinho e que sempre se empenhou em promover a harmonia das relações pessoais e a união do grupo.

À Gabriela Castilho, Fabiana Ferreira e Raphael de Souza Pinto, pela amizade e por terem me ajudado em meus “primeiros passos” na bancada.

À Claudia Souza, pela amizade, pela competência e dedicação com que desempenha seu trabalho e pelas respostas sempre rápidas e atenciosas a todas as minhas demandas burocráticas.

À querida Rosibel, pelo café gostoso de todos os dias e por zelar, com tanta dedicação, por nossos equipamentos e materiais.

A todos os meus colegas do LIM-10 que, durante estes 4 anos ou mais de estudo, estiveram, em algum momento, ao meu lado: Alessandra Carreiro, Angela Ilha, Camila Sartori, Débora Rocco, Diego Gomes, Fabiana Góes, Fernanda Fusco, Juliana Machado, Joilsa Monteiro, Karina Oliveira, Klara Rahmann, Ligia Okuda, Maria Olivia Carvalho, Maria Silvia Ferrari, Mila Alvarenga, Milessa Afonso, Patricia Rios, Paula Ramos, Renata Bombo, Roberta Machado, Sérgio Catanozi, Senária Egutti, Simone Batista e Tatiana Venâncio. Obrigada por tornarem a rotina do laboratório tão leve e descontraída e pela boa companhia nos nossos congressos e festas.

À Jussara Rocha, pelo apoio nas rotinas laboratoriais e pelos ensinamentos metodológicos.

Ao Dr. Isio Schulz pelo convívio e troca de experiências no ambulatório de Lípidos.

À Dra. Ana Maria Lottenberg pelo convívio e ensinamentos.

Ao Dr. Chin Jia Lin, pela disponibilidade com que sempre me recebeu em seu laboratório, pelo auxílio na metodologia de qRT-PCR e na análise estatística dos dados de expressão gênica.

Ao Dr. Alexander Jorge, pelo incentivo e pelo auxílio nas metodologias de biologia molecular.

Ao Dr. Daniel Gianella-Neto, pelas análises estatísticas relacionadas à expressão gênica.

A todos os voluntários que participaram do estudo, dedicando parte de seu tempo ao progresso da ciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro fundamentais para a realização deste trabalho.

Às amigas Aline Donati e Juliana Abreu, pela amizade longa e sincera.

À minha querida amiga Beatriz Monteiro, por estar sempre ao meu lado nesta caminhada e por todo o apoio nos momentos difíceis. O doutorado foi muito mais feliz com você por perto. E à querida amiga Gabriela Vasques, pela amizade, apoio e pelo prazer da sua companhia. Sentirei falta dos nossos almoços, meninas!

Aos meus sogros, Vera e Célio, e minha cunhada, Patricia, por me acolherem com tanto carinho como parte da família.

À minha irmã Juliana que, mesmo distante fisicamente, sempre acompanhou meus passos.

Aos meus avós, Iracema e Antônio, Beatriz e Aristides; exemplos de vidas dedicadas ao trabalho para dar aos seus filhos a educação que não puderam ter.

Aos meus pais, Shirley e Aristides (i.m.), pelos valores que me ensinaram e pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão e meu amor por vocês.

Ao meu marido Gustavo, que nestes dez anos de vida em comum, foi meu companheiro inseparável e meu maior incentivador. Obrigada pelo amor e pela paciência; pela gentileza e pelo bom humor, características tão suas; enfim, obrigada por fazer parte da minha vida.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	HDL e risco cardiovascular	1
1.2	Fatores que regulam as concentrações de HDL-C no plasma	2
1.3	Resistência insulínica e HDL	6
1.4	O balanço de colesterol no organismo	9
1.4.1	O transporte reverso de colesterol	9
1.4.2	A síntese intracelular de colesterol.....	12
1.4.3	A absorção intestinal de colesterol.....	15
1.5	Resistência insulínica e relação com síntese e absorção de colesterol.....	16
2	OBJETIVOS	19
3	MÉTODOS	20
3.1	Casística	20
3.2	Crterios de exclusão	21
3.3	Entrevista e coleta de sangue perifrico	22
3.4	Separação das células linfomononucleares.....	22
3.5	Determinações bioqumicas e hormonais	23
3.6	Extração do RNA e avaliao de integridade	24
3.7	Análise de expressao gênica por qRT-PCR em tempo real.....	25
3.8	Conteúdo celular de colesterol	31
3.9	Atividade de LCAT	31
3.10	Atividade de CETP	32
3.11	Atividade de PLTP	33
3.12	Lipase hepática e lipoproteína lipase – Atividade.....	34
3.13	Ultrassonografia de carótidas	34

3.14	Análise estatística.....	35
4	RESULTADOS	36
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO.....	54
7	REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICE		

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCA1	<i>ATP-Binding Cassete Transporter</i> Tipo A1
ABCG1	<i>ATP-Binding Cassete Transporter</i> Tipo G1
ABCG5	<i>ATP-Binding Cassete Transporter</i> Tipo G5
ABCG8	<i>ATP-Binding Cassete Transporter</i> Tipo G8
ACAT	Acil-Coenzima A Aciltransferase
ALT (TGP)	Alanina Aminotransferase
AGL	Ácidos Graxos Livres
Apo	Apolipoproteína
ARF-1	<i>ADP Ribosylation Factor</i> 1
AST (TGO)	Aspartato Aminotransferase
cDNA	DNA complementar
CETP	Proteína de Transferência de Colesterol Éster
CE	Colesterol Esterificado
CL	Colesterol Livre
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
FL	Fosfolípide
GamaGT	Gama Glutamil Transferase
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HOMA	<i>Homeostatic Model Assessment</i>
HMG CoA	3-Hidroxi-3-Metil-Glutaril-Coenzima A
HPRT1	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase</i> 1

IMC	Índice de Massa Corporal
LCAT	Lecitina-Colesterol Aciltransferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDLR	Receptor de LDL
LH	Lipase Hepática
LHS	Lipase Hormônio Sensível
LPL	Lipoproteína Lipase
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
MTP	Proteína de Transferência Microsomal
miR-33	microRNA-33
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NPC1-L1	Niemann-Pick C1- <i>Like</i> 1
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR-US	Proteína C-Reativa Ultra-Sensível
PGK1	<i>Phosphoglycerate Kinase</i> 1
PLTP	Proteína de Transferência de Fosfolípidos
qRT-PCR	Transcrição Reversa seguida por Reação Quantitativa em Cadeia pela Polimerase
QUICKI	<i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i>
Relação C/Q	Relação Cintura/Quadril
RIN	Número de Integridade do RNA
RQ	Quantificação relativa
SM	Síndrome Metabólica

SR-BI	<i>Scavenger Receptor BI</i>
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>
TG	Triglicérides
TRC	Transporte Reverso de Colesterol
TSH	Hormônio Tireoestimulante
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

RESUMO

Leança C C. **O metabolismo de lipoproteínas e a sensibilidade à insulina são distintamente modulados em indivíduos saudáveis com concentração alta ou baixa de HDL-colesterol.** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

A síndrome metabólica (SM) e o diabetes melito (DM) caracterizam-se por uma série de alterações no metabolismo de lipoproteínas, entre elas a hipertrigliceridemia e a redução nas concentrações de HDL-colesterol (HDL-C). Em estudo prévio demonstramos que indivíduos saudáveis, não obesos, com concentração de HDL-C abaixo de 40mg/dL, quando comparados àqueles com concentração de HDL-C acima de 60mg/dL, apresentam, no plasma, esteróis marcadores de absorção intestinal de colesterol alimentar diminuídos, e de síntese de colesterol aumentados. Achados semelhantes foram descritos por outros autores em portadores de SM e DM, sugerindo que a resistência à insulina participa na origem do distúrbio, embora não se saiba por quais mecanismos. Considerando nossos achados prévios, os objetivos deste estudo são investigar quais os mecanismos moleculares envolvidos nas alterações do metabolismo de colesterol presentes em indivíduos com concentrações alta (HIPERALFA, HDL-C > 60mg/dL, n = 36) ou baixa (HIPOALFA, HDL-C < 40mg/dL, n = 37) de HDL-C por meio de medida de: 1) conteúdo celular de colesterol e expressão gênica de enzimas e receptores críticos para a regulação intracelular de colesterol, tendo como modelo células linfomononucleares de sangue periférico; 2) parâmetros que regulam o metabolismo de lipoproteínas no plasma e que são influenciados pela insulina, tais como lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), lipoproteína lipase (LPL) e lipase hepática (LH) pós-heparina, proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) e pré-

beta₁ HDL. Os critérios de exclusão foram: diabetes melito, IMC $\geq$ 30Kg/m², tabagismo, consumo elevado de álcool e uso de fármacos capazes de interferir no metabolismo de lipoproteínas. Mostramos que, quando comparado ao grupo HIPERALFA, o grupo HIPOALFA apresentou maiores concentrações de insulina, triglicérides, ALT(TGP), índice HOMA, atividade de LCAT e LH, e menor atividade de LPL e concentração de pré-beta₁ HDL. Não houve diferença entre os grupos com relação ao conteúdo celular de colesterol, à expressão dos genes estudados (ABCA1, ABCG1, SR-BI, LDLR, HMG CoA redutase, SREBP-1c e LXR alfa), às atividades de CETP e PLTP no plasma e à ultrassonografia de carótidas. Nossos resultados mostram que indivíduos com concentração alta ou baixa de HDL-C no plasma diferem com relação à sensibilidade à insulina, além de parâmetros envolvidos na regulação do metabolismo de lipoproteínas. Estes achados não se relacionaram com o metabolismo celular de colesterol no modelo estudado, mas sugerem que este quadro metabólico, cuja origem é desconhecida, precede o aparecimento, no decorrer da idade, de outras alterações típicas da síndrome metabólica no grupo com baixas concentrações de HDL-C no plasma.

Descritores: Colesterol HDL; Hipoalfalipoproteinemia; Diabetes melito; Resistência à insulina; Metabolismo celular de colesterol; Aterosclerose.

SUMMARY

Leança C C. **Lipoprotein metabolism and insulin sensitivity are distinctly modulated in healthy subjects with high and low plasma HDL-cholesterol concentration.** [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

The metabolic syndrome (MS) and the diabetes mellitus (DM) are characterized for a series of alterations in lipoprotein metabolism as hypertriglyceridemia and reduced HDL-cholesterol (HDL-C) concentration. In previous study we demonstrated that healthy non obese subjects with HDL-C concentration below 40mg/dL, when compared with those with HDL-C above 60mg/dL, present low plasma sterol markers of alimentary cholesterol intestinal absorption and high plasma sterol markers of cholesterol synthesis. Similar findings have been described by others in subjects with MS and DM, suggesting that insulin resistance participates in the origin of the disorder, although by unknown mechanisms. Considering our previous findings, the objectives of this study are to investigate the molecular mechanisms involved in alterations of cholesterol metabolism in subjects with high HDL-C (HYPERALPHA, HDL-C > 60mg/dL, n = 36) or low HDL-C (HYPOALPHA, HDL-C < 40mg/dL, n = 37) concentration by means of measuring: 1) cellular cholesterol content and gene expression of critical enzymes and receptors involved in the intracellular cholesterol regulation, having peripheral blood mononuclear cells as model; 2) parameters that regulate the plasma lipoproteins metabolism and that are influenced by insulin, such as lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT), post-heparin hepatic (HL) and lipoprotein lipase (LPL), cholesteryl ester transfer protein (CETP), phospholipid transfer protein (PLTP) and pre-beta₁ HDL. The exclusion criteria were: diabetes mellitus, body mass index $\geq 30\text{Kg/m}^2$, smoking, heavy drinking and use of medications that interfere with lipoprotein metabolism. We

demonstrated that, as compared with HYPERALPHA, the HYPOALPHA group presented higher insulin, triglycerides and alanine aminotransferase concentrations, HOMA index, LCAT and HL activities and lower LPL activity and pre-beta₁ HDL concentration. There was no difference between the groups in the cellular cholesterol content, expression of genes (ABCA1, ABCG1, SR-BI, LDLR, HMG CoA reductase, SREBP-1c and LXR alpha), plasma CETP and PLTP activities and carotid ultrasonography. Our results show that subjects with high or low plasma HDL-C concentration differ in relation to insulin sensitivity and in parameters involved in lipoprotein metabolism regulation. These findings were not related to the cellular cholesterol metabolism in the studied model, but they suggest that this metabolic disturbance, whose origin is unknown, precedes the appearance, in the course of the human life of other typical alterations of metabolic syndrome in the low HDL-C concentration group.

Descriptors: HDL cholesterol; Hypoalphalipoproteinemia; Diabetes mellitus; Insulin resistance; Cellular cholesterol metabolism; Atherosclerosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HDL e risco cardiovascular

Estudos populacionais mostram que a concentração de HDL-C no plasma é inversamente relacionada à incidência de doença vascular coronariana (Wilson *et al.*, 1988; Assmann *et al.*, 1996; Natarajan *et al.*, 2003). Em função disso, inúmeros fármacos têm sido desenvolvidos com o intuito de elevar as concentrações de HDL e reduzir o risco cardiovascular (Fazio & Linton, 2010).

