

DALILA PINHEIRO LEAL

Efeito da restrição calórica e das estatinas na interação entre o processo de transferência de lípidos para HDL e as concentrações séricas da sirtuína 1 e do receptor solúvel para os produtos finais da glicação avançada em mulheres com doença arterial coronária precoce

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Padua Mansur

São Paulo  
2022

DALILA PINHEIRO LEAL

Efeito da restrição calórica e das estatinas na interação entre o processo de transferência de lípidos para HDL e as concentrações séricas da sirtuína 1 e do receptor solúvel para os produtos finais da glicação avançada em mulheres com doença arterial coronária precoce

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

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio de Padua Mansur

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Leal, Dalila Pinheiro

Efeito da restrição calórica e das estatinas na interação entre o processo de transferência de lipídeos para HDL e as concentrações séricas da Sirtuína 1 e do receptor solúvel dos produtos finais da glicação avançada em mulheres com doença arterial coronária precoce / Dalila Pinheiro Leal. -- São Paulo, 2022.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Cardiologia.  
Orientador: Antonio de Padua Mansur.

Descritores: 1. Restrição calórica 2. Doença arterial coronária precoce 3. HDL-colesterol 4. Sirtuína 1 5. Metabolismo dos lipídeos 6. Receptor solúvel dos produtos finais da glicação avançada

USP/FM/DBD-400/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me dar saúde e guiar meus passos.

Aos meus pais Adilson e Dorislene que nunca mediram esforços para a realização deste sonho que é nosso.

Aos meus irmãos Fran, Milena, Sansão, Davi e Joaquim, que sempre me apoiaram nesta jornada e serviram de plateia nos meus treinos de apresentações, acredito que hoje devem saber um pouco sobre doenças cardiovasculares em mulheres mesmo não sendo a área de trabalho deles (risos).

A Vó Prof<sup>a</sup> Dolores, obrigada por ser um exemplo de força e dedicação à educação e mostrar que ela pode mudar vidas.

Ao meu grande companheiro Vanderson, por sempre me incentivar e me ajudar, seu apoio incondicional em todos os momentos foram fundamentais para a concretização deste sonho.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Mansur por me receber como sua aluna por sua dedicação em considerável orientar-me nessa importante jornada. Obrigada pelos os ensinamentos e parceria ao longo desses anos.

As pacientes que disponibilizaram seu tempo para a ciência além do carinho e oportunidade de conhecer histórias de vidas tão edificantes.

Ao Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – InCor/HCFMUSP, pela possibilidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão por me receber no Laboratório de Metabolismo e Lípidos e me conceder a oportunidade de aprender ensinamentos sobre pesquisa ao lado de um grande cientista.

À Dra. Tatiane Vanessa que me acompanhou e acreditou no meu potencial desde a graduação e foi a ponte para a realização do meu sonho de fazer o Doutorado.

À Dra. Thauany Martins Tavoni que sempre esteve disponível em me ajudar, orientar, sendo suporte essencial neste trabalho.

À todos os colegas do Laboratório de Metabolismo e Lípidos do InCor que participaram de forma direta e indireta desse trabalho e pelo apoio nesta trajetória.

Ao Dr. Luiz Antonio Machado Cesar pelos ensinamentos e apoio.

Aos colegas da equipe da unidade clínica de coronariopatia crônica, especialmente a Viviane, Dr. Miguel Moreti, Dr. Paulo Leite, Dr. Julio Takada, Dr. Bruno Miotto, Dr. Nilson Popi, Dra. Luciana Dourado pelo apoio e suporte.

À Dra. Célia Maria Cássaro Strunz pela parceria, motivação e por sua generosidade em compartilhar todo seu conhecimento e experiência.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas, especialmente à Ana Paula Pacanaro, Alessandra Roggerio, Maricel, Adriana pela disposição e carinho em contribuir para este estudo.

À Profa. Dra. Ludhmila Hajjar, pelo apoio e incentivo, além de ser um exemplo de força e dedicação ao trabalho.

À equipe Cardio-Onco especialmente à Márcia, Beatriz, Sabrina, Mariela, Dr. Cristina Bittar, Dra. Stephanie Rizk, pela parceria, torcida e apoio.

À Neusa, Valdecira, Luana, Mônica e Sidnei funcionários da Pós-Graduação do programa de Cardiologia InCor, pela ajuda, empenho, disponibilidade e muita paciência.

Aos membros participantes da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Luiz Antonio, Prof. Dra. Célia Maria e Prof. Dr. Desiderio Favarato pelas valiosas contribuições para a finalização desta tese.

Ao Professor Fabio Luiz que se dedicou desde o início, com seu auxílio e suporte nas aulas de inglês, seu apoio e dedicação foram essenciais.

À Camila, Natália, Roberta, Pedro, Sr. Wilson, Sheila, Maurício que tornaram essa caminhada mais leve, participando de todos os momentos e vibrando por todas as minhas conquistas.

À Karen que foi aluna de iniciação científica deste trabalho e não mediu esforços para auxiliar na concretização do mesmo.

Ao Team Mansur composto pelo Gustavo, Nathalia, Rafael, Gean, Duda, obrigada pelo apoio, torcida e suporte no trabalho.

Ao Lucas Peixoto e Janiquelli por estarem presentes desde o início me incentivando, apoiando.

À minha prima Ariel que nasceu em meio ao término da tese e que me trouxe a paz que precisava para finalizar esta etapa da minha vida.

Aos meus sogros, Veloso e Marinalva (in memoriam), pelo incentivo, apoio, carinho em todos os momentos.

A minha grande e querida família, avós, tios, primos, cunhados pelo apoio e carinho.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci



## **Normatização adotada**

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

Referências: Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da USP.

Parte I (ABNT)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Ana Paula Calabrez, Giselle Adornato de Aguiar, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Maria Aparecida Laet, Maria Marta Nascimento. 4ª ed. São Paulo: Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica. 2020.

## Lista de abreviaturas

AAS	Ácido acetilsalicílico
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
apo A-1	Apolipoproteína A-I
apo B	Apolipoproteína B
apo E	Apolipoproteína E
CC	Circunferência de cintura
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CL	Colesterol livre
CML	Carboxymethyllysine
DAC	Doença arterial coronária
DCV	Doença cardiovascular
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DO	Densidade óptica
eNOS	Óxido nítrico sintetase
esRAGE	Secreção endógena RAGE
FL	Fosfolípidos
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corpórea
KBr	Brometo de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LXR	Receptor nuclear X
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípidos
PPAR- $\alpha$	Receptores ativados por proliferadores peroxissomais alfa
RAGE	Receptor do produto final de glicação avançada
SIRT	Sirtuína
sRAGE	Receptor solúvel do produto final de glicação avançada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TG	Triglicérides
TGO	Transaminase oxalacética
TGP	Transaminase pirúvica
T <sub>max</sub>	Tempo para produção máxima de dienos conjugados
TMB	Taxa metabólica basal
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula 1 de adesão celular vascular
V <sub>max</sub>	Taxa máxima de peroxidação lipídica

## Lista de figuras

- Figura 1:** Gráfico obtido na análise da capacidade antioxidante da HDL.....17
- Figura 2:** Organograma do estudo.....19

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Características clínicas dos grupos estudados antes e após 2 meses das intervenções.....	38
<b>Tabela 2:</b> Dados antropométricos dos grupos estudados antes e após 2 meses das intervenções.....	39
<b>Tabela 3:</b> Consumo de calorias totais da dieta habitual e distribuição percentual dos macronutrientes dos grupos estudados.....	39
<b>Tabela 4:</b> Determinação do perfil lipídico dos grupos estudados no período basal e após 2 meses das intervenções.....	41
<b>Tabela 5:</b> Transferência de lípidos da nanoemulsão lipídica para HDL, composição da HDL e diâmetro dos grupos estudados antes e após 2 meses das intervenções.....	43
<b>Tabela 6:</b> Parâmetros bioquímicos basais e após dois meses de intervenção nos grupos estudados.....	44
<b>Tabela 7:</b> Concentrações séricas de sRAGE e Sirt1 dos grupos estudados no período basal e após 2 meses.....	45
<b>Tabela 8:</b> Efeito das intervenções nas diferentes variáveis de fatores de risco e sirtuína-1 (Continuação).....	47
<b>Tabela 8:</b> Efeito das intervenções nas diferentes variáveis de fatores de risco e sirtuína-1 (Continuação).....	48
<b>Tabela 8:</b> Efeito das intervenções nas diferentes variáveis de fatores de risco e sirtuína-1 (Conclusão).....	49

**Tabela 9:** Composição lipídica da HDL e transferência de colesterol (Continuação).....50

**Tabela 9:** Composição lipídica da HDL e transferência de colesterol (Continuação).....51

**Tabela 9:** Composição lipídica da HDL e transferência de colesterol (Conclusão).....52

**Tabela 10:** Capacidade antioxidante da HDL (Continuação).....53

**Tabela 10:** Capacidade antioxidante da HDL (Conclusão).....54

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas</b>	
<b>Lista de figuras</b>	
<b>Lista de tabelas</b>	
<b>Resumo</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>1. Introdução</b> .....	14
1.1 Restrição calórica.....	15
1.2 Estatinas.....	16
1.3 Sirtuinas.....	19
<b>2. Objetivo</b> .....	23
<b>3. Material e Métodos</b> .....	24
3.1. Ética.....	24
3.2. Casuística e delineamento experimental.....	24
3.3. Critérios de inclusão.....	25
3.4. Critérios de exclusão.....	25
3.5. Avaliação do estado nutricional.....	25
3.5.1. Peso.....	26
3.5.2. IMC.....	26
3.5.3 Taxa Metabólica Basal (TMB) para mulheres.....	26
3.7. Intervenções do Estudo.....	27
3.7.1. Restrição calórica.....	27
3.7.2. Controle.....	27
3.8. Determinações bioquímicas séricas.....	28
3.9. Ensaio de transferência de colesterol livre, colesterol esterificado, triglicérides e fosfolípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL.....	29
3.10. Determinação do diâmetro da partícula de HDL.....	31
3.11. Composição lipídica da HDL.....	32
3.12. Capacidade antioxidante da HDL.....	32
<b>4. Análise estatística</b> .....	34
<b>5. Resultados</b> .....	37
<b>6. Discussão</b> .....	55
<b>6. Conclusão</b> .....	58

Leal DP. Efeito da restrição calórica e das estatinas na interação entre o processo de transferência de lípidos para a HDL e as concentrações séricas da Sirtuína 1 e do receptor solúvel dos produtos finais da glicação avançada em mulheres com DAC precoce [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