Acredita-se que o papel antiaterogênico desempenhado pela HDL esteja relacionado às suas funções antioxidante (Kontush & Chapman, 2010), anti-inflamatória (Barter *et al.*, 2004), antiagregante e vasodilatadora (Mineo *et al.*, 2006), além de sua participação no transporte reverso de colesterol (TRC) (Rader *et al.*, 2009). Embora estas funções tenham sido amplamente exploradas em estudos *in vitro*, faltam evidências em humanos de que participem efetivamente no papel ateroprotetor da HDL. Estudos recentes sugerem que a relação entre HDL e risco cardiovascular é mais complexa do que se supunha, indo além das concentrações plasmáticas de HDL-C. Atualmente sabe-se que as partículas de HDL no plasma são heterogêneas quanto à estrutura, metabolismo e funcionalidade (Movva & Rader, 2008) e a existência de subpopulações distintas de HDL é consistente com o fato de estas

partículas exercerem várias funções biológicas. Cada vez mais, se aceita o conceito de que as funções antiaterogênicas da HDL estão mais relacionadas com as propriedades biológicas de suas subpopulações do que com a concentração absoluta de HDL-C no plasma (Tsompanidi *et al.*, 2010; Vergeer *et al.*, 2010a).

1.2 Fatores que regulam as concentrações de HDL-C no plasma

A concentração de HDL-C no plasma é determinada por fatores ambientais e genéticos. Sabe-se que peso corporal, exercício físico, tabagismo, consumo de álcool e hábitos alimentares respondem pela metade da variação da concentração de HDL-C entre indivíduos; a hereditariedade contribui para a outra metade. Mutações em genes envolvidos na regulação do metabolismo da HDL, como ABCA1, apoA-I e LCAT, estão implicadas em formas raras de hipoalfalipoproteinemia. Nestes casos, as concentrações de HDL-C tendem a ser muito reduzidas. Polimorfismos genéticos localizados nestes mesmos genes são responsáveis por variação importante no HDL-C e, de maneira geral, respondem por fenótipos menos extremos (Weissglas-Volkov & Pajukanta, 2010). As principais causas de hipo e hiperalfalipoproteinemias primárias (familiais) encontram-se resumidas na **tabela 1**.

Tabela 1. Principais causas de hipo e hiperalfalipoproteinemias primárias

Hipoalfalipoproteinemias (Hipoalfa) primárias
Deficiência de ABCA1 em homozigose (Doença de Tangier) ou heterozigose (Hipoalfa familiar)
Deficiência de apoA-I
Deficiência de LCAT (<i>Fish-eye disease</i>)
Deficiência de Lipoproteína Lipase
Hiperalfalipoproteinemias (Hiperalfa) primárias
Deficiência de CETP
Deficiência de Lipase Hepática
Hiperalfa associada à variante apoC-III (Lys58 → Glu)

Dados do estudo NHANES III mostram que concentrações de HDL-C abaixo de 40mg/dL estão presentes em 33% dos homens e 14% das mulheres, enquanto que concentrações abaixo de 20mg/dL são encontradas em apenas 1% da população (Miller & Zhan, 2004). Interessantemente, nem todas as patologias que cursam com baixas concentrações de HDL-C apresentam aumento do risco cardiovascular. Um exemplo clássico é a hipoalfalipoproteinemia associada à apoA-I Milão. Trata-se de uma mutação na apoA-I, principal apolipoproteína (apo) da HDL, caracterizada pela substituição de arginina por cisteína na posição 173, descrita em uma população residente próximo à cidade de Milão, e que se caracteriza por concentrações de HDL-C abaixo de 20mg/dL. A presença desta mutação leva à formação de pontes de enxofre entre duas moléculas de apoA-I, fazendo com que as partículas nascentes de HDL (ou pré-beta HDL) assumam configuração discoidal e isso

parece lhes garantir maior capacidade de funcionar como aceptoras de colesterol (Franceschini *et al.*, 1999). Nestes indivíduos não há aumento do risco cardiovascular; pelo contrário, parece haver proteção (Sirtori *et al.*, 2001). Por outro lado, existem situações em que as concentrações de HDL-C são elevadas, mas há controvérsias com relação à proteção cardiovascular. É o caso de portadores de deficiência de CETP (proteína de transferência de colesterol éster), responsável por mediar a troca de colesterol éster das HDL, proveniente do transporte reverso de colesterol, por triglicérides de quilomícrons e VLDL. Heterozigotos apresentam aumento moderado nas concentrações de HDL-C (70-100mg/dL) decorrente da redução de cerca de 40% na atividade de CETP. Já os homozigotos, em geral, apresentam HDL-C > 120mg/dL devido à deficiência completa desta proteína. Descrita na população japonesa, esta condição foi inicialmente associada a maior longevidade (Moriyama *et al.*, 1998). No entanto, os primeiros estudos deste genótipo mostraram aumento da mortalidade cardiovascular (Zhong *et al.*, 1996). De fato, existe a hipótese de que a deficiência completa de CETP pode favorecer a aterogênese na medida em que as partículas de HDL que predominam nesta situação são as HDL-2; grandes e ricas em colesterol éster, elas são supostamente menos aptas a funcionar como aceptoras de colesterol e realizar o transporte reverso. Estudos populacionais mais recentes e de maior consistência estatística apontam para proteção cardiovascular e aumento da longevidade quando massa e atividade de CETP estão moderadamente diminuídas (5-10%) (Schaefer & Asztalos, 2006; Ritsch *et al.*, 2010), embora uma meta-análise mostre que este efeito

protetor é bastante modesto (Thompson *et al.*, 2008). Estudos de polimorfismos que elevam a CETP e reduzem as concentrações de HDL-C apontam para aumento do depósito de cálcio nas coronárias, sugerindo aumento do processo aterosclerótico (Tsai *et al.*, 2008).

As síndromes genéticas que afetam as concentrações de HDL-C, como as acima citadas, são fonte importante de conhecimento sobre estas lipoproteínas, assim como os modelos animais *knockout* ou que superexpressam receptores ou proteínas relacionados ao metabolismo da HDL. Ao contrário das evidências epidemiológicas, que são claras em relacionar HDL-C e proteção cardiovascular, os resultados destes estudos, muitas vezes, contradizem esta relação. Isto pode ser atribuído a inúmeros fatores, entre os quais destacamos: 1) as síndromes genéticas relacionadas a HDL são raras e os estudos, em geral, envolvem um número pequeno e heterogêneo de indivíduos; 2) os modelos experimentais nem sempre são os mais adequados, uma vez que o metabolismo de lipoproteínas difere marcadamente entre as espécies; e 3) talvez o fator mais importante seja o fato de que o metabolismo das lipoproteínas, incluindo a HDL, é extremamente integrado, complexo e influenciado por fatores genéticos e ambientais, sendo que alterações em uma classe de lipoproteínas têm reflexos profundos em outras e, conseqüentemente, é muito difícil prever o peso isolado de cada uma delas no risco cardiovascular. As lacunas e contradições existentes no conhecimento das HDL, só reforçam a necessidade de empregar ainda mais esforços no melhor entendimento do metabolismo destas lipoproteínas.

1.3 Resistência insulínica e HDL

A síndrome metabólica (SM) e o diabetes melito caracterizam-se por uma série de alterações no metabolismo de lipoproteínas: hipertrigliceridemia devido ao aumento das concentrações de VLDL-C, redução do HDL-C e acúmulo de partículas de LDL pequenas e densas, além de aumento da lipemia pós-prandial. Trata-se de uma síndrome dislipidêmica com alto potencial aterogênico e de início bastante precoce, podendo anteceder o aparecimento do diabetes em vários anos (Ginsberg *et al.*, 2006). É a causa secundária mais comum de hipoalfalipoproteinemia e sua incidência vem aumentando proporcionalmente aos números crescentes de prevalência de síndrome metabólica na população geral. Sabe-se, atualmente, que as anormalidades lipídicas presentes na dislipidemia da SM compartilham um substrato fisiopatológico comum, a resistência insulínica, e que o grau de dislipidemia correlaciona-se diretamente com a quantidade de tecido adiposo visceral. Este parece desempenhar papel fundamental na origem do distúrbio (Iozzo, 2009), embora fígado, tecido muscular e sistema nervoso central também contribuam. A SM está mais relacionada à distribuição da gordura corporal, em especial o acúmulo na região do tronco, do que com a presença de obesidade propriamente dita. Nos estados de resistência insulínica, a insulina não é capaz de suprimir a atividade da lipase hormônio-sensível (LHS), resultando em aumento da lipólise nos tecidos periféricos, especialmente no tecido adiposo visceral, com consequente liberação de ácidos graxos para a circulação portal e

aumento do aporte destes para o fígado. Além disso, no hepatócito, a insulina é incapaz de suprimir a expressão da proteína de transferência microssomal (MTP) e da *ADP ribosylation factor 1* (ARF-1), favorecendo a estabilidade da apoB-100. Por outro lado, a hiperinsulinemia presente nos estados de resistência insulínica leva à ativação de SREBP-1c no fígado (*sterol regulatory element binding protein*), aumentando a síntese hepática de ácidos graxos. O aumento do aporte de ácidos graxos livres para o fígado somado ao aumento de sua síntese e da secreção de apoB levam à maior síntese de VLDL, especialmente de sua subpopulação mais rica em triglicérides (VLDL-1) (Adiels *et al.*, 2008). Na circulação, o aumento do número de partículas de VLDL funciona como substrato para maior ação da CETP. Com isso, tanto partículas de LDL quanto de HDL se enriquecem em triglicérides, tornando-se mais susceptíveis à ação da enzima lipoproteína lipase hepática (LH). Sob ação da LH, as LDL ficam menores e mais densas, o que lhes confere maior potencial aterogênico, por terem maior acesso à íntima arterial e maior potencial de oxidação. Com relação à HDL, sabe-se que o seu enriquecimento em triglicérides, associado ao maior remodelamento pela LH, desestabiliza a partícula aumentando o catabolismo de apoA-I e HDL (Rashid *et al.*, 2003). Alguns estudos sugerem que na SM prevalecem partículas de HDL pequenas e densas que teriam menor potencial antiaterogênico e menor capacidade de efetuar o transporte reverso de colesterol. Nos estados de resistência insulínica, há aumento da apoC-III que inibe a lipoproteína lipase (LPL) circulante, prejudicando a formação de partículas de HDL, uma vez que a ação da LPL

sobre quilomícrons e VLDL fornece fosfolípidos e colesterol livre para a síntese de partículas precursoras das HDL. Além disso, o aumento dos ácidos graxos livres presente nesta condição prejudica a ação da LPL, uma vez que estes se concentram na interface partícula-enzima, dificultando a interação da LPL com quilomícrons e VLDL. O prejuízo na ação da LPL também responde pela dificuldade de metabolização de quilomícrons e seus remanescentes, com consequente hiperlipemia pós-prandial. Mais recentemente foi descrito um novo mecanismo que pode contribuir para a redução das concentrações de HDL-C na SM. Os genes de SREBP-1 e SREBP-2 contêm sequências intrônicas que codificam o microRNA-33 (miR-33), sendo que quanto maior a expressão destes genes, maior a quantidade de miR-33. Najafi-Shoushtari *et al.* (2010) associaram o miR-33 à repressão pós-transcricional de ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*), receptor que participa de maneira crítica na síntese de HDL e no transporte reverso de colesterol.

Existem diversas maneiras de se avaliar a resistência insulínica, sendo o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico considerado padrão-ouro (De Fronzo *et al.*, 1979). Devido à complexidade de execução, o *clamp* é reservado às condições experimentais. Na prática clínica são usados índices como o HOMA (*Homeostatic Model Assessment*) e o QUICKI (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*). A relação triglicérides/HDL-C também tem se mostrado excelente preditora de resistência insulínica (Li *et al.*, 2008).

1.4 O balanço de colesterol no organismo

O metabolismo do colesterol é altamente complexo e integrado, visando manter a homeostase intracelular e a concentração plasmática de colesterol. Participam do balanço de colesterol no organismo, além do transporte reverso, mediado pela HDL, a síntese intracelular, em especial a hepática, a absorção intestinal e a excreção biliar de colesterol. Apenas os três primeiros sistemas serão abordados nesta discussão por serem pertinentes ao estudo. A excreção de colesterol pela pele e como hormônios urinários tem participação diminuta neste balanço.

1.4.1 O transporte reverso de colesterol

O TRC é o processo pelo qual o colesterol dos tecidos periféricos, incluindo o da íntima arterial, é transportado para o fígado a fim de ser excretado na bile. As etapas do transporte reverso de colesterol são apresentadas nas **figuras 1 e 2**.

A formação da partícula de HDL tem início com a secreção de apoA-I pelo fígado e intestino. A apoA1 adquire colesterol livre (CL) e fosfolípidos (FL) via receptor ABCA1 no hepatócito, que exporta lípidos através da membrana plasmática. Além disso, a hidrólise de quilomícrons e VLDL pela LPL favorece o desprendimento de componentes de superfície destas lipoproteínas, formando partículas de pré-beta HDL; estas ganham colesterol livre e fosfolípidos da

superfície de células de tecidos extra-hepáticos, entre elas macrófagos da parede arterial (células espumosas), principalmente via receptor ABCA1. A enzima lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), presente principalmente na HDL, esterifica o colesterol que migra para o núcleo da partícula, tornando-a esférica (HDL madura). A HDL madura passa a adquirir mais lípides da superfície celular via receptores ABCG1 (*ATP-binding cassette transporter G1*) e SR-BI (*scavenger receptor BI*) (figura 1).

Figura 1. Transporte reverso de colesterol: remoção de colesterol dos tecidos periféricos e formação de HDL madura

Nas células espumosas da parede arterial, o aumento da concentração de oxisteróis estimula o fator nuclear LXR (*liver X receptor*), aumentando a expressão de ABCA1 e ABCG1 e favorecendo o TRC.

A CETP medeia troca de triglicérides (TG) de quilomícrons, VLDL e, em menor escala LDL, por colesterol esterificado (CE) da HDL. A proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) transfere fosfolípidos de quilomícrons e VLDL para a HDL. A partícula de HDL rica em triglicérides é mais sensível à ação da LH, o que favorece a posterior remoção do colesterol esterificado do interior desta lipoproteína pelos receptores SR-BI hepáticos. Neste processo formam-se remanescentes de HDL, pobres em lípidos, que são captados pelo fígado. O componente apoA-I é metabolizado preferencialmente pelos rins via receptores cubilina/megalina (**figura 2**).

Figura 2. Transporte reverso de colesterol: remoção das partículas de HDL pelo fígado e formação de remanescentes de HDL

As partículas de VLDL e LDL enriquecidas com colesterol éster proveniente da HDL por ação da CETP tornam-se mais susceptíveis à ação da LH e captação por receptores de LDL (LDLR) presentes na superfície do hepatócito.

1.4.2 A síntese intracelular de colesterol

As principais etapas da síntese intracelular de colesterol encontram-se descritas na **figura 3**.

Figura 3. Síntese intracelular de colesterol

Latosterol e desmosterol são esteróis intermediários na cascata de síntese de colesterol e utilizados como marcadores no plasma de síntese de colesterol. As principais etapas da regulação intracelular da concentração de colesterol são ilustradas na **figura 4**.

Figura 4. Regulação intracelular da concentração de colesterol

Resumidamente, sempre que há aumento do conteúdo intracelular de colesterol, diminui a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG CoA) redutase, a fim de reduzir a produção intracelular de colesterol. Além disso, a célula reduz a expressão de receptores de LDL, a fim de captar menos colesterol, e aumenta a atividade da enzima acil-coenzima A aciltransferase (ACAT), estocando colesterol na forma esterificada.

SREBP e LXR são importantes reguladores do metabolismo de colesterol. No fígado, a insulina estimula a transcrição de genes que codificam SREBP-1c via LXR (Chen *et al.*, 2004). A ativação de SREBP-1c promove a transcrição de genes necessários à síntese de ácidos graxos.

1.4.3 A absorção intestinal de colesterol

As principais etapas da absorção de colesterol pelo intestino encontram-se ilustradas na **figura 5**.

Figura 5. Absorção intestinal de colesterol

No intestino, o colesterol proveniente da dieta e da bile conjuga-se aos ácidos biliares e sua absorção é mediada pela proteína NPC1-L1 (Niemann-Pick C1-*like* 1). No enterócito, o colesterol livre é utilizado na síntese de HDL, uma vez que o intestino contribui de maneira importante para a síntese desta lipoproteína, e também é esterificado pela ACAT2 e utilizado para a síntese de

quilomícrons. Os fitoesteróis (beta-sitosterol e campesterol), esteróis provenientes dos vegetais, também são absorvidos via NPC1-L1, mas não são reconhecidos pela ACAT2, sendo, em sua maior parte, devolvidos à luz intestinal via receptores ABCG5/G8. Uma pequena porcentagem dos fitoesteróis absorvidos chega ao plasma e pode ser medida, sendo utilizada como marcadora da absorção de colesterol alimentar. Há evidências de que LXR estimule a expressão de ABCG5/G8, diminuindo a absorção de colesterol (Yu *et al.*, 2003).

1.5 Resistência insulínica e relação com síntese e absorção de colesterol

Fígado e intestino têm papel fundamental na regulação do metabolismo de colesterol. As dosagens no plasma dos marcadores de síntese hepática e absorção intestinal de colesterol alimentar têm sido amplamente utilizadas em estudos relacionados ao metabolismo de colesterol. Sabe-se que absorção e síntese estão inversamente relacionadas, ou seja, em situações em que a síntese hepática está aumentada, encontramos diminuição na absorção intestinal, a fim de manter a homeostase plasmática de colesterol (Kesäniemi & Miettinen, 1987).

Síntese de colesterol aumentada e absorção diminuída do componente alimentar têm sido associadas à obesidade (Miettinen & Gylling, 2000) e à síndrome metabólica, sendo que neste último caso, as alterações nos

marcadores foram mais acentuadas no grupo de indivíduos que apresentava maior número de componentes associados à síndrome metabólica (Assmann *et al.*, 2007). Aumento da síntese hepática e redução da absorção intestinal também foram descritos em diabéticos tipo 2 (Simonen *et al.*, 2002) e em indivíduos normoglicêmicos com resistência insulínica (Pihlajamäki *et al.*, 2004). Interessantemente, as alterações no metabolismo de colesterol presentes nestes casos foram independentes do peso, apontando a resistência insulínica como principal fator responsável por estas alterações (Simonen *et al.*, 2002; Gylling *et al.*, 2010). A perda de peso em diabéticos tipo 2 foi capaz de aumentar a eficiência na absorção de colesterol por melhorar a resistência insulínica (Simonen *et al.*, 2000). Especula-se que a resistência insulínica afete primariamente a absorção ou a síntese de colesterol, embora ainda não se saiba qual alteração ocorre primeiro e nem quais os mecanismos moleculares envolvidos.

Em estudo prévio demonstramos que indivíduos saudáveis, não obesos e com concentração de HDL-C abaixo de 40mg/dL apresentam marcadores diminuídos de absorção intestinal de colesterol alimentar e aumentados de síntese hepática em relação àqueles com concentração de HDL-C acima de 60mg/dL (Nunes *et al.*, 2011). Não houve diferença entre os grupos com relação à ingestão de gorduras, colesterol e fitoesteróis, de acordo com questionário nutricional. O fato do grupo com baixas concentrações de HDL-C também apresentar maiores concentrações de insulina, triglicérides e maior índice HOMA nos sugere que estes indivíduos se encontram num estágio em

que ainda não há alteração glicêmica, mas a resistência insulínica já está presente, assim como as alterações no metabolismo de colesterol que dela decorrem.

Considerando nossos achados prévios, algumas questões permanecem sem resposta: 1) quais os mecanismos moleculares envolvidos nas alterações do metabolismo de colesterol nestes casos?; 2) existiriam outras alterações em componentes que regulam as concentrações de lipoproteínas no plasma que poderiam contribuir para as alterações no metabolismo de colesterol encontradas?

Células linfomononucleares do sangue periférico, por serem de fácil obtenção e por refletirem o que ocorre no hepatócito com relação a enzimas e receptores críticos no metabolismo lipídico (Powell & Kroon, 1994; Aggarwal *et al.*, 2006), têm sido amplamente utilizadas como modelo para o estudo do metabolismo celular de colesterol (Arazi *et al.*, 2008; Mosig *et al.*, 2008; Nakanishi *et al.*, 2009) e foram assim utilizadas no presente trabalho.

2 OBJETIVOS

Avaliar, em indivíduos com concentração alta ($> 60\text{mg/dL}$) ou baixa ($< 40\text{mg/dL}$) de HDL-C no plasma:

1. O metabolismo celular de colesterol. Para isso serão determinados, em linfomonócitos humanos, o conteúdo celular de colesterol e a expressão gênica de receptores que transportam colesterol através da membrana plasmática (ABCA1, ABCG1, SR-BI, LDLR), além de enzimas e fatores de transcrição envolvidos na produção de colesterol (HMG CoA redutase, SREBP-1c, LXR alfa).
2. Parâmetros que regulam as concentrações de lipoproteínas no plasma (CETP, PLTP, LCAT, lipase hepática e lipoproteína lipase pós-heparina).

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Os voluntários do estudo foram provenientes do Ambulatório de Lípidos do Hospital das Clínicas da FMUSP, além de indivíduos da cidade de São Paulo captados em consultórios particulares ou encaminhados por outras unidades do Hospital das Clínicas. Este projeto faz parte do Projeto Temático 06/60585-9 que conta com a participação do Laboratório de Lípidos da UNICAMP, chefiado pela Dra. Eliana Cotta de Faria. Este serviço também participou da seleção de voluntários, realização da ultrassonografia de carótidas e dosagens de PLTP, CETP e lipases.

Participaram do estudo indivíduos de ambos os sexos (n = 73, sendo 41 homens e 32 mulheres) com idade de 20 a 74 anos e concentração de HDL-C no plasma abaixo de 40mg/dL (grupo HIPOALFA) ou acima de 60mg/dL (grupo HIPERALFA).

3.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram:

- ✓ Índice de Massa Corpórea (IMC) $\geq 30\text{Kg/m}^2$
- ✓ Trigliceridemia $\geq 200\text{mg/dL}$
- ✓ Uso de fármacos que interferem no metabolismo do colesterol (Ex.: estatinas, fibratos, ácido nicotínico, quelantes de sais biliares, anticoncepcionais, terapia de reposição hormonal, anticonvulsivantes)
- ✓ Doenças que interferem no metabolismo de colesterol (Ex.: hiperlipidemias primárias, diabetes melito, insuficiência hepática ou renal, hipotireoidismo descompensado)
- ✓ Tabagismo
- ✓ Consumo excessivo de álcool

Usamos como definição de consumo excessivo de álcool os limites máximos diários abaixo apresentados:

Tabela 2. Consumo de álcool (mL/dia):

CERVEJA	VINHO	DESTILADOS
---------	-------	------------

HOMENS	682	284	86
MULHERES	341	142	43

FONTE: www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005

3.3 Entrevista e coleta de sangue periférico

Os voluntários, em jejum de 12 horas, eram convocados para coleta de sangue no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP (HC-FMUSP). Todos assinavam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP. Em seguida era aplicado o questionário clínico e realizado o exame físico. As amostras para as análises bioquímicas e hormonais de rotina eram imediatamente encaminhadas ao Laboratório Central do HC-FMUSP. O sangue utilizado para as análises que não faziam parte da rotina laboratorial e para a extração de células linfomononucleares eram encaminhados para o Laboratório de Lípidos da FMUSP.

3.4 Separação das células linfomononucleares

O sangue periférico era colhido em tubo BD Vacutainer CPT (*BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA*), específico para separação de células linfomononucleares, que se baseia na extração pelo método do Ficoll, descrito

por Boyum (1968). Neste processo, as amostras são centrifugadas em temperatura ambiente por 30 minutos a 3000 rpm. A camada que contém os linfomonócitos é separada em tubo à parte e as células são lavadas duas vezes com PBS (tampão fosfato-salino) com EDTA, pH 7,4, seguida por centrifugação e contagem em câmara de Neubauer.

Eram colhidos 6 tubos CPT por paciente dos quais se obtinham entre 30×10^6 células e 60×10^6 células, que eram aliqüotadas para as análises de expressão gênica, expressão proteica e medida do conteúdo de colesterol celular. As células reservadas para análise de expressão gênica e proteica eram conservadas, respectivamente, em TRIzol (*Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e em solução de inibidores de protease preparada no próprio laboratório. As células utilizadas na medida da concentração do colesterol celular eram armazenadas em PBS.

3.5 Determinações bioquímicas e hormonais

Colesterol total, triglicérides e HDL-C foram dosados diretamente no plasma por método enzimático colorimétrico automatizado (*Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, IN, USA*). As concentrações de LDL-C foram calculadas pela fórmula de Friedewald (Friedewald *et al.*, 1972) já que todos os indivíduos apresentavam concentração de triglicérides abaixo de 400mg/dL. A

concentração de VLDL-C foi calculada dividindo-se a concentração de triglicérides por 5. A glicemia foi dosada por método enzimático colorimétrico automatizado (*Labtest Diagnostica, Brasil*) e a insulinemia por método imunofluorométrico (*PerkinElmer, Brasil*). O índice HOMA foi calculado pela seguinte fórmula: glicemia (mmol/L) x insulinemia (mU/L) / 22,5. A creatinina foi dosada por método colorimétrico cinético e aspartato amino transferase (AST ou TGO), alanina amino transferase (ALT ou TGP) e gama glutamil transferase (gamaGT) por método cinético automatizado. TSH foi dosado por método imunofluorométrico e T4 livre por fluoroimunoensaio (*PerkinElmer, Brasil*). As amostras dos voluntários convocados na cidade de São Paulo foram analisadas pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP e as amostras dos voluntários de Campinas pelo laboratório de análises clínicas da UNICAMP. Toda a análise de proteína C reativa ultra-sensível (PCR-US), dosada por método imunoturbidimétrico, e proteína sérica amiloide A, dosada por nefelometria (*Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA*), foi feita pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. As dosagens de apolipoproteínas foram feitas em nosso laboratório utilizando-se método imunoturbidimétrico (*Randox, Crumlin, Co Antrin, UK*). Pré-beta₁ HDL foi medida por ELISA (*Daiichi Pure Chemicals Co., Tokyo, Japan*).