### Resumo

**Introdução:** As baixas concentrações séricas da HDL-colesterol estão associadas com maior incidência de doença arterial coronária (DAC). No entanto, poucas intervenções são capazes de aumentar o HDL-C sérico e a evidência de redução de risco cardiovascular associada não se concretizou. Parâmetros de funcionalidade da partícula HDL têm se associado a uma maior capacidade preditora do risco de DAC precoce. Sabe-se que a restrição calórica (RC) e a atorvastatina reduzem o estresse oxidativo pela ativação de várias vias metabólicas, que incluem o aumento da sirtuína-1 (Sirt-1) e do receptor solúvel dos produtos finais da glicação avançada (sRAGE) e pela redução de LDL-c, respectivamente. No entanto, ainda não está claro se essas intervenções melhoram a capacidade funcional da HDL. O presente estudo avaliou os efeitos da restrição calórica e da administração da atorvastatina nas concentrações séricas de Sirt-1 circulante, sRAGE, LDL-c e nos parâmetros de funcionalidade da partícula de HDL em mulheres com DAC precoce. **Métodos:** Ensaio clínico randomizado em 39 mulheres com DAC precoce (<55 anos), de dois meses de seguimento, foram alocadas em 3 grupos de 13 pacientes: grupo RC (30 % do valor energético total), atorvastatina (80 mg) e controle. Os marcadores bioquímicos séricos triglicérides, colesterol total, HDL, LDL, apoA1, apoB, lipoproteína (a), glicose, proteína C reativa (PCR), Sirt-1, sRAGE e a funcionalidade de HDL (composição lipídica, transferência de lípidos e capacidade antioxidante) foram analisados no início e após dois meses. Resultados: A média de idade foi de  $50,5 \pm 3,8$  anos. A RC aumentou a Sirt-1 em  $63,6 \text{ pg/mL}$  (CI95%:  $1,5 - 125,7$ ;  $p = 0,045$ ) e o reduziu o IMC em  $0,8 \text{ kg/m}^2$  (95%CI:  $-1,349 - -0,273$ ;  $p = 0,004$ ) de maneira independente de outros fatores cardiometabólicos. A atorvastatina reduziu o LDL-C em  $40,0 \text{ mg/dL}$  (CI95%:  $-69,910 - -10,1$ ;  $p = 0,010$ ). O aumento de Sirt-1 e a redução de IMC foram associados independentemente com redução fosfolípidos da composição lipídica da HDL (respectivamente,  $\beta = -0,071$ ; CI95%:  $-0,136 - -0,006$ ;  $p = 0,033$ ;  $\beta = 7,486$ ; CI95%:  $0,350 - 14,622$ ;  $p = 0,040$ ). A redução de IMC foi também associada com menor quantidade de colesterol livre na HDL ( $\beta = 0,818$ ; CI95%:  $0,044 - 1,593$ ;  $p = 0,039$ ). A redução de LDL-c pelas estatinas foi associada com redução da taxa

máxima de produção de peróxidos lipídicos da HDL ( $\beta = 0,002$ ; CI95%:0,000 –0,003;  $p = 0,022$ ) e da geração total de dienos conjugados ( $\beta = 0,001$ ; CI95%:0,000 –0,001;  $p = 0,029$ ). **Conclusão:** A restrição calórica e a atorvastatina foram capazes de alterar a funcionalidade da HDL através de duas maneiras distintas. A redução de IMC e aumento de Sirt-1 circulante através da restrição da dieta reduziram a transferência de fosfolípidos para HDL e colesterol livre da partícula, reduzindo, portanto, propensão à oxidação. Já a redução de LDL-c pela estatina reduziu diretamente a produção total de dienos conjugados da HDL, revelando uma redução da oxidação da partícula.

Descritores: Restrição calórica, Doença arterial coronária precoce, Sirtuína 1, HDL-colesterol, Receptor solúvel dos produtos finais da glicação avançada.



## ABSTRACT

Leal DP. Effect of caloric restriction and statins on the interaction between lipid transfer process to HDL and serum concentrations of Sirtin 1 and Soluble Receptor for advanced glycation end products in women with early coronary artery disease [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

**Introduction:** Low serum HDL-cholesterol concentrations are associated with a higher incidence of coronary artery disease (AD). However, few interventions are capable of increasing the sumric HDL-C and the evidence of associated cardiovascular risk reduction has not materialized. HDL particle functionality parameters have been associated with a higher predictability of early DAC risk. It is known that the caloric restriction (CR) of the diet and atorvastatin reduce oxidative stress by the activation of several metabolic pathways that include the increase of sirtin-1 (Sirt-1) and soluble receptor of the final products of advanced glycation (sRAGE) and by the reduction of LDL-c, respectively. However, it is still unclear whether these interventions improve the functional capacity of HDL. The present study evaluated the effects of caloric restriction and atorvastatin administration on circulating Sirt-1 serum concentrations, sRAGE, LDL-c and hdl particle functionality parameters in women with early DAC. **Methods:** A randomized clinical trial in 39 women with early DAC (<55 years), two months of follow-up, were allocated in 3 groups of 13 patients: CR group (30% of total energy value), atorvastatin (80 mg) and control. The serum biochemical markers triglycerides, total cholesterol, HDL, LDL, apoA1, apoB, lipoprotein (a), glucose, C-reactive protein (CRP), Sirt-1, sRAGE and HDL functionality (lipid composition, lipid transfer and antioxidant capacity) were analyzed at the beginning and after two months. **Results:** The mean age was  $50.5 \pm 3.8$  years. CR increased Sirt-1 by 63.6 pg/mL (CI95%:1.5 to 125.7;  $p = 0.045$ ) and reduced BMI by 0.8 kg/m<sup>2</sup> (95%CI: -1.349 -0.273;  $p = 0.004$ ) independently of other cardiometabolic factors. Atorvastatin reduced LDL-C by 40.0 mg/dL (CI95%:-69,910 - 10.1;  $p = 0.010$ ). Sirt-1 increase and BMI reduction were independently associated with phospholipid reduction of HDL lipid composition (respectively,  $\beta = -0.071$ ; CI95%:-0.136 -0.006;  $p = 0.033$ ;  $\beta = 7,486$ ; CI95%:0.350  $p = 0.040$ ). The reduction in BMI was also associated with a lower amount of free cholesterol in HDL ( $\beta = 0.818$ ; CI95%:0.044  $p = 0.039$ ). The reduction of LDL-c by statins was associated with a reduction in the maximum rate of production of HDL lipid peroxides ( $\beta = 0.002$ ; CI95%:0.000  $p = 0.022$ ) and the total generation of conjugated dines ( $\beta = 0.001$ ; CI95%:0.000  $p = 0.029$ ). **Conclusion:** Calorie restriction and atorvastatin were able to alter HDL functionality in two different ways. The reduction in BMI and increase in circulating Sirt-1 through dietary restriction reduced the transfer of phospholipids to HDL and free cholesterol from the particle, therefore reducing the oxidation propensity. The reduction of LDL-c by the statin directly reduced the total production of HDL-conjugated dienes, revealing a reduction in particle oxidation.

**Keywords:** Caloric restriction, Early coronary artery disease, HDL-cholesterol, Sirtuin 1, Cholesterol-HDL, Soluble Receptor for final products advanced glycation.

## Introdução

A doença arterial coronariana (DAC) é uma das principais causas de morte em mulheres (MANSUR; FAVARATO; STRUNZ; AVAKIAN et al., 2022). Os estrogênios desempenham um papel essencial na saúde vascular, e o declínio de seus níveis circulantes na menopausa foi associado a um risco aumentado de eventos cardiovasculares em mulheres (GERAGHTY; FIGTREE; SCHUTTE et al., 2021; KOK; VAN ASSELT; VAN DER SCHOUW; VAN DER TWEEL et al., 2006). No entanto, a DAC é menos prevalente em mulheres na pré-menopausa, e as possíveis hipóteses provavelmente não são atribuídas aos mecanismos estrogênio-dependentes da concentração plasmática direta (MANSUR; FAVARATO; STRUNZ; AVAKIAN et al., 2022). Portanto, a DAC prematura pode envolver outras vias fisiopatológicas.

A DAC caracteriza-se pela formação de placas de aterosclerose, compostas por acúmulo de lípidos, células imuno-inflamatórias derivadas do sangue periférico, principalmente monócitos e células T. O núcleo lipídico da placa aterosclerótica contém células espumosas, componentes residuais de células mortas e gotículas de lípidos, incluindo colesterol esterificado e cristais de colesterol. Esta região é envolvida por uma capa fibrosa contendo células musculares lisas e uma matriz rica em fibras de colágeno que estabilizam a placa (JONASSON *et al.*, 1986). A progressão da lesão aterosclerótica promove redução do fluxo coronário e, conseqüentemente, desencadeia a isquemia miocárdica (CASTELLI *et al.*, 1986).

Na fase inicial, a placa aterosclerótica não compromete o lúmen arterial. Ao longo dos anos, a exposição aos fatores de risco contribui para a evolução da aterosclerose. O crescimento da placa ocorre devido ao acúmulo de LDL-C, que irá diminuir a luz do vaso, comprometendo o fluxo sanguíneo. Nessa etapa pode ocorrer isquemia, diminuindo a oferta de oxigênio e nutrientes para o miocárdio. A isquemia pode interferir no metabolismo do miocárdio e está associada a angina de peito (STARY et al., 1885; LIBBY, 2013). Além disso, as placas de ateroma podem sofrer ruptura, ocasionando um evento aterotrombótico (STARY et al., 1995; LIBBY, 2021).

Os principais fatores de risco envolvidos no processo da aterosclerose incluem hipertensão arterial sistêmica (HAS), tabagismo, dislipidemias, diabetes mellitus, antecedentes familiares, sedentarismo e obesidade (Kojić *et al.*, 2014). Sabe-se que

o controle dos fatores de risco foi responsável por pelo menos 50% na redução da mortalidade por DCV (FORD *et al.*, 2007).

Evidências sugerem que o aumento da circunferência abdominal para homens (>102cm) e mulheres (>89cm) e obesidade estão associados ao aumento do risco para DAC (HINDLE *et al.*, 2010). O tratamento do sobrepeso e obesidade e o controle dos demais fatores de risco consiste dentre outras intervenções na mudança de estilo de vida, incluindo atividade física adequada e a restrição calórica (WEISS e FONTANA, 2011).

### **1.1 Restrição calórica**

A restrição calórica (RC) consiste na redução do consumo de calorias em torno de 20 a 30% da ingestão habitual, sem desnutrição, é uma das formas de intervenção nutricional que tem sido muito estudada sobre seus potenciais benefícios (PUG *et al.*, 1999; GENARO, 2009; TREPONOWSKI *et al.*, 2011).

Estudo CALERIE avaliou o efeito da RC de 25% sob fatores de riscos cardiometabólicos ao longo de dois anos e mostrou que a RC foi capaz de reduzir significativamente múltiplos fatores de risco cardiometabólicos em homens e mulheres jovens e não obesos, mostrando ser uma intervenção segura e sustentável (DORLING; RAVUSSIN; REDMAN; BHAPKAR *et al.*, 2021).

Estudos mostram efeitos benéficos da restrição calórica sobre o sistema cardiovascular pelo controle dos principais fatores de risco, assim como na redução da inflamação e do estresse oxidativo (FONTANA *et al.*, 2004; WEISS e FONTANA, 2011).

Estudo realizado em homens e mulheres dislipidêmicos mostrou que a restrição calórica além de promover perda de peso, melhorou o controle glicêmico e a sensibilidade à insulina, e reduziu colesterol total (VOLEK *et al.*, 2008). Em pacientes diabéticos do tipo II, a restrição calórica associou-se com redução de 44% nas doses de insulina (MEEHAN *et al.*, 2015).