3.6 Extração do RNA e avaliação de integridade

A extração do RNA foi padronizada por meio do emprego de colunas RNeasy Mini Kit (*QIAGEN, Hilden, Germany*), que permite extrair moléculas de RNA através de sua adesão à membrana de sílica da coluna. A utilização desta coluna dispensa o tratamento com DNase, pois a membrana remove eficientemente a maior parte do DNA contaminante. Para a avaliação da integridade foi utilizado o kit RNA 6000 Nano (*Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*), que se baseia na separação eletroforética do RNA em microchips e leitura do sinal de fluorescência no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*). Neste método, a integridade do RNA é determinada pelo cálculo do RIN (RNA Integrity Number). Este sistema visa eliminar a interpretação individual no controle de qualidade do RNA e baseia-se em “notas” de 1 a 10 que são dadas às amostras, sendo que 1 corresponde ao maior grau de degradação e 10 ao maior grau de preservação do RNA. Todas as amostras obtidas apresentaram RIN maior que 7, o que assegura amostras de ótima qualidade.

3.7 Análise de expressão gênica por qRT-PCR em tempo real

A primeira etapa consiste na transcrição reversa, ou seja, síntese de cDNA à partir do RNA extraído, utilizado o kit High Capacity RNA-to-cDNA (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). A reação é realizada em

termociclador PTC-100 (*MJ Research, Waltham, MA, USA*), de acordo com o protocolo do produto, partindo-se de uma concentração inicial de 500ng de RNA.

A segunda etapa consiste na análise de expressão gênica por amplificação do cDNA em tempo real. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) identificadas pelos códigos abaixo:

ABCA1	Hs01059118_m1
ABCG1	Hs00245154_m1
SR-BI	Hs00194092_m1
LDLR	Hs00181192_m1
HMG CoA redutase	Hs00168352_m1
SREBP-1c	Hs01088691_m1
LXR alfa	Hs00172885_m1

Na seleção das sondas, tomamos o cuidado de escolher aquelas que amplificam junções exônicas, mais uma vez a fim de reduzir o impacto de contaminação por DNA. Os demais reagentes para a reação de PCR foram

adquiridos em solução denominada Gene Expression Master Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). De acordo com o protocolo do produto, as temperaturas utilizadas na reação de PCR em tempo real foram:

- 1) um ciclo de 2min a 50°C
- 2) um ciclo de 10min a 95°C e
- 3) 40 ciclos intercalando 15s a 95°C e 1min a 60°C.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) e os resultados analisados pelo software StepOne versão 2.1 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Para a padronização dos controles endógenos foram escolhidos 6 genes constitutivos (TBP, PGK1, β 2-microglobulina, GAPDH, HPRT1 e RPLPO) à partir de levantamento da literatura (Lossos *et al.*, 2003; Arazi *et al.*, 2008) que foram testados em 9 amostras (3 do grupo HIPERALFA, 3 do HIPOALFA e 3 de indivíduos com concentração normal de HDL). Os resultados de expressão gênica destas amostras foram submetidos à análise no programa DataAssist versão 2.0 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), que se fundamenta nos princípios estabelecidos por Vandesompele *et al.* (2002) para escolha do controle endógeno. Os dois genes que apresentaram menor variação de expressão entre as amostras foram HPRT1 (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) e PGK1 (*phosphoglycerate kinase 1*), sendo eleitos os controles endógenos do

estudo. O método escolhido para o cálculo da quantificação relativa foi o Ct (*Cycle threshold*) comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmitgen, 2001) devido ao grande número de amostras e genes-alvo a serem analisados. Neste método não há necessidade de utilizar curva padrão em todas as placas, reduzindo consumo de tempo e reagentes. No entanto, para que este método possa ser utilizado é necessária validação das eficiências dos ensaios dos genes-alvo e dos controles endógenos, que devem ser semelhantes. Desta forma, para cada gene em questão foi feita curva de diluição de 5 pontos a fim de verificar a linearidade e eficiência da amplificação. A eficiência é calculada de acordo com a inclinação da curva e deve ser de 100%, aceitando-se variação de $\pm 10\%$. Para um ensaio de PCR em tempo real ter 100% de eficiência, a inclinação (*slope*) da curva deve ser próxima de -3,3 (Pfaffl, 2001). A **tabela 3** apresenta os dados das curvas obtidas.

Tabela 3. Valores obtidos nas curvas de validação do método Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$)

	SLOPE	Y-INTER	R²	% EFICIÊNCIA
HMGCoA	-3.209	31.239	0.980	104.920
ABCG1	-3.267	33.579	0.960	102.336
SR-BI	-3.391	33.623	0.992	97.196
LDLR	-3.508	31.904	0.998	92.773
ABCA1	-3.347	32.602	0.993	98.956
SREBP-1c	-3.165	32.145	0.991	106.998
LXR alfa	-3.378	32.280	0.993	97.700
HPRT1	-3.406	31.918	0.965	96.623

PGK1 -3.277 28.467 0.996 101.914

As curvas também permitiram determinar a concentração ideal de cDNA a ser usada em cada ensaio (10ng). Nossa intenção inicial era analisar também a expressão gênica dos receptores ABCG5, ABCG8 e NPC1-L1. Porém, percebemos que isso não seria possível uma vez que, nas células linfomononucleares, a expressão gênica destes receptores é muito baixa, mesmo quando o ensaio é realizado com concentrações elevadas de cDNA.

Em função do grande número de amostras e genes analisados, não foi possível realizar todas as reações de PCR ao mesmo tempo. Para minimizar a variação inter-ensaio, cada placa de reação continha sempre o mesmo número de amostras do grupo HIPERALFA e HIPOALFA. Além disso, no processo de obtenção final da quantificação relativa, os resultados foram analisados agrupando-se as amostras por grupos biológicos (HIPERALFA x HIPOALFA), tendo um deles como referência. No caso foi escolhido aleatoriamente o grupo HIPERALFA. Esta forma de análise foi amplamente discutida com o suporte científico da Applied Biosystems. Cada reação de PCR dos genes alvo sempre foi acompanhada, na mesma placa, dos dois controles endógenos, prática ideal recomendada na metodologia de PCR em tempo real (Bustin *et al.*, 2009). Os valores de Ct obtidos nas curvas de amplificação de cada gene foram configurados, na padronização inicial, para se situarem aproximadamente no ponto médio da fase exponencial, de acordo com as recomendações da

metodologia. Para cada gene foi utilizado sempre o mesmo Ct em todas as reações. Os valores da linha de base utilizados foram os estabelecidos pelo próprio *software* de análise (StepOne Plus versão 2.1) uma vez que se encontravam dentro dos parâmetros recomendados. O cálculo da quantificação relativa (RQ) é realizado pelo *software* e, resumidamente, baseia-se nas seguintes fórmulas:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene-alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}}$$

Onde o $Ct_{\text{gene-alvo}}$ e $Ct_{\text{controle endógeno}}$ correspondem à média dos valores de Ct das triplicatas. No caso de dois controles endógenos, como utilizado em nosso estudo, o *software* foi programado para levar em consideração o valor de ambos no cálculo. Em seguida, calcula-se o $\Delta\Delta Ct$. Para isso, escolhe-se uma amostra de referência ou um grupo biológico de referência. No nosso caso, conforme já mencionado, escolheu-se o grupo HIPERALFA. Primeiro normaliza-se o grupo de referência em relação a ele mesmo e, em seguida, normaliza-se o grupo HIPOALFA em relação ao grupo de referência:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Grupo HIPOALFA}} - \Delta Ct_{\text{Grupo Referência (HIPERALFA)}}$$

Finalmente, para o cálculo do valor da Quantificação Relativa (RQ), converte-se o valor do $\Delta\Delta Ct$ para $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.8 Conteúdo celular de colesterol

A massa de colesterol celular foi determinada por cromatografia gás-líquido acoplada a espectrofotômetro de massa (*Shimadzu GCMS-QP2010 Plus, Kyoto, Japan*), após extração lipídica (*Ahmida et al., 2006*). Resumidamente, as células foram centrifugadas para a remoção do tampão PBS em que foram armazenadas e, em seguida, foi adicionado 5 α -colestane, como padrão interno, e KOH diluído em etanol para saponificação. Os lípides desta amostra foram extraídos duas vezes com hexana e o extrato foi seco sob fluxo de nitrogênio e derivatizado com solução silanizante. A amostra derivatizada foi injetada no cromatógrafo e a separação foi realizada em coluna capilar, usando hélio como fase móvel. A quantificação baseou-se no cromatograma de íons totais com correção pelo padrão interno e a identificação baseou-se na comparação com os tempos de retenção e os espectros de massa de uma curva-padrão.

3.9 Atividade de LCAT

A taxa de esterificação de colesterol mediada pela LCAT foi medida utilizando-se substrato endógeno, de acordo com *Dobiasova et al. (1992)*. Em resumo, discos de papel-filtro Whatman contendo [4-¹⁴C]-colesterol livre

(0,1 μ Ci) foram incubados com Tris *buffer* (75 μ L) por 24h a 4°C. As amostras de HDL (30 μ L) foram, então, adicionadas e incubadas a 37°C por 30min e, em seguida, levadas ao banho de gelo a fim de inibir a atividade da LCAT. ¹⁴C-colesterol livre (CL) e ¹⁴C-colesterol éster (CE) foram separados por cromatografia de camada fina e sua radioatividade determinada por contador β LS 6000TA (*Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA*). A porcentagem de colesterol radioativo esterificado foi calculada da seguinte forma:

$$[CE / (CL + CE)] \times 100$$

3.10 Atividade de CETP

A atividade de CETP foi medida por método radioisotópico utilizando substrato exógeno (Lagrost, 1998). Em resumo, HDL e LDL + VLDL foram obtidas por ultracentrifugação à partir de um *pool* de plasma de doadores para medição *in vitro* da transferência de HDL [4-¹⁴C]-colesterol éster (¹⁴C-HDL, 50 μ L), correspondendo a uma concentração de colesterol total (40mg/dL), para LDL + VLDL (200 μ L), correspondendo a uma concentração de colesterol total (200mg/dL), após incubação (37°C e 4°C, 2h), com o plasma total dos participantes (10 μ L) em Tris *buffer* (40 μ L) como fonte de CETP. Após incubação, a fração contendo lipoproteínas ricas em apoB (LDL + VLDL) foi precipitada com sulfato de dextrana : cloreto de magnésio (1:1), centrifugada

(1000 x g por 30min) e a radioatividade medida em alíquota do sobrenadante contendo HDL (200µL), utilizando contador de radiação beta. A porcentagem de ¹⁴CE-HDL transferida foi calculada da seguinte forma:

$$[1 - (\text{radioatividade a } 37^{\circ}\text{C} / \text{radioatividade a } 4^{\circ}\text{C})] \times 100$$

3.11 Atividade de PLTP

A atividade de PLTP foi medida por método radiométrico exógeno (Damen *et al.*, 1982).

Foram preparados lipossomas radioativamente marcados, contendo fosfatidilcolina, ¹⁴C-fosfatidilcolina e hidroxitolueno butilado, para atuar como doadores de fosfolípidos. A mistura foi seca sob fluxo de nitrogênio e, após adição de tampão Tris, sonicada por 3 vezes durante 5min em gelo. Os lipossomas (15µL) foram incubados com HDL3 (250µg de proteína), funcionando como acceptora de fosfolípidos, na presença de plasma (10µL) dos voluntários do estudo (fonte de PLTP) diluído 1:10, em um volume final de 400uL, a 37°C por 45min. Após a incubação, a reação era interrompida com solução precipitante contendo MnCl₂ e heparina, centrifugada e o sobrenadante era coletado e utilizado na contagem da radioatividade. A transferência de fosfolípidos é determinada pela porcentagem de radioatividade no sobrenadante (HDL) em relação ao branco em nmoles de fosfatidilcolina (FC) /

mL / hora. Esta metodologia foi desenvolvida pela pós-graduanda Natália B. Panzoldo da UNICAMP durante estágio com Dr. Matti Jauhiainen do National Institute for Health and Welfare, Public Health Genomics Research Unit, Finlândia.

3.12 Lipase hepática e lipoproteína lipase – Atividade

As atividades das lipases foram medidas à partir de adaptação do método de Ehnholm & Kuusi (1986). Resumidamente, amostras de plasma eram obtidas após 15min da administração intravenosa de heparina (100U/Kg de peso). A atividade das lipases era medida em função da liberação de ácidos graxos, através do uso de uma emulsão de trioleína radioativamente marcada como substrato e NaCl 1M como inibidor de LPL. Os resultados são expressos em nmoles de ácidos graxos livres (AGL) / mL / hora.

3.13 Ultrassonografia de carótidas

A ultrassonografia com *doppler* de carótidas foi realizada pelo Dr. Rui Nakamura do Laboratório de Radiologia da UNICAMP no grupo de indivíduos HIPO e HIPERALFA da cidade de Campinas, de acordo com metodologia descrita previamente por Santiago *et al.* (2010).

3.14 Análise estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o programa GraphPad Prism versão 4.0 (*GraphPad Softwares, USA*). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste *t* de Student ou teste não paramétrico de Mann-Whitney, de acordo com a normalidade dos dados.

Os dados de expressão gênica foram analisados pelo método de estimação do intervalo de confiança e pelo teste *t* de Student, utilizando-se o programa JMP versão 9.0 (*SAS Institute, USA*).

O programa GraphPad InStat versão 3.05 (*GraphPad Softwares, USA*) foi utilizado nos estudos de matriz de correlação univariada.

Em todos os casos, foram consideradas significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância foi inferior a 5%.

4 RESULTADOS

Participaram do estudo 73 indivíduos, sendo 37 HIPOALFA (21 homens / 16 mulheres) e 36 HIPERALFA (20 homens / 16 mulheres). Os dados antropométricos e bioquímicos são apresentados nas **tabelas 4 e 5**, respectivamente.

Tabela 4. Dados antropométricos

	HIPOALFA	HIPERALFA	<i>P</i>
Idade (anos)	37 ± 11	45 ± 14	0,022
IMC (Kg/m²)	24,0 ± 2,4	23,5 ± 3,3	NS
Cintura (cm)	80 ± 9	80 ± 9	NS
Quadril (cm)	98 ± 8	96 ± 8	NS
Relação C/Q	0,79 ± 0,18	0,83 ± 0,07	NS

Relação C/Q: relação cintura/quadril. NS: não significante. Teste *t* de Student, média ± desvio padrão. *P* < 0,05.

Tabela 5. Dados Bioquímicos

	HIPOALFA	HIPERALFA	P
Colesterol Total (mg/dL)	159 ± 25	186 ± 30	<0,001
HDL-C (mg/dL)	34 ± 4	79 ± 13	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	97 ± 33	71 ± 34	0,002
LDL-C (mg/dL)	106 ± 22	93 ± 22	0,018
VLDL-C (mg/dL)	19 ± 7	14 ± 7	0,001
Glicose (mg/dL)	83 ± 8	84 ± 8	NS
Insulina (μU/mL)	6,5 ± 3,1	4,4 ± 1,8	<0,001
HOMA	1,35 ± 0,67	0,91 ± 0,39	0,001
Relação TG/HDL	3,00 ± 1,32	0,91 ± 0,42	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	NS
ALT (TGP) (U/L)	24 ± 16	16 ± 5	0,005
AST (TGO) (U/L)	20 ± 6	19 ± 3	NS
GamaGT (U/L)	21 ± 10	20 ± 11	NS
TSH (μU/mL)	2,3 ± 1,0	1,9 ± 1,1	NS
T4L (ng/dL)	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	NS
PCR-US (mg/L)	1,7 ± 2,0	2,1 ± 4,6	NS
Proteína Amiloide A (mg/L)	3,2 ± 2,8	6,4 ± 10,5	NS

HOMA: *Homeostasis Model Assessment*. ALT (TGP): alanina aminotransferase. AST (TGO): aspartato aminotransferase. GamaGT: gama glutamiltransferase. PCR-US: proteína C reativa ultra-sensível. NS: não significativa. Teste *t* de Student, média ± desvio padrão. PCR-US e proteína amiloide A: teste de Mann Whitney, média ± desvio padrão. $P < 0,05$.

Com relação às variáveis antropométricas, os grupos foram semelhantes exceto pela idade. Os indivíduos do grupo HIPERALFA apresentaram média de idade maior do que o grupo HIPOALFA. Os grupos diferiram com relação às concentrações de HDL-C, uma vez que este foi o critério de seleção utilizado. As concentrações de colesterol total entre os grupos foram diferentes em função das diferenças de HDL-C. Interessante notar que o grupo HIPOALFA

caracterizou-se por apresentar maior concentração de VLDL-C (e, consequentemente, triglicérides), insulina, índice HOMA, relação TG/HDL e ALT(TGP). Mesmo após análise por curva ROC, a fim de determinar a acurácia destas variáveis em discriminar os dois grupos, todas permaneceram como variáveis capazes de prever os grupos, o que nos leva a concluir que estas são variáveis relacionadas à causalidade. Dentre as variáveis acima citadas, VLDL-C foi a que mostrou melhor capacidade de discriminar os grupos. Não houve diferença entre os grupos com relação aos marcadores inflamatórios analisados: PCR-US e proteína amiloide A.

Os dados sobre os parâmetros que regulam o metabolismo lipídico e de ultrassonografia de carótidas são apresentados nas **tabelas 6 e 7**, respectivamente.

Tabela 6. Dados Metabolismo Lipídico

	HIPOALFA	HIPERALFA	P
ApoA-I (mg/dL)	84,8 ± 15,5	124,9 ± 19,4	<0,001
ApoB (mg/dL)	75,4 ± 21,7	71,8 ± 17,1	NS
ApoC-II (mg/dL)	3,1 ± 1,9	3,1 ± 1,5	NS
ApoC-III (mg/dL)	7,3 ± 3,1	6,7 ± 4,4	NS
ApoE (mg/dL)	2,1 ± 0,8	3,2 ± 1,2	<0,001
Pré-beta₁ HDL (mg/mL)	11,8 ± 5,7	22,4 ± 22,5	0.008
CETP (%CE)	13,6 ± 5,3	13,5 ± 4,5	NS
PLTP (nmol FC/mL/h)	6.247 ± 1.851	6.439 ± 1.617	NS
LCAT (%CE)	3,8 ± 1,8	2,8 ± 1,4	0,011
LPL (nmol AGL/mL/h)	2.403 ± 1.304	4.597 ± 2.616	<0,001
LH (nmol AGL/mL/h)	4.517 ± 1.622	3.159 ± 1.424	<0,001
Colesterol celular (µg col/mg protein)	325 ± 127	349 ± 152	NS

Apo: apolipoproteína. CETP: proteína de transferência de colesterol éster. LCAT: lecitina colesterol aciltransferase. LPL: lipoproteína lipase. LH: lipase hepática. PLTP: proteína de transferência de fosfolípidos. NS: não significativo. Teste *t* de Student, média ± desvio padrão. LPL e LH: teste de Mann Whitney, média ± desvio padrão. PLTP: teste de Kruskal-Wallis, média ± desvio padrão (Hiperalfa n = 66; Hipoalfa n = 34). Pré-beta₁ HDL: teste *t* de Student, , média ± desvio padrão (Hiperalfa n = 34; Hipoalfa n = 33). *P* < 0,05.

Tabela 7. Dados Ultrassonográficos

	HIPOALFA	HIPERALFA	P
EIM carótida D (mm)	0,62 ± 0,17	0,64 ± 0,22	NS
EIM carótida E (mm)	0,58 ± 0,13	0,64 ± 0,24	NS
EIM média D + E (mm)	0,60 ± 0,13	0,64 ± 0,23	NS

EIM: espessura íntima-média. D: direita. E: esquerda. NS: não significativo. Teste *t* de Student, média ± desvio padrão. (Hiperalfa n = 21; Hipoalfa: n = 21). *P* < 0,05.

Como esperado, a concentração de apoA-I foi maior no grupo HIPERALFA, uma vez que esta apolipoproteína está presente

fundamentalmente nas partículas de HDL. A apoE está presente em quilomícrons e VLDL, mas também é componente importante da HDL. Sua concentração foi maior no grupo HIPERALFA, assim como a concentração de pré-beta₁ HDL, partículas precursoras da HDL. Não houve diferença entre os grupos com relação às atividades de CETP e PLTP e conteúdo celular de colesterol. Identificamos maior atividade da LCAT no grupo HIPOALFA, assim como maior lipase hepática e menor lipase lipoproteica nestes indivíduos, quando comparados aos HIPERALFA. Não houve diferença entre os grupos quanto à ultrassonografia de carótidas.

Os dados de expressão gênica por grupo biológico são apresentados na **figura 6, painéis A a G.**

C

D

E

F

G **Figuras 6. Resultados das análises de expressão gênica**

A: ABCA1. **B:** ABCG1. **C:** SR-BI. **D:** LDLR. **E:** SREBP-1c. **F:** LXR alfa.

G: HMG CoA redutase. RQ: quantificação relativa. NS: não significativa.

Resultado por grupo biológico. Teste *t* de Student.

Não houve diferença entre os grupos com relação à expressão gênica dos genes analisados.

Os resultados da análise de matriz de correlação univariada são apresentados na **tabela 8**.

Tabela 8. Matriz de Correlação Univariada - Resultados

Variável	<i>r</i>
IMC x cintura	0,5669
LDL-C x idade	0,5098
LPL x idade	-0,5052
Triglicérides x HDL-C	-0,6227
HOMA x cintura	0,5700
HOMA x LPL	-0,5270
LPL x Pressão Arterial (média)	-0,5154
<i>Expressão gênica</i>	
ABCA1 x ABCG1	0,514
LDLR x SR-BI	0,605
ABCA1 x HMGC _o A redutase	0,615
SREBP-1c x ABCG1	0,713
SREBP-1c x LDLR	0,676
SREBP-1c x SR-BI	0,546
LXR alfa x HMGC _o A redutase	-0,545

IMC: índice de massa corporal. LPL: lipoproteína lipase. HOMA: Homeostasis Model Assessment. $P < 0,05$.

A proposta inicial do estudo era analisar a expressão proteica dos receptores ABCA1, ABCG1 e SR-BI através da metodologia de *Western Blotting*, considerada padrão-ouro. Embora esta metodologia esteja bem padronizada em nosso laboratório, não foi possível obter sinal de quimioluminescência a partir de nossas amostras para as proteínas estudadas. A hipótese mais provável é que o método não tenha sensibilidade suficiente para detectar as proteínas de interesse no tipo celular que escolhemos, uma vez que a massa destas proteínas deve ser muito pequena nas células linfomononucleares. De fato, não encontramos na literatura trabalhos que

tenham obtido sucesso empregando modelo e metodologia semelhantes. Há, sim, trabalhos realizados com células linfomononucleares tratadas com estímulos diversos a fim de aumentar a expressão proteica destes receptores. Tentamos, ainda, avaliar a expressão proteica de ABCA1 por meio de um kit de ELISA disponível comercialmente (*USCN Life Science Inc., Wuhan, China*), mas os valores das amostras eram inferiores ao limite de detecção do kit. Apesar de não termos obtido sucesso nesta metodologia por razões intrínsecas ao modelo escolhido, acreditamos que não houve prejuízo ao resultado final do estudo.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que a resistência à insulina é a principal condição subjacente que determina as alterações lipídicas características da síndrome metabólica (redução de HDL-C e trigliceridemia elevada) e que indivíduos resistentes à insulina, mesmo não diabéticos, já manifestam este fenótipo (Ginsberg *et al.*, 2006). Estas alterações lipídicas são, portanto, marcadores bastante precoces de síndrome metabólica. Em nosso estudo, mostramos que o grupo HIPOALFA apresenta valores de trigliceridemia, insulinemia e HOMA maiores do que o grupo HIPERALFA, apesar de não diferirem com relação a parâmetros relacionados à síndrome metabólica, como glicemia, IMC e circunferência de cintura. Além disso, a relação TG/HDL, considerada excelente preditora de resistência insulínica, foi maior no grupo HIPOALFA. A concentração de ALT(TGP) do grupo HIPOALFA, embora normal, também foi maior que a do grupo HIPERALFA. Como se sabe, a elevação desta transaminase é marcador precoce de doença gordurosa hepática não-alcoólica. Esta condição tem sido diretamente relacionada à resistência insulínica e a aumento da lipólise em tecido adiposo visceral, com consequente aporte aumentado de ácidos graxos livres ao fígado (Fraser *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2011). É possível que o grupo HIPOALFA represente uma população em estágio inicial de resistência insulínica, mas ainda sem o fenótipo completo de síndrome

metabólica. Importante ressaltar que em outros estudos que empregaram indivíduos que diferiam com relação à concentração de HDL-C também se nota a associação de HDL-C baixo e quadro subclínico de resistência insulínica (Pirro *et al.*, 2003; Nakanishi *et al.*, 2009; Yetukuri *et al.*, 2010).