Em pacientes obesos, a restrição calórica promoveu redução da apoptose dos cardiomiócitos, impedindo mudanças nas isoformas da miosina e preservando ou

melhorando a função diastólica do ventrículo esquerdo (WEISS e FONTANA, 2011; Mateo-Gallego et al., 2016). A restrição calórica por 6 meses reduziu de 5 a 15% dos níveis séricos do colesterol total e do lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) (WEISS e FONTANA, 2011). A redução nos níveis séricos de colesterol total foi ainda maior, em torno de 30%, após 1 ano da restrição calórica (FONTANA et al., 2004; DAS et al., 2007; WEISS e FONTANA, 2011).

Pacientes hipertensos submetidos a restrição calórica de 600Kcal/ dia da sua dieta habitual durante o período de 12 meses mostrou que esta intervenção reduziu a pressão arterial sistólica (PAS) -4,2 mm Hg e pressão arterial diastólica (PAD) foi -3,3 mm Hg , acompanhada por uma diminuição significativa na insulina plasmática -11,7 %, aldosterona -10,4 %, níveis de leptina -26,3 % e perda de peso média de 8,1 kg (FOGARI *et al.*, 2010).

Estudo realizado em camundongos homocigotos geneticamente modificados para a apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>) e submetidos a uma dieta restritiva em calorias (60% menos que o *ad libitum*) houve diminuição significativa nas lesões ateroscleróticas quando comparados a camundongos que não foram submetidos à restrição calórica. Além disso, camundongos (ApoE<sup>-/-</sup>) com restrição calórica apresentaram diminuição significativa do estresse oxidativo na parede da aorta, contribuindo para um efeito antiaterogênico. (GUO *et al.*, 2002).

A restrição calórica tem um efeito protetor contra o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Este efeito é evidenciado por grandes diminuições da pressão arterial, LDL, colesterol-total, triglicérides, baixo de proteína C-reativa, interleucina 6 (IL-6), e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (FONTANA et al., 2004; DOLINSKY e DYCK, 2011; BALES e KRAUS, 2013). Portanto, a restrição calórica associou-se à melhorias nos principais fatores de risco para a DAC.

## **1.2. Estatinas**

A estatina é um medicamento usado na prevenção primária e secundária das DCV. A principal ação desta classe de medicamentos é a redução dos níveis séricos do LDL-colesterol. Isto ocorre pela inibição da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), enzima fundamental na síntese do colesterol intracelular (EGOM e HAFEEZ, 2016). A inibição desta enzima reduz os níveis de colesterol na

célula hepática e, em resposta à privação, ocorre uma maior exposição de receptores para o LDL na membrana das suas células e, conseqüentemente, maior captação do LDL-colesterol sérico. (VAUGHAN et al., 2003.)

Recentemente, estudos mostraram associação entre as estatinas e maior incidência de diabetes melito (ATHYROS e MIKHAILIDIS, 2012; SIMSEK *et al.*, 2012). Estudo realizado em pacientes com síndrome coronariana aguda, que fazem uso de estatina, mostrou um aumento significativo de 27% no risco desses pacientes desenvolverem diabetes melito em relação ao grupo controle (LIN et al., 2016). Porém, estudos são contraditórios em relação à associação entre estatinas e incidência de diabetes, (COLEMAN *et al.*, 2008; Barkas *et al.*, 2016; Calza *et al.*, 2016). Em camundongos a rosuvastatina (10mg/kg/dia) por 30 dias, induziu a intolerância à glicose. (BIRNBAUM et al., 2014). Em outro estudo a administração de rosuvastatina em doses de 20 e 40 mg/kg/dia durante 5 semanas, melhorou a intolerância à glicose (FERREIRA et al., 2013). Portanto, os mecanismos e vias metabólicas envolvidas na possível associação entre estatinas e diabetes devem ser melhor estudadas.

A dieta restritiva em usuários de estatinas (atorvastatina, rosuvastatina, fluvastatina, pravastatina ou lovastatina) mostrou, após 3 semanas, reduziu pressão arterial sistólica e diastólica e, após 6 semanas observou também, redução dos níveis séricos de triglicérides e insulina (BALLARD et al., 2013).

A prevalência de DAC é mais elevada em mulheres na pós-menopausa em comparação as mulheres no climatério (KOK *et al.*, 2006). Evidências epidemiológicas têm mostrado que o HDL baixo é fator de risco independente para DAC (Franceschini, 2001). Sultan e cols mostraram redução da concentração sérica de HDL-C na pós-menopausa em comparação com a pré-menopausa (SULTAN et al., 2003). Para verificar a influência da menopausa sob os fatores de risco de DAC foi realizado o estudo SWAN (Study of Women's Health Across the Nation). As participantes tinham entre 42 a 52 anos e foram acompanhadas por 9 anos. Observou-se no período aumento gradativo de colesterol total, LDL-C e apolipoproteína B (apo B). Em contrapartida, observou-se redução da concentração sérica do HDL-C e apo A-I, neste período (DERBY *et al.*, 2009).

Portanto torna-se necessário avaliar os aspectos funcionais antiaterogênicos da HDL, como sua atividade antioxidante, antiinflamatória, antiagregante plaquetária e o transporte reverso do colesterol.

O transporte reverso do colesterol tem sido considerado importante na formação, maturação e degradação da HDL. Durante o transporte ocorre à transferência do colesterol livre dos tecidos periféricos para o HDL, através das proteínas transportadoras de colesterol da membrana celular, ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) e ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1). A troca de lípidos entre as lipoproteínas é também intermediada por proteínas de transferência, tais como proteína de transferência éster de colesterol (CETP) e proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) que estão envolvidas nas transferências de núcleo (ésteres de colesterol e triglicérides) e de superfícies lipídicas (fosfolípidos e colesterol livre) (TALL, 1995). Em seguida, o colesterol é transportado para o fígado para ser excretado na bile.

Em pacientes com evento coronário recente, observou-se que a capacidade da HDL de promover o efluxo de colesterol, e as transferências de CE para a HDL estão prejudicadas (SOARES et al., 2019). Em pacientes com DAC precoce, as taxas de transferências de CL para a HDL estão diminuídas em comparação aos grupos sem as respectivas doenças, mesmo sem haver diferença nas concentrações séricas do HDL-C. Esses resultados sugerem, que os distúrbios no metabolismo da HDL, podem estar envolvidos no processo aterosclerótico (MARANHÃO et al., 2012)

A troca de lípidos com as células e outras lipoproteínas é importante no metabolismo de HDL e para sua função antiaterogênica (ROSENSON *et al.*, 2011). Para avaliar a capacidade da HDL em receber simultaneamente fosfolípidos (FL), colesterol livre (CL), colesterol esterificado (CE) e triglicérides (TG), foi desenvolvido um método no laboratório de Metabolismo de Lípidos que permite avaliar esta capacidade através de uma nanoemulsão lipídica artificial (MARANHÃO e FREITAS, 2014).

Este método foi utilizado para investigar o metabolismo da HDL em diversas situações (DAMINELLI *et al.*, 2008; FEITOSA-FILHO *et al.*, 2009; GIRIBELA *et al.*, 2009; PUK *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2010; VALLE *et al.*, 2010; CASELLA-FILHO *et*

*al.*, 2011; MARANHÃO e FREITAS, 2014). Estudo realizado em 30 pacientes com DAC precoce, sendo 20 mulheres, foi visto que a transferência de colesterol livre e triglicérides estavam diminuídas nestes pacientes (Maranhão *et al.*, 2012). Portanto, torna-se necessário a avaliação funcional do HDL como um possível biomarcador para DAC precoce nas mulheres.

### **1.3. Sirtuínas**

As sirtuínas (SIRT) são uma família de proteínas dependentes da nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) e ADP-ribosiltransferase. São importantes reguladores de uma ampla variedade de processos celulares e fisiológicos, tais como proliferação e diferenciação celular, resposta ao estresse oxidativo, estabilidade do genoma, sobrevivência celular, metabolismo e homeostasia energética e processo de envelhecimento (MICHAN e SINCLAIR, 2007).

Foram identificadas sete isoformas de sirtuínas (SIRT 1-7) em mamíferos, distribuídas em três compartimentos celulares (Park *et al.*, 2013). SIRT 1, 2, 6, 7 encontram-se no núcleo; as isoformas SIRT 1 e SIRT 2 são também reconhecidas no citoplasma e as SIRT 3, 4 e 5 estão localizadas na mitocôndria (MICHISHITA *et al.*, 2005; TENNEN *et al.*, 2010). Por diferentes vias, a SIRT1 protege contra os processos que levam à doença cardiovascular (OELLERICH e POTENTE, 2012).

Nos vasos, o óxido nítrico é crucial para a manutenção da integridade do endotélio vascular e promoção da angiogênese. O aumento da SIRT1 é capaz de ativar a enzima óxido nítrico sintetase do endotélio (eNOS), e assim aumentar a produção de óxido nítrico, favorecendo a vasodilatação (MATTAGAJASINGH *et al.*, 2007).

A expressão de SIRT-1 pode ser ativada quando as células têm que lidar com um estado de energia negativo sob condições de jejum ou RC (ALLARD *et al.*, 2009). No fígado, a ativação sirt-1 é necessária para aumentar a gliconeogênese, glicogenólise e oxidação de ácidos graxos (LOMB *et al.*, 2010, GILLUM *et al.*, 2011), embora menos se saiba sobre o papel do SIRT-1 no controle do metabolismo do colesterol no fígado e outros tecidos.

Poucos estudos identificaram que o SIRT-1 pode influenciar a concentração plasmática de alguns lípidos. Em humanos, foi demonstrado que 1 ano de restrição calórica é suficiente para produzir uma redução significativa nos níveis plasmáticos de colesterol total, LDL-colesterol, triglicérides e glicose, acompanhado por um aumento significativo nos níveis de plasma HDL-colesterol (FONTANA et al., 2004).

A hiperexpressão de SIRT-1 protege contra a hipertrofia cardíaca e esta ação envolve em parte a ativação do PPAR- $\alpha$  proteína receptora nuclear que funciona como fator de transcrição que regula a expressão de genes (PLANAVILA et al., 2011). A via das sirtuínas é também importante no controle do perfil lipídico do organismo; no fígado, a SIRT1 ativa o receptor nuclear X (LXR) que regula a transcrição do gene do transportador de colesterol ABCA1 da membrana celular, conseqüentemente, favorecendo assim o transporte reverso pelo HDL-colesterol, com redução da concentração de colesterol nos tecidos periféricos e metabolizando-o no fígado (LI et al., 2007).



#### 1.4. Receptor solúvel do produto final de glicação avançada (sRAGE)

O receptor do produto final de glicação avançada (RAGE) pertence à família das imunoglobulinas presente na superfície de vários tipos de células (NEEPER *et al.*, 1992; SOULIS *et al.*, 1997).

Nas lesões ateroscleróticas, os produtos finais de glicação avançada (AGEs) carboxymethyllysine (CML) e metilglioxal derivado hydroimidazolone-1, se ligam ao RAGE (Kislinger *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2014), levando a ativação de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, conseqüentemente, produzindo maior quantidade de citocinas inflamatórias como IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) (XUE *et al.*, 2014).

Além disso, ao se ligar no RAGE, os AGEs alteram o metabolismo celular, ocasionando liberação de radicais de oxigênio, induzindo o estresse oxidativo, responsável, por injúrias vasculares e também pelo aumento da expressão da molécula de adesão VCAM-1, capaz de agregar monócitos na parede endotelial, aumentando a probabilidade de formação de trombos e intensificação da lesão aterosclerótica (HEIER *et al.*, 2015).

O RAGE pode passar por uma variedade de processos de *splicing* do seu mRNA, produzindo variadas isoformas como o RAGE solúvel (sRAGE). No plasma humano duas isoformas são predominantes. A primeira é obtida pela ligação do RAGE à membrana, clivada por metaloproteinases (HOFMANN *et al.*, 1999), e a outra produzida por *splicing* alternativo do gene *RAGE* conhecida como secreção endógena RAGE (esRAGE) (HUDSON *et al.*, 2008), juntos eles constituem o RAGE solúvel no plasma (sRAGE). O sRAGE atua diminuindo a sinalização RAGE, conseqüentemente reduzindo inflamação (HANFORD *et al.*, 2004).

O mecanismo pelo qual isso ocorre é devido a ligação do sRAGE com os AGEs circulantes no sangue reduzindo a interação dos AGEs com o RAGE da membrana celular e, conseqüentemente, diminuindo a ativação citoplasmática do eixo pró-inflamatório pelo RAGE de membrana.

Estudo em pacientes com DAC mostrou que os níveis de sRAGE estão reduzidos nessa população em comparação com indivíduos controle (FALCONE et al., 2005). Estudo em indivíduos com alto risco de DCV para verificar a associação entre os níveis de sRAGE e aterosclerose, observou-se que baixos níveis de sRAGE são independentemente associados a uma maior prevalência de aterosclerose o estudo foi realizado com 2.572 indivíduos (LINDSEY *et al.*, 2009). Estudo prospectivo em pacientes com suspeita de DAC e não diabéticos, baixos níveis séricos de sRAGE associaram-se à maior incidência de eventos cardiovasculares em 48 meses de seguimento (CHIANG et al., 2009). Estudo feito em 24 mulheres saudáveis com idade entre 55-65 anos para verificar o efeito das intervenções, suplementação de resveratrol (500 mg / dia) e da restrição calórica (1000cal / dia) nas concentrações séricas de Sirt1 e biomarcadores vasculares, mostrou as intervenções aumentaram as concentrações séricas de Sirt1 e melhoraram o perfil lipídico (MANSUR et al., 2017).

Estudos mostram uma interação entre os sistemas das sirtuínas e do RAGE. O sinergismo positivo entre estes sistemas favorece a redução dos estímulos inflamatórios e o estresse oxidativo intracelular (URIBARRI *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2012). Estudos sobre os mecanismos adicionais destes sistemas na presença das estatinas são necessários. Portanto, este estudo analisou a influência da restrição calórica e das estatinas na interação entre o sistema da sirtuína 1, do RAGE e da funcionalidade do HDL em mulheres com DAC precoce.

## **2. Objetivo**

Investigar o efeito da restrição calórica e das estatinas na interação entre o processo de transferência de lípidos para a HDL e as concentrações séricas das sirtuína 1 e do sRAGE em mulheres com DAC precoce.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Ética**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número de protocolo 4413/016/079

#### **3.2. Casuística e delineamento experimental**

Foram incluídas 39 mulheres com DAC, selecionadas na Unidade Clínica de Coronariopatias Crônicas do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HC.FMUSP). As participantes foram alocadas em três grupos, grupo 1: Restrição Calórica (RC), grupo 2: Atorvastatina (A) e grupo 3: Controle (C).

As participantes foram orientadas detalhadamente sobre os objetivos do estudo, assim como todos os procedimentos envolvidos no protocolo de pesquisa. As participantes que faziam o uso de medicamentos hipolipemiantes (estatinas), foram suspensos pelo médico responsável 45 dias antes da coleta da primeira coleta, como feitos em trabalhos anteriores (SPRANDEL et al, 2015 e LAVERDY et al, 2015).

Após todos os esclarecimentos, as participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Em seguida, foram orientadas a comparecer no Laboratório de Metabolismo e Lípidos do InCor-HCFMUSP para coleta de sangue que aconteceu em dois momentos: início e no final do estudo. As amostras de sangue por punção a vácuo de veia periférica foram obtidas após um período de jejum de 12 horas.

As avaliações clínica e nutricional ocorreram no tempo basal, 15, 30, 45 e 60 dias após o início do estudo para acompanhar o estado nutricional das participantes.

A avaliação clínica consistiu em anamnese, exames físicos, fatores de risco para o desenvolvimento de DAC, número de artérias coronárias envolvidas (uniarterial ou multiarterial) e as medicações em uso.

Os fatores de risco para DAC foram diagnosticados segundo as diretrizes atuais, tabagismo (mínimo de meio maço/dia por 5 anos ou 25 maços/ano), Dislipidemia (colesterol total > 250 mg/dl), HAS (> 140/90 mmHg), diabetes mellitus (glicemia de jejum  $\geq$  126 mg/dL, 2 horas no TOTG  $\geq$  200 mg/dL, ou HbA1c  $\geq$  6,5%\*) e História Familiar (CÉSAR *et al.*, 2015).

### **3.3. Critérios de inclusão:**

- Mulheres com DAC estável documentada (lesão coronária >70%) pela cineangiocoronariografia;
- Idade  $\leq$  55 anos;
- Sobrepeso e/ou obesidade (IMC  $\geq$  25 kg/m<sup>2</sup>);
- Diabetes *mellitus* tipo 2

### **3.4. Critérios de exclusão:**

- Insuficiência renal
- Insuficiência hepática
- Hipotireoidismo;
- Cirurgia recente ( $\leq$  6 meses);
- Doenças reumáticas;
- Diabetes *mellitus* tipo 1;
- Etilismo crônico (> 10 doses/semana, sendo que 1 dose equivale a 300 ml de cerveja ou 150 ml de vinho ou 40 ml de destilado).

### **3.5. Avaliação do estado nutricional**

O estado nutricional foi avaliado pelas medidas de peso, altura, índice de massa corpórea (IMC), circunferência do braço e circunferência abdominal.

### 3.5.1. Peso

O peso foi obtido por uma balança eletrônica calibrada. A paciente foi posicionada em pé no centro da base da balança, descalça e com roupas leves.

### 3.5.2. IMC:

O IMC foi medido segundo a equação abaixo:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso atual (kg)}}{\text{Altura}^2 \text{ (m)}}$$

### 3.5.3 Taxa Metabólica Basal (TMB) para mulheres:

A TMB para mulheres foi medida pela equação abaixo (Harris & Benedict, 1918):  $\text{TMB} = 665 + (9,6 \times \text{peso em Kg}) + (1,8 \times \text{altura em cm}) - (4,7 \times \text{idade em anos})$

### **3.7. Intervenções do Estudo**

#### **3.7.1. Restrição calórica**

A análise inicial da ingestão alimentar habitual das participantes foi feita pelo registro de 3 dias (2 dias alternados durante a semana e 1 dia do final de semana), no qual as participantes anotaram todos os alimentos ingeridos nestes 3 dias e, posteriormente, a análise nutricional foi realizada utilizando o software **AVANUTRI®** versão 3.1.1. As pacientes foram orientadas detalhadamente sobre o preenchimento do registro alimentar destes três dias, para que retratasse seu hábito alimentar real diário.

Realizou-se restrição calórica de 30% da ingestão calórica habitual, por um período de 2 meses, sendo que a restrição igual ou superior à taxa metabólica basal (TMB), que é a quantidade mínima de calorias necessária para o organismo manter suas funções vitais.

A TMB foi calculada pela equação de Harris Benedict para mulheres:  $TMB = 665 + (9,6 \times \text{peso em Kg}) + (1,8 \times \text{altura em cm}) - (4,7 \times \text{idade em anos})$  (Harris e Benedict, 1918).

Por exemplo: participante de 40 anos, com 160 cm de altura e 67 kg, IMC classificado como sobrepeso, consome habitualmente 2700 Kcal, com TMB de 1408,2 Kcal. A restrição calórica de 30% do total de 2.700 Kcal corresponderá-a 810 Kcal e, desta forma a ingestão calórica diária desta participante no estudo será de 1890 Kcal, e, portanto, 482 Kcal superior a TMB de 1.408 Kcal.

A adesão à dieta foi avaliada após 15, 30 e 60 dias do início do estudo pelo registro alimentar das últimas 24 horas. No registro de 24 horas, as participantes reportaram todos os alimentos (sólidos e líquidos) consumidos para analisar se os alimentos relatados condiziam com a dieta prescrita.

#### **3.7.2. Controle**

Participantes foram orientadas a manter seu padrão alimentar e caso usassem estatinas, foi retirado pelo período de 60 dias.

### **3.8. Determinações bioquímicas séricas**

Os níveis séricos de HDL-C, CT e TG foram dosados por método colorimétrico enzimático, utilizando-se o kit Flex<sup>®</sup> reagente cartridge, equipamento Dimension RXL, Siemens Healthcare (Newark, USA).

O não-HDL-C foi calculado (Não-HDL-C = Colesterol total – HDL-C), assim como a concentração da LDL-C, que foi estimada pela equação de Friedewald (LDL-C mg/dL = CT - HDL-C - (Triglicerídeos/5)) (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). As apo A-I e apo B foram dosadas por imunonefelometria nos Sistema ProSpec<sup>®</sup>.

Glicose: Dosada por método enzimático automatizado, utilizando-se kit específico para o equipamento automatizado Dimension RXL, Siemens Healthcare (Newark, USA). Valores de referência: 70-99 mg/dL - normal; 100-125 mg/dL – inapropriada;  $\geq 126$  mg/dL elevada.

Creatinina: Quantificada por método colorimétrico CREA, utilizado no sistema de química clínica Dimension<sup>®</sup> (Siemens Healthcare Diagnostics, Newark, USA). O método da creatinina emprega uma modificação da reação cinética de Jaffe. O intervalo de referência é de 0.8-1.3 mg/dL para homens e 0.6-1.0 mg/dL para mulheres.

### **3.9. Ensaio de transferência de colesterol livre, colesterol esterificado, triglicérides e fosfolípidos de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL**

O ensaio de transferência foi realizado através de uma nanoemulsão lipídica artificial preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg e colaboradores (1992) modificada por Maranhão e colaboradores (1993). Em um frasco forpipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol. Posteriormente, adicionados à mistura de lípidos os isótopos <sup>3</sup>H-éster de colesterol e <sup>14</sup>C-fosfatidilcolina ou <sup>3</sup>H-triglicérides e <sup>14</sup>C-colesterol livre. Após a adição de 10 mL de tampão tris-HCl 0,01M, pH 8, a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultra-sônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil) potência 125 watts, durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55°C.



A solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (Optima™ XL-100K Ultracentrifuge, rotor SW-41, Beckman, EUA). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a 200.000 x g por 30 minutos, a 4°C, foi removido por aspiração (1mL) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para 1,21g/mL. Após a segunda centrifugação (200.000 x g por 2 horas a 4°C), a nanoemulsão lipídica artificial foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão tris HCl 0,01 M, pH 8. Finalmente, a nanoemulsão foi esterilizada por filtração em membrana Milipore de 0,22 µm de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até 15 dias.