Sabe-se que, nos estados de resistência insulínica, a redução das concentrações de HDL-C no plasma deve-se a um efeito combinado do enriquecimento das HDL em triglicérides e aumento da atividade da lipase hepática. Devido ao aumento da disponibilidade de VLDL na circulação, há maior oferta de triglicérides para as partículas de HDL, em troca de colesterol esterificado, mediada pela CETP. Enriquecida em triglicérides, a partícula de HDL torna-se mais susceptível à ação da lipase hepática que, ao atuar sobre a HDL, muda sua conformação e desestabiliza apoA-I, que se desprende e é catabolizada (Rashid *et al.*, 2003). Vários estudos associam aumento da atividade da lipase hepática pós-heparina, baixas concentrações de HDL-C no plasma e estados em que a resistência insulínica sabidamente está presente, como obesidade (Despres *et al.*, 1989) e diabetes melito tipo 2 (Laakso *et al.*, 1987; Riemens *et al.*, 2001). A lipoproteína lipase participa de maneira importante na formação e maturação da HDL uma vez que promove a lipólise e consequente desprendimento de componentes de superfície (lípidos e apolipoproteínas) das partículas ricas em apoB, que serão usados na composição da partícula de HDL. Indivíduos homozigotos para deficiência de lipoproteína lipase apresentam baixas concentrações de HDL no plasma (Miller

& Zhan, 2004). Diabéticos tipo 2 apresentam redução da atividade da lipoproteína lipase, especialmente quando o controle glicêmico é deficiente, e baixas concentrações de HDL-C no plasma (de Vries *et al.*, 2003). Em nosso estudo, o grupo HIPOALFA apresentou maior atividade de lipase hepática e menor atividade de lipoproteína lipase, perfil semelhante ao encontrado nos portadores de resistência insulínica e diabetes melito tipo 2, fato que reforça a presença de um quadro subclínico de resistência insulínica. Neste contexto, destacamos a relação inversa entre lipoproteína lipase e HOMA encontrada na análise de matriz de correlação.

Não houve diferença entre os grupos com relação às atividades de CETP e PLTP, nem na expressão gênica de receptores que participam na síntese de HDL (ABCA1 e ABCG1). Levando em consideração que todos estes componentes participam na biogênese da HDL, podemos atribuir as baixas concentrações de HDL do grupo HIPOALFA às alterações nas atividades das lipases pós-heparina.

CETP e PLTP estão associadas à inflamação e aterogênese, embora o papel que cada uma desempenha nestes processos ainda seja controverso (Quintão & Cazita, 2010; Oliveira & de Faria, 2011). Existem evidências de que há aumento na atividade de CETP em portadores de síndrome metabólica na presença de concentrações elevadas de triglicérides (Park *et al.*, 2010). Nosso grupo HIPOALFA apresentou atividade de CETP e trigliceridemia semelhantes à do grupo HIPERALFA. Também não houve diferença entre os grupos com

relação aos marcadores inflamatórios analisados, atividade de PLTP e ultrassom de carótidas. Estes achados não nos surpreendem uma vez que as alterações metabólicas descritas no grupo HIPOALFA são compatíveis com um quadro muito precoce de resistência insulínica, cuja repercussão inflamatória e aterogênica deve ser ainda bastante inicial.

As partículas de pré-beta₁ HDL desempenham papel fundamental no transporte reverso de colesterol por promoverem o efluxo de colesterol celular (Favari *et al.*, 2009). Apesar disso, é descrita correlação positiva entre as concentrações de pré-beta₁ HDL e a medida da espessura de carótidas (de Vries *et al.*, 2012), assim como entre pré-beta₁ HDL e a incidência de doença cardiovascular (Guey *et al.*, 2011). No entanto, existem evidências de que a relação de pré-beta₁ HDL com a aterogênese é independente das concentrações de HDL-C (Sethi *et al.*, 2010). Em nosso estudo encontramos concentrações de pré-beta₁ HDL mais altas no grupo HIPERALFA em relação ao HIPOALFA. Isto faz sentido do ponto de vista fisiológico, uma vez que é esperado encontrar maior concentração de partículas precursoras da HDL (pré-beta₁ HDL) no grupo que apresenta maiores concentrações de HDL. Neste caso, as concentrações de pré-beta₁ HDL seriam dependentes das concentrações de HDL-C. Acreditamos que o mecanismo que eleva a pré-beta₁ HDL no grupo HIPERALFA em relação ao HIPOALFA seja diferente do mecanismo envolvido na elevação da pré-beta₁ HDL nos indivíduos com doença cardiovascular.

As partículas de HDL transportam pelo menos 75 tipos diferentes de proteínas, entre elas a LCAT (Reilly & Tall, 2007). Seria de se esperar que quanto maior a concentração de HDL, maior a concentração de LCAT e, conseqüentemente, maior sua atividade. No entanto, nosso estudo mostrou que o grupo HIPOALFA apresenta atividade de LCAT aumentada em relação ao grupo HIPERALFA. Achados semelhantes foram descritos em indivíduos com diminuição da sensibilidade à insulina (Riemens *et al.*, 1999a) e portadores de síndrome metabólica (Dullaart *et al.*, 2008). Além disso, estudos mostram que a atividade da LCAT aumenta em paralelo com o índice de massa corpórea (Dullaart *et al.*, 1994) e com a disponibilidade de ácidos graxos livres na circulação (Riemens *et al.*, 1999b). Permanece desconhecida a explicação para a elevação da LCAT nestes casos, que têm em comum a diminuição da sensibilidade à insulina. Uma possível justificativa é que haja um aumento na expressão da LCAT pelo fígado, a fim de estimular o transporte reverso de colesterol, tendo em vista a elevação da síntese de colesterol neste órgão traduzida pela elevação de precursores de síntese de colesterol no plasma.

Estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório (Nunes *et al.*, 2011) com a mesma casuística mostrou que o grupo HIPOALFA apresenta menor absorção intestinal de colesterol alimentar, representada pelos marcadores esteróis campesterol e sitosterol dosados no plasma, em relação ao grupo HIPERALFA. Além disso, o grupo HIPOALFA apresentou maior síntese hepática de colesterol, representada pelo marcador plasmático latosterol. É

interessante notar que o mesmo padrão de alteração nos marcadores de síntese e absorção de colesterol é encontrado em portadores de síndrome metabólica (Assmann *et al.*, 2007), diabetes melito tipo 2 (Simonen *et al.*, 2002) e mesmo em indivíduos normoglicêmicos com resistência insulínica (Pihlajamäki *et al.*, 2004). Tais alterações foram independentes do peso (Simonen *et al.*, 2002; Gylling *et al.*, 2010), apontando para a resistência insulínica como principal fator fisiopatológico. De acordo com estas evidências, acreditamos que as alterações nos marcadores de síntese e absorção de colesterol alimentar podem ser consideradas marcadores precoces de resistência insulínica e o fato de tais alterações estarem presentes no grupo HIPOALFA corrobora nossa hipótese de que estes indivíduos apresentam fenótipo subclínico de resistência insulínica.

Um dos objetivos de nosso estudo era melhorar a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas alterações do metabolismo de colesterol encontradas em nossa investigação prévia (Nunes *et al.*, 2011). Para tal, utilizamos como modelo, células linfomononucleares de sangue periférico por serem de fácil obtenção e por, sabidamente, refletirem o que ocorre no hepatócito com relação à expressão da enzima HMG CoA redutase e receptores de LDL (Powell & Kroon, 1994; Aggarwal *et al.*, 2006). Acreditamos que os linfomonócitos também representem o metabolismo de colesterol das células em geral do organismo, com exceção de macrófagos da parede arterial e intestino. No entanto, não houve diferença na expressão gênica em nenhum

dos genes analisados. Houve apenas tendência de maior expressão da HMG CoA redutase no grupo HIPOALFA ($P = 0,07$), o que concordaria com nossos achados prévios de marcadores de síntese hepática mais elevados neste grupo. Também não houve diferença com relação ao conteúdo celular de colesterol. Este resultado não nos surpreende uma vez que não houve diferença na expressão de receptores que regulam a entrada (LDLR e SR-BI) e saída de colesterol (ABCA1 e ABCG1) da célula, responsáveis por manter a fina regulação da concentração intracelular de colesterol.

Os resultados da matriz de correlação univariada relacionados à expressão gênica mostraram-se bastante interessantes uma vez que reforçam o papel fisiológico e a integração existente entre os receptores e fatores de transcrição analisados. Os receptores ABCA1 e ABCG1 apresentaram correlação positiva, como esperado, uma vez que participam de maneira coordenada no efluxo de colesterol celular. Raciocínio análogo pode ser aplicado aos receptores de LDL e SR-BI que controlam a entrada de colesterol na célula e também apresentaram correlação positiva. SREBP-1c e LXR alfa são fatores reguladores críticos para o metabolismo lipídico, por isso não nos surpreende as correlações encontradas entre eles e receptores fundamentais para a regulação intracelular de colesterol, além da HMG CoA redutase.

É importante citar a relação que vem sendo descrita nos últimos anos entre os receptores ABCA1 nas células beta pancreáticas e a secreção insulínica. O receptor ABCA1, que desempenha papel fundamental no efluxo

celular de colesterol e na manutenção da concentração de HDL-C no plasma, tem sido associado à prevenção do acúmulo de lípidos em células beta pancreáticas e melhora de sua função secretória (Fryirs *et al.*, 2010). Portadores de mutação com perda de função do receptor ABCA1 apresentam déficit de secreção de insulina, na presença (Koseki *et al.*, 2009) ou não de resistência insulínica (Vergeer *et al.*, 2010b). Em modelo animal *knockout* para o gene *Abca1* também se demonstrou prejuízo na secreção de insulina e na homeostase de glicose (Brunham *et al.*, 2007). Além disso, tem sido descrito, em portadores de polimorfismos de ABCA1, maior incidência de diabetes melito tipo 2. Esta associação parece ser independente das concentrações de HDL-C, uma vez que ocorre tanto em populações com baixas concentrações de HDL-C (Villarreal-Molina *et al.*, 2008; Saleheen *et al.*, 2006), como em portadores de concentração de HDL-C normal (Daimon *et al.*, 2005). Por outro lado, existem evidências de que a HDL modula diretamente o metabolismo da glicose por estimular a proteína quinase ativada por AMP no músculo esquelético (Drew *et al.*, 2009), melhorando a sensibilidade à insulina. Este achado tem impulsionado o desenvolvimento de novas terapias baseadas no uso de HDL recombinante a fim de melhorar a sensibilidade à insulina em pacientes pós-infarto (Carvalho *et al.*, 2012) e modular o metabolismo de ácidos graxos, inibindo a lipólise induzida pelo jejum (Drew *et al.*, 2011). Todos estes aspectos que relacionam a HDL a alterações na homeostase da glicose devem ser lembrados em nosso estudo, uma vez que nele tratamos de uma população com baixas concentrações de HDL-C que apresenta indícios de resistência à insulina. É

possível que estudos genéticos posteriores desta população venham a revelar polimorfismos de ABCA1 que possam estar contribuindo para este fenótipo. É possível, ainda, que esta população se beneficie de terapias baseadas nas elevações das concentrações de HDL e seus efeitos de melhora na homeostase glicêmica.

Nosso estudo foi o primeiro a descrever, numa população que difere apenas com relação às concentrações de HDL-C no plasma, um quadro subclínico de resistência insulínica no grupo HIPOALFA, associado à alteração em parâmetros que regulam as concentrações de lipoproteínas no plasma. É provável que a resistência insulínica seja a origem destes achados, mas o mecanismo fisiopatológico envolvido permanece desconhecido.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que indivíduos com concentrações alta ou baixa de HDL-C no plasma diferem com relação à sensibilidade à insulina, além de parâmetros envolvidos na regulação do metabolismo de lipoproteínas. Estes achados não se relacionaram com o metabolismo celular de colesterol no modelo estudado. De acordo com nosso estudo prévio (Nunes *et al.*, 2011), estes indivíduos diferem, ainda, com relação aos marcadores plasmáticos de síntese e absorção de colesterol no plasma. É possível que este quadro preceda o aparecimento de outras alterações típicas da síndrome metabólica no grupo com baixas concentrações de HDL-C no plasma.

7 REFERÊNCIAS

ADIELS M, OLOFSSON SO, TASKINEM MR, BORÉN J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(7):1225-1236, 2008.

AGGARWAL D, FREAKE HC, SOLIMAN GA, DUTTA A, FERNANDEZ ML. Validation of using gene expression in mononuclear cells as a marker for hepatic cholesterol metabolism. *Lipids in Health and Disease.* 5:22, 2006.

AHMIDA HS, BERTUCCI P, FRANZÒ L, MASSOUD R, CORTESE C, LALA A, FEDERICI G. Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 842(1):43-47, 2006.

ARAZI SS, GENVIGIR FD, WILLRICH MA, HIRATA MH, DOREA EL, BERNIK M, *et al.* Atorvastatin effects on SREBF1a and SCAP gene expression in mononuclear cells and its relation with lowering-lipids response. *Clin Chim Acta.* 393(2):119-24, 2008.