O ensaio de transferência de lípidos foi realizado segundo descrito por Lo Prete. Uma alíquota de 200 µL de plasma dos participantes foi incubada com 50 µL da nanoemulsão marcada com os lípidos radioativos (oleato de colesterol-<sup>3</sup>H e fosfolípidos-<sup>14</sup>C ou trioleína-<sup>3</sup>H e colesterol-<sup>14</sup>C), a 37°C, sob agitação, durante 1 hora. Após esse procedimento, foram adicionados 250 µL de reagente precipitante (0,2% dextran/0,3 mol/L MgCl<sub>2</sub>) seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos, a 3000 rotações por minuto. O infranadante contendo a nanoemulsão e as lipoproteínas plasmáticas que contém apo-B, foram desprezados. O sobrenadante, contendo a HDL, foi submetido à contagem da radioatividade em contador beta (Liquid Scintillation Analyzer-TRI-CARB2100TR, PerkinElmer, Massachusetts, EUA), que corresponde à transferência dos lípidos radioativos da nanoemulsão para a HDL do indivíduo.

Foi calculada a percentagem de transferência de cada um dos lípidos radioativos, considerando como 100%, a radioatividade total utilizada na incubação pipetados 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol. Posteriormente, adicionados à mistura de lípidos os isótopos <sup>3</sup>H-éster de colesterol e <sup>14</sup>C-fosfatidilcolina ou <sup>3</sup>H-triglicérides e <sup>14</sup>C-colesterol livre. Após a adição de 10 mL de tampão tris-HCl 0,01M, pH 8, a mistura de lípidos foi emulsificada por irradiação ultra-sônica, utilizando-se equipamento Branson, modelo 450A (Arruda Ultra-Som, São Paulo, Brasil) potência 125 watts, durante 3 horas, sob atmosfera de nitrogênio, com temperatura variando entre 51 a 55°C.

A solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (Optima™ XL-100K Ultracentrifuge, rotor SW-41, Beckman, EUA). Na primeira etapa, o material da parte superior do tubo, resultante da centrifugação a 200.000 x g por 30 minutos, a 4°C, foi removido por aspiração (1mL) e desprezado. Ao restante do material foi adicionado brometo de potássio (KBr) ajustando a densidade para 1,21g/mL. Após a segunda centrifugação (200.000 x g por 2 horas a 4°C), a nanoemulsão lipídica artificial foi recuperada no topo do tubo por aspiração. O excesso de KBr foi removido por diálise, contra 2 trocas de 1000 volumes tampão tris HCl 0,01 M, pH 8. Finalmente, a nanoemulsão foi esterilizada por filtração em membrana Milipore de 0,22 (m de porosidade sob fluxo laminar e armazenada a 4°C por até 15 dias.

O ensaio de transferência de lípidos foi realizado segundo descrito por Lo Prete. Uma alíquota de 200 µL de plasma dos participantes foi incubada com 50 µL da nanoemulsão marcada com os lípidos radioativos (oleato de colesterol-<sup>3</sup>H e fosfolípidos-<sup>14</sup>C ou trioleína-<sup>3</sup>H e colesterol-<sup>14</sup>C), a 37°C, sob agitação, durante 1 hora. Após esse procedimento, foram adicionados 250 µL de reagente precipitante (0,2% dextran/0,3 mol/L MgCl<sub>2</sub>) seguida de agitação por 30 segundos e centrifugação por 10 minutos, a 3000 rotações por minuto. O infranadante contendo a nanoemulsão e as lipoproteínas plasmáticas que contém apo-B, foram desprezados. O sobrenadante, contendo a HDL, foi submetido à contagem da radioatividade em contador beta (Liquid Scintillation Analyzer-TRI-CARB2100TR, PerkinElmer, Massachusetts, EUA), que corresponde à transferência dos lípidos radioativos da nanoemulsão para a HDL do indivíduo.

Foi calculada a percentagem de transferência de cada um dos lípidos radioativos, considerando como 100%, a radioatividade total utilizada na incubação.

### **3.10. Determinação do diâmetro da partícula de HDL**

A HDL foi separada por precipitação química das partículas lipoprotéicas que contém apo B, através da adição de 500 µL polietilenoglicol 8000 (200g/L). O sobrenadante contendo HDL foi diluído em solução de NaCl (0,15M) e, em seguida, filtrado em filtro Millipore 0,22 µm de diâmetro. O diâmetro da HDL mediu-se por espalhamento de luz (Zetasizer-nano series – Nano-ZS90, Malvern Instr.,

Worcestershire, Reino Unido), em um ângulo de 90° e 658nm e expresso pelo resultado médio obtido em 5 corridas de 1 minuto (Lima et al., 2004).

### **3.11. Composição lipídica da HDL**

A fração de HDL foi obtida a partir do plasma total após precipitação das lipoproteínas que contém apo B com fosfotungstato de magnésio. Triglicérides (Labtest, Minas Gerais, Brasil), colesterol livre e fosfolípídeo foram determinados utilizando-se kits comerciais (Wako, Richmond, VA, EUA). O colesterol esterificado foi calculado como a diferença entre o colesterol total e o colesterol livre da HDL multiplicado por 1,67 para ajuste do peso molecular do colesterol esterificado (BRAGDON et al., 1956).

### **3.12. Capacidade antioxidante da HDL**

O método para avaliar a capacidade antioxidante da HDL foi baseada no protocolo de Lag time proposto por Esterbauer et al. (1989). Esse método tem os seguintes pressupostos: LDL como substrato oxidável, CuSO<sub>4</sub> como agente oxidante e a HDL de cada participante, como substrato antioxidante. Os dados gerados formam um gráfico, onde observa-se a fase de latência, que é propriamente a fase de resistência à oxidação (Lag time), a fase de propagação dos dienos conjugados (indicado pelo aumento da absorbância) e a fase de decomposição desses compostos (platô).

Para a obtenção da LDL, foi obtido sangue das participantes coletados em tubos seco para a obtenção de soro (3000 rpm, 15 min, a 5°C). O pool de soro foi submetido à ultracentrifugação sequencial (56.000 rpm, 6h e 4°C) após ajuste de densidade com solução salina a 1,019 g/mL. Ao final do processo, a fração VLDL foi removida. Em seguida, a densidade do soro remanescente foi ajustada para 1,063

g/mL com brometo de potássio (KBr), seguida de uma segunda ultracentrifugação, conforme descrito acima. A LDL obtida foi então submetida a diálise contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,4 por 4 horas, com trocas a cada 1 hora, a 4°C.

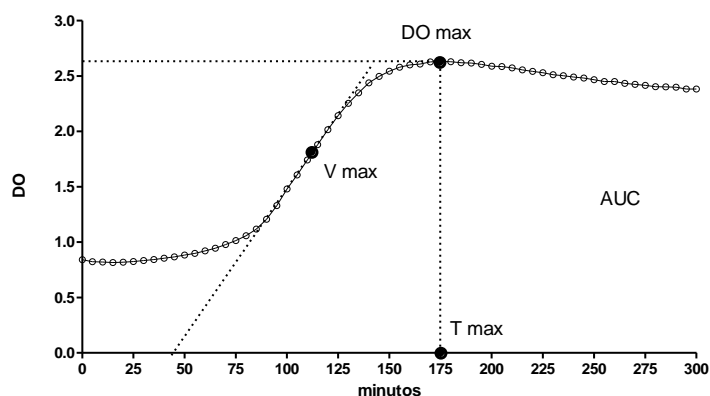
Para obtenção da HDL de cada participante, foi adicionado ao soro o ácido fosfotungstico e cloreto de magnésio, conforme as instruções do kit comercial de Colesterol HDL® (Labtest, Minas Gerais, Brasil). As amostras foram centrifugadas (3.500 rpm, 15 min, 4°C) para precipitação das lipoproteínas contendo apo B (VLDL, LDL e quilomícrons). A HDL presente no sobrenadante foi separada e mantida na geladeira para uso em até 24 h.

Para a quantificação das proteínas totais da HDL e da LDL foi utilizado o kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, OR, EUA). A LDL e a HDL foram diluídas em PBS sem EDTA, para concentração final proteica de 83 µg/mL e de 200 µg/mL, respectivamente.

A oxidabilidade de LDL foi monitorada em espectrofotômetro (ESTERBAUER et al., 1989). Foram pipetados 100µL da LDL em todos os poços e, em seguida, 100µL da HDL de cada paciente foram adicionados no respectivo poço. A mistura LDL+HDL foi mantida a 37°C por 15 minutos. A peroxidação foi iniciada com adição de solução aquosa contendo 30 µM de CuSO<sub>4</sub> (50 µL/poço). A absorbância foi mensurada a 234nm, durante 5 horas, com leituras a cada 5 minutos.

Portanto, foram obtidos os dados da taxa máxima de peroxidação lipídico ( $V_{max}$ ), a partir do declive da curva de absorbância durante a fase de propagação, isto é:  $\Delta$  absorbância/  $\Delta$  tempo. Também foi obtido o dado da produção máxima de dienos conjugados em DO (densidade óptica), o tempo para produção máxima de dienos conjugados ( $T_{max}$ ), em minutos e, por último, a área sobre a curva gerada (AUC).

**Figura 1.** Gráfico obtido na análise da capacidade antioxidante da HDL



Abreviaturas: DO: densidade ótica; Vmax: taxa máxima de peroxidação lipídica; Tmax: tempo para a produção máxima de dienos conjugados; AUC: área sobre a curva.

#### 4. Análise estatística

O cálculo do tamanho da amostra abaixo usou como referência a porcentagem de variação de colesterol livre da transferência de colesterol livre de uma nanoemulsão lipídica artificial para HDL observada em um estudo anterior que incluiu pacientes com DAC prematura [8]. O cálculo do poder indicou que, em  $n \geq 13$  em cada grupo, temos 80% de poder ao nível de significância de 0,05 para detectar diferença nos valores de transferência de lipídios entre os grupos.

Os resultados são expressos em média  $\pm$  DP. As análises basais e após 2 meses das diferenças foi avaliada usando o teste t. As diferenças basais e delta (pós – pré) entre os grupos foram avaliadas por ANOVA de uma via, usando Bonferroni como teste post-hoc. Para avaliar ainda mais a influência das intervenções nos resultados da funcionalidade do HDL, usamos regressões lineares múltiplas usando o método retrocesso stepwise para identificação dos preditores mais fortes, o que resultou nos “modelos finais” expressos na seção de resultados.

Para a construção do modelo, utilizamos os fatores de risco cardiometabólicos tradicionais (utilizamos LDL-c e HDL-c ao invés de apoB e apoA-I porque LDL-c e HDL-c apresentaram maiores correlações com os desfechos), Sirt-1, e as intervenções (restrição calórica e atorvastatina foram utilizadas como variáveis categóricas sendo “0” sem intervenção e “1” sendo a respectiva intervenção).