ASSMANN G, SCHULTE H, VON ECKARDSTEIN A, HUANG Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis.* 124 Suppl:S11-20, 1996.

ASSMANN G, CULLEN P, KANNENBERG F, SCHULTE H. Relationship between phytosterol levels and components of the metabolic syndrome in the PROCAM study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 14(2):208-214, 2007.

BARTER PJ, NICHOLLS S, RYE KA, ANANTHARAMAIAH GM, NAVAB M, FOGELMAN AM. Anti-inflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 95:764-772, 2004.

BOYUM A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 97:77-89, 1968.

BRUNHAM LR, KRUIT JK, PAPE TD, TIMMINS JM, REUWER AQ, VASANJI Z, MARSH BJ, *et al.* β -cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med.* 13(3):340-347, 2007.

BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 55(4):611-622, 2009.

CARVALHO LS, CINTRA RM, MOURA FA, MARTINS NV, QUINAGLIA E, SILVA JC, COELHO OR, ESPOSITO AC; on behalf of the Brasilia Heart Study Group. High plasma HDL-C attenuates stress hyperglycemia during acute phase of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 220(1):231-236, 2012.

CHEN G, LIANG G, GOLDSTEIN JL, BROWN MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation

of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(31):11245-11250, 2004.

DAIMON M, KIDO T, BABA M, OIZUMI T, JIMBU Y, KAMEDA W, YAMAGUCHI H, *et al*. Association of the ABCA1 gene polymorphisms with type 2 DM in a Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun*. 329(1):205-210, 2005.

DAMEN J, REGTS J, SCHERPHOF G. Transfer of [¹⁴C]phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein. Partial purification of a transfer-stimulating plasma factor using a rapid transfer assay. *Biochim Biophys Acta*. 712(3):444-52, 1982.

DE FRONZO R, TOBIN J, ANDRES R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and insulin resistance. *Am J Physiol*. 237:E214-223, 1979.

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*. 49(11-12):601-613, 2003.

DE VRIES R, PERTON FG, VAN TOL A, DULLAART RP. Carotid intima media thickness is related positively to plasma pre β -high density lipoprotein in non-diabetic subjects. *Clin Chim Acta*. 413(3-4):473-477, 2012.

DESPRES JP, FERLAND M, MOORJANI S, NADEAU A, TREMBLAY A, LUPIEN PJ, THÉRIAULT G, *et al*. Role of hepatic-triglycerides lipase activity in the association between intra-abdominal fat and plasma HDL cholesterol in obese women. *Arterioscler*. 9:485-492, 1989.

DOBIASOVA M, STRIBRNA J, PRITCHARD PH, FROHLICH JJ. Cholesterol esterification rate in plasma depleted of very low and low density lipoproteins is controlled by the proportion of HDL2 and HDL3 subclasses: study in hypertensive and normal middle-aged and septuagenarian men. *J Lipid Res.* 33(10):1411-1418, 1992.

DREW BG, DUFFY SJ, FORMOSA MF, NATOLI AK, HENSTRIDGE DC, PENFOLD SA, THOMAS WG, *et al.* High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 119(15):2103-2111, 2009.

DREW BG, CAREY AL, NATOLI AK, FORMOSA MF, VIZI D, REDDY-LUTHMOODOO M, WEIR JM, *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein infusion modulates fatty acid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Lipid Res.* 52(3):572-581, 2011.

DULLAART RPF, SLUITER WJ, DIKKESCHEI LD, HOOGENBERG K, VAN TOL A. Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism. *Eur J Clin Invest.* 24:188-194, 1994.

DULLAART RPF, PERTON F, SLUITER WJ, DE VRIES R, VAN TOL A. Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity is elevated in metabolic syndrome and is an independent marker of increased carotid artery intima media thickness. *J Clin Endocrinol Metab.* 93(12):4860-4866, 2008.

EHNHOLM C, KUUSI T. Preparation, characterization, and measurement of hepatic lipase. *Methods Enzymol.* 129:716-38, 1986.

FAVARI E, CALABRESI L, ADORNI MP, JESSUP W, SIMONELLI S, FRANCESCHINI G, BERNINI F. Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry*. 48(46):11067-11074, 2009.

FAZIO S, LINTON MF. High density lipoprotein therapeutics and cardiovascular prevention. *J Clin Lipidol*. 4(5):411-419, 2010.

FRANCESCHINI G, CALABRESI L, CHIESA G, PAROLINI C, SIRTORI CR, CANAVESI M, *et al*. Increased cholesterol efflux potential of sera from ApoA-I Milano carriers and transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19(5):1257-1262, 1999.

FRASER A, HARRIS R, SATTAR N, EBRAHIM S, DAVEY SMITH G, LAWLOR DA. Alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, and incident diabetes: the British Women's Heart and Health Study and meta-analysis. *Diabetes Care*. 32(4):741-750, 2009.

FRIEDEWALD WT, LEVY RI, FREDRICKSON DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 18(6):499-502, 1972.

FRYIRS MA, BARTER PJ, APPAVOO M, TUCH BE, TABET F, HEATHER AK, RYE KA. Effects of high-density lipoproteins on pancreatic beta-cell insulin secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30(8):1642-1648, 2010.

GINSBERG HN, ZHANG YL, HERNANDEZ-ONO A. Metabolic syndrome: focus on dyslipidemia. *Obesity*. 14:41S-49S, 2006.

GYLLING H, HALLIKAINEN M, PIHLAJAMÄKI J, SIMONEN P, KUUSISTO J, LAAKSO M, MIETTINEN TA. Insulin sensitivity regulates cholesterol metabolism to a greater extent than obesity: lessons from the METSIM study. *J Lipid Res.* 51:2422-2427, 2010.

GUEY LT, PULLINGER CR, ISHIDA BY, O'CONNOR PM, ZELLNER C, FRANCONI OL, LARAMIE JM, *et al.* Relation of increased prebeta-1 high-density lipoprotein levels to risk of coronary heart disease. *Am J Cardiol.* 108(3):360-366, 2011.

IOZZO P. Viewpoints on the way to the consensus sessions: where does insulin resistance start? The adipose tissue. *Diabetes Care.* 32 Suppl2:S186-173, 2009.

JACOBS M, VAN GREEVENBROEK MM, VAN DER KALLEN CJ, FERREIRA I, FESKENS EJ, JANSEN EH, SCHALKWIJK CG, *et al.* The association between the metabolic syndrome and alanine amino transferase is mediated by insulin resistance via related metabolic intermediates (the Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht [CODAM] study). *Metabolism.* 60(7):969-975, 2011.

KESÄNIEMI YA, MIETTINEN TA. Cholesterol absorption efficiency regulates plasma cholesterol level in the Finnish population. *Eur J Clin Invest.* 17:391-5, 1987.

KONTUSH A, CHAPMAN MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol.* 21(4):312-318, 2010.

KOSEKI M, MATSUYAMA A, NAKATANI K, INAGAKI M, NAKAOKA H, KAWASE R, YUASA-KAWASE M, *et al.* Impaired insulin secretion in four

Tangier disease patients with ABCA1 mutations. *J Atheroscler Thromb.* 16(3):292-296, 2009.

LAAKSO M, SARLUND H, EHNHOLM C, VOUTILAINEN E, ARO A, PYÖRÄLÄ K. Relationship between postheparin plasma lipases and high-density lipoprotein cholesterol in different types of diabetes. *Diabetologia.* 30:703-706, 1987.

LAGROST L. Determination of the mass concentration and the activity of the plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Meth Mol Biol.* 110:231-241, 1998.

LI C, FORD ES, MENG YX, MOKDAD AH, REAVEN GM. Does the association of the triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol ratio with fasting serum insulin differ by race/ethnicity? *Cardiovasc Diabetol.* 7:4, 2008.

LIVAK KJ, SCHMITGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods.* 25:402-408, 2001.

LOSSOS IS, CZERWINSKI DK, WECHSER MA, LEVY R. Optimization of quantitative realtime RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia.* 17:789-795, 2003.

MIETTINEN TA, GYLLING H. Cholesterol absorption efficiency and sterol metabolism in obesity. *Atherosclerosis.* 153:241-248, 2000.

MILLER M, ZHAN M. Genetic determinants of low high density lipoprotein cholesterol. *Curr Opin Lipidol.* 19(4):380-384, 2004.

MINEO C, DEGUCHI H, GRIFFIN JH, SHAUL PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 98:1352-1364, 2006.

MORIYAMA Y, OKAMURA T, INAZU A, DOI M, ISO H, MOURI Y, *et al.* A low prevalence of coronary heart disease among subjects with increased high-density lipoprotein cholesterol levels, including those with plasma cholesteryl ester transfer protein deficiency. *Prev Med.* 27 (5 Pt 1): 659-667, 1998.

MOSIG S, RENNERT K, BÜTTNER P, KRAUSE S, LÜTJOHANN D, SOUFI M, *et al.* Monocytes of patients with familial hypercholesterolemia show alterations in cholesterol metabolism. *BMC Med Genomics.* 1:60, 2008.

MOVVA R, RADER DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem.* 54(5):788-800, 2008.

NAJAFI-SHOUSHTARI SH, KRISTO F, LI Y, SHIODA T, COHEN DE, GERSZTEN RE, *et al.* MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science.* 328(5985):1566-1569, 2010.

NAKANISHI S, VIKSTEDT R, SÖDERLUND S, LEE-RUECKERT M, HIUKKA A, EHNHOLM C, *et al.* Serum, but not monocyte macrophage foam cells derived from low HDL-C subjects, displays reduced cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res.* 50:183-192, 2009.

NATARAJAN S, GLICK H, CRIQUI M, HOROWITZ D, LIPSITZ SR, KINOSIAN B. Cholesterol measures to identify and treat individuals at risk for coronary heart disease. *Am J Prev Med.* 25(1):50-57, 2003.

NUNES VS, LEANÇA CC, PANZOLDO NB, PARRA E, CAZITA PM, NAKANDAKARE ER, FARIA EC. *et al.* HDL-C concentration is related to markers of absorption and of cholesterol synthesis: study in subjects with low vs high HDL-C. *Clin Chim Acta.* 412: 176-180, 2011.

OLIVEIRA HCF, DE FARIA EC. Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB Life.* 63(4):248-257, 2011.

PAN JJ, QU HQ, RENTFRO A, MCCORMICK JB, FISHER-HOCH SP, FALLON MB. Prevalence of metabolic syndrome and risks of abnormal serum alanine aminotransferase in Hispanics: a population-based study. *PLoS One.* 6(6):e21515, 2011.

PARK KH, SHIN DG, KIM JR, HONG JH, CHO KH. The functional and compositional properties of lipoproteins are altered in patients with metabolic syndrome with increased cholesteryl ester transfer protein activity. *Int J Mol Med.* 25:129-136, 2010.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45, 2001.

PIHLAJAMÄKI J, GYLLING H, MIETTINEN TA, LAAKSO M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. *J Lip Res.* 45(3):507-512, 2004.

PIRRO M, SIEPI D, LUPATTELLI G, ROSCINI AR, SCHILLACI G, GEMELLI F, VAUDO G *et al.* Plasma C-reactive protein in subjects with hypo/hyperalphalipoproteinemias. *Metabolism.* 52: 432-436, 2003.

POWELL EE, KROON PA. Low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in human mononuclear leukocytes is regulated coordinately and parallels gene expression in human liver. *J Clin Invest.* 93(5):2168-2174, 1994.

RADER DJ, ALEXANDER ET, WEIBEL GL, BILLHEIMER J, ROTHBLAT GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res.* 50:S189-194, 2009.

QUINTÃO EC, CAZITA PM. Lipid transfer proteins: past, present and perspectives. *Atherosclerosis.* 209(1):1-9, 2010.

RASHID S, WATANABE T, SAKAUE T, LEWIS GF. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglycerides enrichment and elevated hepatic lipase activity. *Clin Biochem.* 36:421-429, 2003.

REILLY MP, TALL AR. HDL proteomics: pot of gold or Pandora's box? *J Clin Invest.* 117(3):595-598, 2007.

RIEMENS SC, VAN TOL A, STULP BK, DULLAART RPF. Influence of insulin sensitivity and the TaqIB cholesteryl ester transfer protein gene polymorphism on plasma lecithin: cholesterol acyltransferase and lipid transfer protein activities and their response to hyperinsulinemia in non-diabetic men. *J Lipid Res.* 40:1467-1474, 1999a.

RIEMENS SC, VAN TOL A, SLUITER WJ, DULLAART RPF. Acute and chronic effects of a 24-hour intravenous triglycerides emulsion challenge on plasma

lecithin: cholesterol acyltransferase, phospholipid transfer protein, and cholesterol ester transfer protein activities. *J Lipid Res.* 40:1459-1466, 1999b.