Para avaliar como as variáveis do modelo estavam associadas entre si, construímos modelos para cada variável e, assim, verificamos sua influência nas mudanças detectadas no estudo. Os modelos finais foram escolhidos usando como parâmetro o melhor  $R^2$  do modelo possível concomitantemente com o maior valor F. Cada variável contínua independente e dependente incluída no modelo (exceto as variáveis categóricas “restrição energética” e “atorvastatina”) foram utilizadas como variáveis de mudança (delta, ou seja, pós menos pré-intervenção). Todas as análises estatísticas foram feitas no software SPSS versão 20.0.

Cálculo do tamanho da amostra (ANOVA)

Número de grupos: 3

Número de comparações: 6

Estimativas de médias e desvios padrão por grupo:

Grupo Controle:  $4,0 \pm 1,2\%$

Grupo Atorvastatina:  $1,9 \pm 0,8\%$

Grupo Restrição Calórica:  $2,0 \pm 1,0\%$

Fórmula:

Onde:

$n$  = Tamanho da amostra para cada grupo

$($  = desvio padrão

$z$  = valor da distribuição normal padrão

$(_A$ =Maior média

$(_B$ =Menor média

$\alpha$  = erro do tipo I

$1-\beta$  = Poder do teste

$\tau$  = número de comparações

Valores utilizados:

$1,2+1,0 = 2,2$  (maior valor possível de desvio padrão entre dois grupos)

( $A=4$

( $B=1,6$

$\alpha = 0,05$

$1-\beta = 0,90$

$\tau = 6$

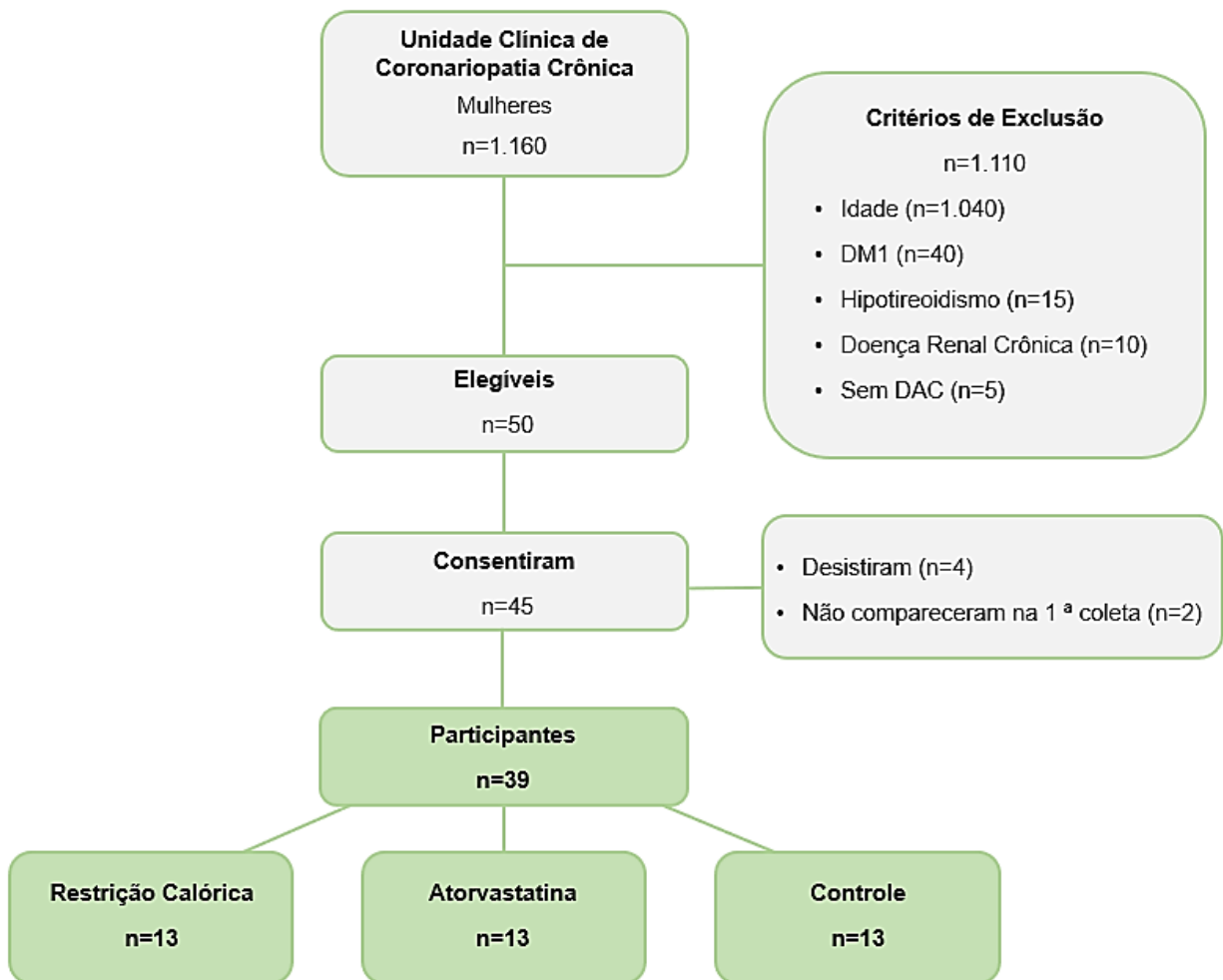
Tamanho da amostra

$n = 13$  (para cada grupo  $n_{total}=39$ )

## 5. Resultados

Foram selecionadas pela lista de agendamento do ambulatório de Coronariopatia Crônica 1.160 mulheres. Destas foram excluídas 1.110, sendo 1.040 mulheres com idade  $\geq 55$  anos, 40 com DM tipo 1, 15 com hipotireoidismo, 10 com doença renal crônica e 5 mulheres sem DAC. Dentre as 50 mulheres elegíveis, 45 foram incluídas e assinaram o TCLE. Destas, quatro desistiram por motivos econômicos e 4 por perda de interesse em participar do estudo. Por fim 39 mulheres completaram o estudo.

**Figura 2:** Organograma do estudo.



Abreviaturas: DM1: Diabetes mellitus tipo 1; DAC: Doença arterial coronária



As características clínicas iniciais encontram-se na Tabela 1. A idade IMC e TMB, foram semelhantes nos três grupos, assim como os fatores de risco e os medicamentos em uso.

**Tabela 1:** Características clínicas dos grupos estudados antes e após 2 meses das intervenções.

	<b>RC (n=13)</b>	<b>A (n=13)</b>	<b>C (n=13)</b>	<b>p</b>
<b>Idade (anos)</b>	49±3	51±4	51±4	0,286
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	29±4	28±3	29±4	0,728
<b>Taxa metabólica basal (Kcal)</b>	1376±107	1354±110	1390±129	0,741
<b>Tabagismo</b>	2 (15%)	0 (0%)	5 (38%)	0,03 <sup>b</sup>
<b>Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2</b>	1 (8%)	2 (15%)	1 (8%)	0,732
<b>HAS</b>	12 (92%)	13 (100%)	12 (92%)	0,382
<b>Dislipidemia</b>	11 (85%)	9 (69%)	11 (85%)	0,624
<b>Angioplastia</b>	8 (62%)	2 (15%)	1 (8%)	0,004 <sup>a</sup>
<b>Cirurgia de revascularização</b>	0 (0%)	2 (15%)	0 (0%)	0,134
<b>DAC uniarterial</b>	1 (8%)	0 (0%)	2 (15%)	0,382
<b>DAC multiarterial</b>	12 (92%)	13 (100%)	12 (92%)	0,624
<b>AAS</b>	13 (100%)	11 (85%)	13 (100%)	0,134
<b>Losartana</b>	2 (15%)	6 (46%)	7 (54%)	0,120
<b>Atenolol</b>	10 (77%)	8 (62%)	7 (54%)	0,477
<b>Carvedilol</b>	1 (8%)	3 (23%)	6 (46%)	0,119
<b>Anlodipino</b>	2 (15%)	7 (54%)	3 (23%)	0,093 <sup>a</sup>
<b>Isossorbida</b>	2 (15%)	2 (15%)	4 (31%)	0,272
<b>Metformina</b>	1 (8%)	2 (15%)	3 (23%)	0,6246

Dados expressos por média± desvio padrão. As distribuições de frequências são expressas em porcentagem (%). Abreviaturas: RC: Restrição calórica; A: Atorvastatina; C: Controle; IMC: Índice de Massa Corporal; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; DAC: Doença arterial coronária; AAS: Ácido acetilsalicílico.<sup>a</sup> RC vs A p<0.01; <sup>b</sup>AvsC p<0.05

### 5.1. Dados antropométricos

Observou-se no grupo RC, após 2 meses de intervenção, uma redução significativa no peso ( $70 \pm 10$  Kg para  $69 \pm 10$  Kg;  $p= 0,02$ ), no IMC ( $29 \pm 4$  kg/m<sup>2</sup> para  $28 \pm 4$  kg/m<sup>2</sup>;  $p= 0,01$ ), na CC ( $92 \pm 11$  cm para  $90 \pm 10$  Kg;  $p= 0,05$ ). Nos grupos A e C não se observou diferença estatística para as variáveis analisadas. Tabela 2.

**Tabela 2:** Dados antropométricos dos grupos estudados antes e após 2 meses das intervenções.

Variáveis	RC (n=13)			A (n=13)			C (n=13)		
	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p
<b>Peso (Kg)</b>	70±10	69±10	<b>0.020</b>	69±11	68±11	0.685	72±13	74±13	0.070
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	29±4	28±4	<b>0.019</b>	28±3	28±3	0.681	29±4	30±4	0.083
<b>CC (cm)</b>	92±11	90±10	<b>0.05</b>	91±8	91±8	0.285	96±10	96±10	0.886

Dados expressos por média±desvio padrão. Abreviaturas: RC: Restrição calórica; A: Atorvastatina; C: Controle; IMC:Índice de massa corporal; CC: Circunferência da cintura; CB: Circunferência do braço.

### 5.3. Dieta habitual e intervenção

Observou-se semelhante ingestão calórica e distribuição dos macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídeos) nos grupos RC e RC+E (Tabela 3).

**Tabela 3:** Consumo de calorias totais da dieta habitual e distribuição percentual dos macronutrientes dos dos grupos estudados.

	RC (n=13)	A (n=13)	C (n=13)	p
<b>Calorias totais (Kcal)</b>	1651±501	1534±290	1614±459	0,775
<b>Proteínas (%)</b>	21±7	17±4	20±6	0,121
<b>Carboidratos (%)</b>	57±13	57±8	51±11	0,290
<b>Lipídeos (%)</b>	22±11	25±9	29±7	0,1568

Dados expressos por média± desvio padrão. Abreviaturas: RC: Restrição calórica; A: Atorvastatina; C: Controle.

A intervenção nutricional no grupo RC consistiu na redução de 30% da ingestão calórica habitual e correspondeu respectivamente em caloria média total de  $1.155 \pm 350$  Kcal.