RIEMENS SC, VAN TOL A, SCHEEK LM, DULLAART RP. Plasma cholesteryl ester transfer and hepatic lipase activity are related to high-density lipoprotein cholesterol in association with insulin resistance in type 2 diabetic and non-diabetic subjects. *Scand J Clin Lab Invest.* 61(1):1-9, 2001.

RITSCH A, SCHARNAGL H, ELLER P, TANCEVSKI I, DUWENSEE K, DEMETZ E, *et al.* Cholesteryl ester transfer protein and mortality in patients undergoing coronary angiography: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Circulation.* 121(3):366-374, 2010.

SALEHEEN D, NAZIR A, KHANUM S, HAIDER SR, FROSSARD PM. R1615P: a novel mutation in ABCA1 associated with low levels of HDL and type II diabetes mellitus. *Int J Cardiol.* 110(2):259-260, 2006.

SANTIAGO FD, NAKAMURA RT, KAPLAN D, DE FARIA EC. Protective modulation of carotid atherosclerosis in hyperalphalipoproteinemic individuals. *Int J Cardiovasc Imaging.* 26(1):27-34, 2010.

SCHAEFER EJ, ASZTALOS BF. Cholesteryl ester transfer protein inhibition, high-density lipoprotein metabolism and heart disease risk reduction. *Curr Opin Lipidol.* 17(4):394-398, 2006.

SETHI AA, SAMPSON M, WARNICK R, MUNIZ N, VAISMAN B, NORDESTGAARD BG, TYBJAERG-HANSEN A, *et al.* High pre-beta1 HDL concentrations and low lecithin: cholesterol acyltransferase activities are strong positive risk markers for ischemic heart disease and independent of HDL-cholesterol. *Clin Chem.* 56(7):1128-1137, 2010.

SIRTORI CR, CALABRESI L, FRANCESCHINI G, BALDASSARE D, AMATO M, JOHANSSON J, *et al.* Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-I (Milano) mutant: the Limone sul Garda study. *Circulation*. 103(15):1949-1954, 2001.

SIMONEN PP, GYLLING H, HOWARD AN, MIETTINEN TA. Introducing a new component of the metabolic syndrome: low cholesterol absorption. *Am J Clin Nutr*. 72:82-88, 2000.

SIMONEN PP, GYLLING HK, MIETTINEN TA. Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless of obesity. *Diabetes Care*. 25(9): 1511-1515, 2002.

THOMPSON A, DI ANGELANTONIO E, SARWAR N, ERQOU S, SALEHEEN D, DULLAART R, *et al.* Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA*. 299(23):2777-2788, 2008.

TSAI MY, JOHNSON C, KAO WH, SHARRETT AR, ARENDS VL, KRONMAL R, *et al.* Cholesteryl ester transfer protein genetic polymorphisms, HDL cholesterol, and subclinical cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 200(2):359-367, 2008.

TSOMPANIDI EM, BRINKMEIER MS, FOTIADOU EH, GIAKOUMI SM, KYPREOS KE. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 208(1):3-9, 2010.

VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, DE PAEPE A, SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-

PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3(7):0034.1-0034.11, 2002.

VERGEER M, HOLLEBOOM AG, KASTELEIN JJP, KUIVENHOVEN JA. The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis? *J Lipid Res*. 51:2058-2073, 2010a.

VERGEER M, BRUNHAM LR, KOETSVELD J, KRUIT JK, VERCHERE CB, KASTELEIN JJ, HAYDEN MR, *et al*. Carriers of loss-of-function mutations in ABCA1 display pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes Care*. 33(4):869-874, 2010b.

VILLARREAL-MOLINA MT, FLORES-DORANTES MT, ARELLANO-CAMPOS O, VILLALOBOS-COMPARAN M, RODRÍGUEZ-CRUZ M, MILIAR-GARCÍA A, HUERTAS-VAZQUEZ A, *et al*. Association of the ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant with early-onset type 2 diabetes in a Mexican population. *Diabetes*. 57(2):509-513, 2008.

WEISSGLAS-VOLKOV D, PAJUKANTA P. Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. *J Lipid Res*. 51:2032-2057, 2010.

WILSON PW, ABBOTT RD, CASTELLI WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis*. 8(6):737-741, 1988.

YETUKURI L, SÖDERLUND S, KOIVUNIEMI A, SEPPÄNEN-LAAKSO T, NIEMELÄ PS, HYVÖNEN M, TASKINEN MJ, *et al*. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. *J Lipid Res*. 51: 2341-2351, 2010.

YU L, YORK J, VON BERGMANN K, LUTJOHANN D, COHEN JC, HOBBS HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem.* 278:15565-15570, 2003.

ZHONG S, SHARP DS, GROVE JS, BRUCE C, YANO K, CURB JD, *et al.* Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J Clin Invest.* 15: 2917-2923, 1996.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/10/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0646/08**, intitulado: "**RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE HDL-COLESTEROL COM O METABOLISMO DE COLESTEROL EM LINFOMONÓCITOS HUMANOS.**" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Eder Carlos Rocha Quintão**

Pesquisador (a) Executante: **Camila Cantelero Leança**

CAPPesq, 09 de Outubro de 2008

Prof.^a Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
Disciplina de Endocrinologia
Departamento de Clínica Médica-FMUSP

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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: **“RELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HDL-COLESTEROL COM O METABOLISMO DE COLESTEROL EM MONÓCITOS E NO PLASMA HUMANO”**

2. PESQUISADOR: **Prof. Dr. Eder Carlos da Rocha Quintão**

CARGO/FUNÇÃO: **Professor Emérito**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **8716**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Divisão de Clínica Médica I**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☒ (x) 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 : **4 anos**

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

1. justificativa e os objetivos da pesquisa
 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais
 3. desconfortos e riscos esperados
 4. benefícios que poderão ser obtidos
 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo
-
1. O estudo tem como objetivo comparar dois grupos de pacientes com diferentes HDL. O HDL é o chamado “colesterol bom” e, quando seus níveis estão altos no sangue, parece proteger contra doenças como infarto e derrame. Um grupo será composto de indivíduos com HDL alto (acima de 60 mg/dL) e outro com HDL baixo (abaixo de 40 mg/dL).
 2. Os pacientes serão submetidos a uma coleta de sangue de acordo com as normas de higiene e segurança e, em alguns, será realizado exame de ultrassom das artérias carótidas. O sangue dos pacientes passará por uma série de análises com o objetivo de tentar elucidar porque em alguns pacientes os níveis de HDL são altos e em outros os níveis são baixos.
 3. Os riscos do estudo são limitados apenas à coleta de sangue, como a formação de um hematoma no local da punção, por exemplo. O ultrassom não implica em riscos.
 4. Os benefícios são: melhor conhecimento do metabolismo da HDL para compreendermos se sua elevação pelos medicamentos habituais é benéfica quanto ao metabolismo do colesterol.
 5. Avaliação do perfil de colesterol e frações, triglicérides e análise de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

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

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

1. Todas as informações a respeito do estudo (riscos, benefícios, procedimentos) e, quando disponíveis, resultados obtidos, serão fornecidos pelos médicos participantes do estudo.
2. Sua participação no estudo é voluntária e você poderá retirar-se a qualquer momento, sem que haja comprometimento no seu atendimento médico-hospitalar.
3. Todas as informações são confidenciais e de uso exclusivo da equipe médica do estudo.
4. A equipe médica do estudo estará à disposição para prestar a devida assistência nestes casos, se for necessário.
5. Não cabe indenização pelo fato do estudo apresentar risco mínimo à saúde.

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

Prof. Dr. Eder Quintão: Av. Dr. Arnaldo 455 sala:3317 Fone: 3062 1255
Dra. Edna R. Nakandakare: Av. Dr. Arnaldo 455, sala:3317 fone: 3061 7263

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

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)

PROJETO TEMÁTICO HDL 2008-2012
FICHA CLÍNICA
Laboratório de Lípidos - LIM 10 - FMUSP
Responsável: Camila Canteiro Leança

DATA: / /	HORÁRIO:
LOCAL:	
NOME (completo) /APELIDO (p/contato):	
RGHC:	RG:
IDADE:	SEXO:
ORIGEM ÉTNICA: () Branca () Negra () Parda () Oriental	
ENDEREÇOS COMPLETOS, RESIDENCIAL E COMERCIAL (se houver):	
LOCAL E DATA COMPLETA DE NASCIMENTO:	
NOME DA MÃE:	
EMAIL:	
GRAU DE ESCOLARIDADE:	
PROFISSÃO/TRABALHO:	
TELEFONE (S) com os melhores horários para contatos e recados	
1-residencial ():_____	
2-trabalho: ():_____	
3- celular: ():_____	
PESO (Kg):	
ALTURA (m):	
IMC (Kg/m2):	
CINTURA (cm):	
QUADRIL (cm):	

ALGUM PROBLEMA(S) OU QUEIXA(S) ATUAL (IS)? QUAL (IS):

QUAIS AS PATOLOGIAS ANTERIORES (QUANDO EXISTENTES)?		
HOUVE INTERNAÇÃO NOS ÚLTIMOS 3 MESES? S / N		
PARA PACIENTES SEXO FEMININO:		
MENOPAUSA? S / N		
Se sim, qual a idade da menopausa:		
Se não, qual a data da última menstruação:		
Usa anticoncepcional? S / N		
MEDICAÇÕES EM USO	DOSES DE CADA	TEMPO DE USO
ESTILO DE VIDA E FATORES DE RISCO PARA A DAC (DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA)		
TABAGISMO: S/N N° DE CIGARROS/DIA/QUANTO TEMPO:		
ETILISMO: S/N DOSE E /HÁ QUANTO TEMPO:		
DROGAS: S/N DOSE E /HÁ QUANTO TEMPO:		

ESCORE DE FRAMINGHAM (ERF):

Total de pontos: _____

Risco absoluto em 10 anos: _____ %

EXAME FÍSICO:							
PA (mmHg): SISTÓLICA DIASTÓLICA							
FC (ppm):							
Arco senil:				Xantelasmas:			
Tireóide:							
Ap. Cardiovascular:			Sopros:		Pulsos periféricos:		
Ap. Respiratório:							
Ap. Digestivo:							
S. Nervoso:							
EXAMES LABORATORIAIS ATUAIS NO HC:				DATA:			
COLESTEROL (C):	HDL-C:	LDL-C:	VLDL-C:	TG:	GLICOSE:	TSH:	T4 LIVRE:
TGO:	TGP:	GAMA GT:	CREATININA:				
EXAMES SOLICITADOS NA PRESENTE DATA:							
ENCAMINHAMENTO A OUTROS SERVIÇOS: S/N E QUAL (IS)?							
ANOTAR DATA(S) DE MAIOR DISPONIBILIDADE (MANHÃ PARA A COLETA E TARDE PARA EIM) (INDIVÍDUOS SELECIONADOS PARA O PROTOCOLO)							
1-							
2-							

Exemplo de resultado da avaliação da integridade do RNA pelo Bioanalyzer

2100 expert_EukaryoteTotal RNA Nano_DE54704516_2010-02-12_09-46-02.xad

Page 1 of 7

Assay Class: EukaryoteTotal RNA Nano
Data Path: D:\..._EukaryoteTotal RNA Nano_DE54704516_2010-02-12_09-46-02.xad

Created: 2/12/2010 9:46:02 AM
Modified: 2/12/2010 10:09:58 AM

Electrophoresis File Run Summary

Instrument Information:

Instrument Name: DE54704516 Firmware: C.01.055
Serial#: DE54704516 Type: G2938C

Assay Information:

Assay Origin Path: C:\Program Files\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Eukaryote Total RNA Nano Series II.xsy
Title: Eukaryote Total RNA Nano Series II
Version: 2.5
Assay Comments: Copyright © 2003-2006 Agilent Technologies

Chip Information:

Chip Lot:
Reagent Kit Lot:
Chip Comments:

Curvas de validação do método Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$)

Curva LDL-R

Experiment:Curva_LDLR_A1_B1

Experiment Results Report

Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument

Standard Curves

slope:-3.508

Y-Intercept:31.904

R²:0.998

Curva ABCA1

Experiment:Curva_LDLR_A1_B1

Experiment Results Report

Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument

slope:-3.347

Y-Intercept:32.602

R²:0.993

Curva ABCG1

Experiment:Curva_A1_G1_B1_0
7_06

Experiment Results Report

Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument

Standard Curves

Curva SR-BI

Experiment: Curva_A1_G1_B1_0
7_06

Experiment Results Report

Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument

Curva HMG CoA redutase

Curva SREBP-1c

Experiment: Curva_ABCG5_ABC
G8_SREBP

Experiment Results Report

Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument

Standard Curves

Curva LXR alfa

Experiment:Curva_LXR_NPC1L1

Experiment Results Report

Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument

Standard Curves

Curva PGK1

Experiment:TBP_PGK1_23_04_1
OCamila

Experiment Results Report

Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument

Standard Curves

Curva HPRT1

Experiment:OUTROS_26_04_10
_Camila

Experiment Results Report

Applied Biosystems
StepOnePlus™ Instrument