## 5.2. Perfil lipídico

No grupo A observou-se mudanças no perfil lipídico após 2 meses da intervenção, houve redução do colesterol total ( $231 \text{ mg/dL} \pm 47 \text{ mg/dL}$  para  $169 \text{ mg/dL} \pm 47 \text{ mg/dL}$ ;  $p=0,01$ ), LDL ( $152 \pm 43 \text{ mg/dL}$  para  $98 \text{ mg/dL} \pm 44 \text{ mg/dL}$ ;  $p=0,05$ ), Não-HDL ( $186 \pm 50 \text{ mg/dL}$  para  $120 \pm 45 \text{ mg/dL}$ ;  $p < 0,001$ ) e apo B de ( $1.20 \text{ g/L} \pm 0.30 \text{ g/L}$  para  $0.87 \text{ g/L} \pm 0.28 \text{ g/L}$ ;  $p=0,01$ ). No grupo R verificou-se uma redução na Apo AI de ( $1.59 \text{ g/L} \pm 0.32 \text{ g/L}$  para  $1.43 \text{ g/L} \pm 0.28 \text{ g/L}$ ;  $p=0,01$ ) e Apo B de ( $1.20 \text{ g/L} \pm 0.35 \text{ g/L}$  para  $1.05 \text{ g/L} \pm 0.36 \text{ g/L}$ ;  $p=0,01$ ). No grupo C não se observou diferença após a intervenção nos parâmetros avaliados.

**Tabela 4:** Determinação do perfil lipídico dos grupos estudados no período basal e após 2 meses das intervenções.

Variáveis	RC (n=13)			A (n=13)			C (n=13)		
	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p
<b>Colesterol (mg/dL)</b>									
<b>Total</b>	229±55	207±59	0,074	231±52	169±47	<b>0.01</b>	224±62	238±48	0.341
<b>LDL</b>	143±40	129±49	0,072	152±43	98±44	<b>0.01</b>	151±49	155±44	0.723
<b>HDL</b>	56±13	53±14	0,075	45±13	49±13	0.087	49±8	47±11	0.340
<b>Não-HDL</b>	173±51	156±57	0.200	186±50	120±45	<b>&lt;0.001</b>	178±57	187±53	0.537
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	154±100	129±77	0.151	178±97	111±59	<b>0.004</b>	136±60	163±91	0.345
<b>Apo (g/L)</b>									
<b>A-I</b>	1.59±0.32	1.43±0.28	<b>0.013</b>	1.44±0.25	1.44±0.22	0.974	1.46±0.22	1.49±0.22	0.959
<b>B</b>	1.20±0.35	1.05±0.36	<b>0.011</b>	1.20±0.30	0.87±0.28	<b>0.01</b>	1.20±0.36	1.21±0.31	0.640
<b>Lipoproteína (a)</b>	35.70±31.4	40.51±31.96	0.204	50.52±33	56.93±38.81	0.100	72±39	67±39	0.895

Dados expressos por média ± desvio padrão. Abreviaturas: RC: Restrição calórica; A: Atorvastatina; C: Controle; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; HDL: Lipoproteína de alta densidade; Apo: apolipoproteína.

### **5.2.1 Funcionalidade da HDL**

Na tabela 5 estão expostos os dados da transferência de CE e CL para HDL, composição da HDL e diâmetro. No grupo RC houve redução na transferência de CE ( $p=0.005$ ) e CL ( $P=0.02$ ), entretanto na composição lipídica e tamanho da HDL não houve alteração. Nos grupos A e C não se observou diferenças após as intervenções nestes parâmetros.

**Tabela 5:** Transferência de lípidos da nanoemulsão lipídica para HDL, composição da HDL e diâmetro dos grupos estudados antes e após 2 meses das intervenções.

Variáveis	RC (n=13)			A (n=13)			C (n=13)				
	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p	p	
<b>Taxa de transferência (%)</b>											
<b>Colesterol Esterificado</b>	4.70±0.75	4.15±0.55	<b>0.005</b>	4.37±0.70	4.13±0.38	0.257	4.63±0.52	4.61±0.50	0.925		
<b>Colesterol Livre</b>	5.60±1.32	4.90±1.03	<b>0.025</b>	5.16±0.89	4.97±0.53	0.460	5.33±0.76	5.39±0.68	0.857	0.151	
<b>Composição lipídica da HDL (%)</b>											
<b>Colesterol Esterificado</b>	40.24±9.89	42.13±16	0.675	41.32±10.51	42.47±17.36	0.858	33.23±16.17	27.08±16.50	0.357	0.173	
<b>Colesterol Livre</b>	4.52±1.16	5.02±1.82	0.355	4.53±1.04	4.49±1.23	0.918	5.09±1.24	5.00±1.14	0.859	0.559	
<b>Fosfolípidos</b>	47.96±8.89	44.09±12.91	0.314	47.72±9.21	46.26±14.25	0.788	52.85±13.24	57.62±16.14	0.421	0.631	
<b>Triglicérides</b>	7.21±2.08	8.76±5.33	0.331	6.42±1.69	6.78±3.02	0.662	8.83±4.76	10.29±6.05	0.345	0.457	
<b>Diâmetro da HDL</b>	9.35±0.38	9.64±0.76	0.200	9.04±0.43	9.26±0.44	0.82	9.23±0.73	9.23±0.44	1.000	0.775	

Dados expressos por média± desvio padrão. Abreviaturas: RC: Restrição calórica; A: Atorvastatina; C: Colesterol; HDL: Lipoproteína de alta densidade

### 5.3. Parâmetros bioquímicos

Não houveram diferenças significativas nas variáveis bioquímicas analisadas nos grupos RC, A e C.

**Tabela 6:** Parâmetros bioquímicos basais e após dois meses de intervenção nos grupos estudados.

Variáveis	RC (n=13)			A (n=13)			C (n=13)		
	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p
<b>Glicose (mg/dL)</b>	100±99	99±10	0.693	119±51	113±30	0.360	111±44	11±40	0.871
<b>Hemoglobina</b>									
<b>Glicada (%)</b>	5.9±0.3	5.7±0.4	0.296	6.6±2.0	6.38±1.8	0.095	6.6±2.1	6.3±1.0	0.259
<b>Uréia (mg/dL)</b>	31±8	31±6	0.910	29±10	31±11	0.460	27±6	30±11	0.312
<b>Creatina (mg/dL)</b>	0.77±0.9	0.76±0.9	0.484	0.81±0.18	0.81±0.20	0.852	0.74±0.1	0.82±0.16	0.100
<b>TGO (mg/dL)</b>	23±7	26±9	0.206	19±5	20±4	0.371	21±6	25±17	0.264
<b>TGP (mg/dL)</b>	29±8	33±13	0.289	26±6	28±6	0.193	30±11	38±31	0.273

Dados expressos por média±desvio padrão. Teste t pareado. Abreviaturas: RC: Restrição calórica; A: Atorvastatina; C: Controle; TGO: Transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: Transaminase glutâmico-pirúvica.

### 5.4 Análise da contração sérica do sRAGE e Sirt-1

Na tabela 7 é possível verificar a análise da concentração sérica de RAGE Solúvel antes e após a intervenção. Não houve alterações nos grupos R e A. Em contrapartida no grupo controle foi verificado um aumento do sRAGE (p=0.009).

**Tabela 7:** Concentrações séricas de sRAGE e Sirt1 dos grupos estudados no período basal e após 2 meses.

Variáveis pg/mL	RC (n=13)			A (n=13)			C (n=13)		
	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p	Basal	2 meses	p
sRAGE	1396±708	1411±694	0.747	1413±355	1361±432	0.646	1086±446	1230±412	<b>0.009</b>
Sirt1	206±76	220±82	0.595	224±89	165±61	0.057	213±136	201±91	0.538

Dados expressos por média±desvio padrão. Abreviaturas: RC: Restrição calórica; A: Atorvastatina; C: Controle

## 5.5 Regressão linear múltipla

As Tabelas 8, 9 e 10 apresentam os resultados da regressão linear múltipla dos efeitos das intervenções ajustadas pelas variáveis cardiometabólicas. A Tabela 9 mostra os efeitos da intervenção nos fatores de risco cardiometabólico e Sirt-1.

A restrição energética foi associada a um aumento de Sirt-1 em 63,6 pg/mL ( $\beta = 63,608$ ; IC95% = 1,502–125,714;  $p = 0,045$ ). O IMC associou-se positivamente com Sirt-1 ( $\beta = 36,865$ ; IC95% = 0,804–72,926;  $p = 0,045$ ). O IMC, por sua vez, reduziu 0,8 kg/m<sup>2</sup> após tratamento com restrição energética ( $\beta = -0,811$ ; IC95% = -1,349–0,273;  $p = 0,004$ ). Além disso, o aumento de Sirt-1 foi associado à redução da glicose sérica ( $\beta = 2,212$ ; IC95% = 0,309–4,114;  $p = 0,024$ ) (Tabela 8).

O tratamento com atorvastatina reduziu o LDL-c em 40 mg/dL ( $\beta = -40,045$ ; IC95% = -69,949–-10,140;  $p = 0,010$ ). A redução do LDL-c também foi associada à redução dos triglicerídeos ( $\beta = 0,243$ ; IC95% = 0,043–0,443;  $p = 0,019$ ).

Os triglicerídeos, por sua vez, foram reduzidos pela restrição energética ( $\beta = -61,914$ ; IC95% = -108,758–-15,070;  $p = 0,011$ ) e atorvastatina ( $\beta = -71,840$ ; IC95% = -122,773–-20,907;  $p = 0,007$ ) e apresentou associação inversa com HDL-c ( $\beta = -3,929$ ; IC95% = -7,407–-0,450;  $p = 0,028$ ).

Em relação à transferência de lipídios para a partícula HDL (Tabela 9), verificou-se que as alterações (delta) dos triglicerídeos séricos ( $\beta = 0,006$ ; IC95% = 0,002–0,009;  $p = 0,004$ ) e HDL-c ( $\beta = 0,042$ ; IC95% = 0,002–0,081;  $p = 0,038$ ) foram



positivamente associados à transferência de colesterol esterificado. A transferência de colesterol livre também foi associada a triglicerídeos ( $\beta = 0,007$ ; IC95% = 0,002–0,013;  $p = 0,006$ ) e HDL-c ( $\beta = 0,082$ ; IC95% = 0,022–0,142;  $p = 0,009$ ).

Quanto à composição lipídica do HDL (Tabela 9), a redução do IMC correlacionou-se com a redução de colesterol livre ( $\beta = 0,818$ ; IC95% = 0,044–1,593;  $p = 0,039$ ) e fosfolipídios da partícula ( $\beta = 7,486$ ; IC95% = 0,350–14,622;  $p = 0,040$ ). O aumento da Sirt-1 sérica também foi associado à redução do teor de fosfolipídios do HDL ( $\beta = -0,071$ ; IC95% = -0,136–-0,006;  $p = 0,033$ ).

Não observamos nenhuma associação do tratamento com atorvastatina ou redução de LDL-c com a composição lipídica das partículas de HDL ou parâmetros de transferência de lipídios (Tabela 9).

Observamos que a redução do LDL-c sérico estava associada à diminuição dos produtos de oxidação do HDL (Tabela 10), representado pela taxa máxima de peroxidação lipídica ( $V_{max} - \beta = 0,002$ ; IC95% = 0,000–0,003;  $p = 0,022$ ), tempo para produção máxima de conjugado dienos ( $T_{max} - \beta = 0,178$ ; IC95% = 0,027–0,330;  $p = 0,023$ ), e produção máxima de dienos conjugados ( $DO_{max} - \beta = 0,001$ ; IC95% = 0,000–0,001;  $p = 0,029$ ), mas sem associações estatisticamente significativas com AUC. Não observamos associações estatisticamente significativas da capacidade antioxidante da HDL com Sirt-1, IMC ou restrição calórica.

**Tabela 8:** Efeito das intervenções nas diferentes variáveis de fatores de risco e sirtuína-1.

(Continuação)

Variáveis	Modelo inicial					Modelo final				
	R2	$\beta$	IC 95% $\beta$		p	R2	$\beta$	IC 95% $\beta$		p
			Minima	Máxima				Lower	Upper	
<i>Sirtuína-1</i>	0,341					0,308				
<b>Constante</b>		-29,798	-86,33	26,735	0,289		-32,46	-68,365	3,446	0,075
<b>IMC (kg/m2)</b>		34,537	-5,073	74,147	0,085		36,865	0,804	72,926	<b>0,045</b>
HDL-C (mg/dL)		-1,084	-6,795	4,628	0,701					
LDL-C (mg/dL)		0,133	-0,682	0,948	0,741					
Triglicérides (mg/dL)		0,139	-0,419	0,697	0,613					
Glicose (mg/dL)		2,166	0,070	4,262	<b>0,043</b>		2,212	0,309	4,114	<b>0,024</b>
<b>Restrição calórica</b>		63,882	-22,267	150,031	0,140		63,608	1,502	125,714	<b>0,045</b>
<b>Atorvastatina</b>		3,920	-93,872	101,712	0,935					
<i>LDL-C</i>	0,428					0,396				
<b>Constante</b>		1,999	-25,338	29,335	0,882		-10,909	-26,252	4,433	0,157
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		0,030	-0,153	0,213	0,741					
<b>IMC (kg/m2)</b>		-7,612	-27,207	11,982	0,433					
HDL-C (mg/dL)		-0,035	-2,750	2,679	0,979					
Triglicérides (mg/dL)		0,193	-0,062	0,448	0,133		0,243	0,043	0,443	<b>0,019</b>
Glicose (mg/dL)		0,034	-1,036	1,104	0,949					
<b>Restrição calórica</b>		-24,570	-65,973	16,834	0,234					
<b>Atorvastatina</b>		-53,835	-95,244	-12,427	<b>0,013</b>		-40,045	-69,949	-10,14	<b>0,010</b>

**Tabela 8:** Efeito das intervenções nas diferentes variáveis de fatores de risco e sirtuína-1.

(Continuação)

Variáveis	Modelo inicial					Modelo final				
	R2	$\beta$	IC 95% $\beta$		p	R2	$\beta$	IC 95% $\beta$		p
			Mínima	Máxima				Lower	Upper	
<b>HDL-C</b>	0,290					0,178				
<b>Constante</b>		-1,232	-5,102	2,639	0,520		-1,576	-3,483	0,331	
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		-0,005	-0,031	0,021	0,701					
<b>IMC (kg/m2)</b>		0,286	-2,538	3,109	0,837					
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		-0,001	-0,056	0,054	0,979					
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>		-0,036	-0,071	-0,001	<b>0,045</b>		-0,036	-0,064	-0,009	
<b>Glicose (mg/dL)</b>		0,104	-0,043	0,251	0,158					
<b>Restrição calórica</b>		-1,873	-7,888	4,142	0,529					
<b>Atorvastatina</b>		1,557	-5,027	8,140	0,632					
<b>Triglicérides</b>	0,450					0,382				
<b>Constante</b>		24,572	-14,100	63,245	0,204		27,166	-7,574	61,905	0,121
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		0,066	-0,200	0,332	0,613					
<b>IMC (kg/m2)</b>		1,829	-27,019	30,676	0,898					
<b>HDL-C (mg/dL)</b>		-3,757	-7,433	-0,082	<b>0,045</b>		-3,929	-7,407	-0,450	<b>0,028</b>
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		0,4090	-0,132	0,950	0,133					
<b>Glicose (mg/dL)</b>		0,3150	-1,239	1,869	0,681					
<b>Restrição calórica</b>		-49,066	-107,944	9,812	0,099		-61,914	-108,758	-15,070	<b>0,011</b>
<b>Atorvastatina</b>		-37,427	-103,363	28,509	0,255		-71,84	-122,773	-20,907	<b>0,007</b>

**Tabela 8:** Efeito das intervenções nas diferentes variáveis de fatores de risco e sirtuína-1.

(Conclusão)

Variáveis	Modelo inicial					Modelo final				
	R2	$\beta$	IC 95% $\beta$		p	R2	$\beta$	IC 95% $\beta$		p
			Minima	Máxima				Lower	Upper	
<b>Glicose</b>	0,242					0,174				
<b>Constante</b>		1,778	-8,09	11,646	0,715		-1,239	-5,910	3,432	0,593
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		0,064	0,002	0,125	<b>0,043</b>		0,067	0,016	0,117	<b>0,011</b>
<b>IMC (kg/m2)</b>		-0,497	-7,662	6,668	0,888					
<b>HDL-C (mg/dL)</b>		0,671	-0,276	1,618	0,158					
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		0,004	-0,136	0,144	0,949					
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>		0,019	-0,076	0,115	0,681					
<b>Restrição calórica</b>		-1,455	-16,811	13,901	0,847					
<b>Atorvastatina</b>		-4,664	-21,334	12,007	0,571					
<b>IMC</b>	0,321					0,270				
<b>Constante</b>		0,530	0,037	1,023	<b>0,036</b>		0,34	0,014	0,666	<b>0,042</b>
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		0,003	0,000	0,006	0,085		0,003	0,000	0,006	<b>0,026</b>
<b>HDL-C (mg/dL)</b>		0,005	-0,048	0,058	0,837					
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		-0,003	-0,010	0,005	0,433					
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>		0,000	-0,005	0,006	0,898					
<b>Glicose (mg/dL)</b>		-0,001	-0,022	0,019	0,888					
<b>Restrição calórica</b>		-1,046	-1,770	-0,321	<b>0,006</b>		-0,811	-1,349	-0,273	<b>0,004</b>
<b>Atorvastatina</b>		-0,586	-1,463	0,291	0,182					

**Tabela 9:** Composição lipídica da HDL e transferência de colesterol.

(Continuação)

Variáveis	Modelo inicial					Modelo final				
	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p
			Mínima	Máxima				Mínima	Máxima	
<i>Transferência de colesterol para HDL</i>										
<b>Colesterol esterificado</b>	0,381					0,358				
<b>Constante</b>		-0,084	-0,517	0,349	0,694		-0,063	-0,439	0,312	0,733
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		0,001	-0,002	0,004	0,581					
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>		0,067	-0,246	0,381	0,663					
<b>HDL-C (mg/dL)</b>		0,042	-0,001	0,085	0,056		0,042	0,002	0,081	<b>0,038</b>
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		0,002	-0,005	0,008	0,599					
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>		0,005	0,001	0,009	<b>0,017</b>		0,006	0,002	0,009	<b>0,004</b>
<b>Glicose (mg/dL)</b>		-0,002	-0,019	0,015	0,844					
<b>Restrição calórica</b>		-0,18	-0,852	0,493	0,588		-0,243	-0,782	0,297	0,366
<b>Atorvastatina</b>		0,061	-0,673	0,794	0,867		-0,074	-0,668	0,52	0,801
<b>Colesterol livre</b>	0,315					0,257				
<b>Constante</b>		0,055	-0,642	0,751	0,873		-0,105	-0,447	0,237	0,538
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		0,001	-0,003	0,006	0,558					
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>		0,122	-0,383	0,627	0,623					
<b>HDL-C (mg/dL)</b>		0,071	0,002	0,14	<b>0,045</b>		0,082	0,022	0,142	<b>0,009</b>
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		0	-0,01	0,01	0,967					
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>		0,006	-0,001	0,012	0,095		0,007	0,002	0,013	<b>0,006</b>
<b>Glicose (mg/dL)</b>		0,003	-0,024	0,03	0,818					
<b>Restrição calórica</b>		-0,402	-1,484	0,681	0,453					
<b>Atorvastatina</b>		-0,09	-1,271	1,091	0,877					

**Tabela 9:** Composição lipídica da HDL e transferência de colesterol.

(Continuação)

Variáveis	Modelo inicial					Modelo final				
	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p
			Mínima	Máxima				Mínima	Máxima	
<i>Composição da HDL</i>										
<i>Colesterol livre</i>	0,236					0,189				
<b>Constante</b>		-0,607	-1,805	0,591	0,308		-0,675	-1,764	0,413	0,215
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		-0,001	-0,009	0,007	0,827					
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>		0,921	0,053	1,789	<b>0,038</b>		0,818	0,044	1,593	<b>0,039</b>
<b>HDL-C (mg/dL)</b>		-0,082	-0,201	0,037	0,169		-0,068	-0,17	0,033	0,179
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		0,008	-0,009	0,025	0,317					
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>		-0,005	-0,017	0,006	0,348					
<b>Glicose (mg/dL)</b>		-0,003	-0,05	0,044	0,901					
<b>Restrição calórica</b>		1,378	-0,483	3,239	0,14		1,363	-0,181	2,907	0,082
<b>Atorvastatina</b>		1,051	-0,979	3,082	0,298		0,907	-0,642	2,456	0,241
<i>Colesterol esterificado</i>	0,217					0,119				
<b>Constante</b>		0,569	-14,059	15,198	0,937		-3,591	-16,91	9,729	0,586
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		0,071	-0,027	0,17	0,147					
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>		-9,366	-19,966	1,233	0,081		-6,501	-16,289	3,286	0,185
<b>HDL-C (mg/dL)</b>		0,266	-1,186	1,718	0,71					
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		-0,075	-0,282	0,132	0,464					
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>		-0,039	-0,181	0,103	0,579					
<b>Glicose (mg/dL)</b>		0,157	-0,415	0,729	0,578		0,314	-0,19	0,819	0,213
<b>Restrição calórica</b>		-5,612	-28,336	17,112	0,616		2,967	-16,446	22,381	0,757
<b>Atorvastatina</b>		-4,196	-28,993	20,601	0,731		4,159	-14,77	23,089	0,657

**Tabela 9:** Composição lipídica da HDL e transferência de colesterol.

(Conclusão)

Variáveis	Modelo inicial					Modelo final				
	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p
			Mínima	Máxima				Mínima	Máxima	
<b>Fosfolípides</b>	0,254					0,187				
<b>Constante</b>		-1,165	-13,526	11,195	0,848		-0,41	-6,23	5,41	0,887
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		-0,078	-0,161	0,005	0,065		-0,071	-0,136	-0,006	<b>0,033</b>
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>		8,057	-0,899	17,013	0,076		7,486	0,35	14,622	<b>0,04</b>
<b>HDL-C (mg/dL)</b>		-0,254	-1,481	0,973	0,674					
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		0,064	-0,111	0,239	0,462					
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>		0,029	-0,091	0,149	0,621					
<b>Glicose (mg/dL)</b>		-0,111	-0,595	0,373	0,642					
<b>Restrição calórica</b>		3,311	-15,89	22,513	0,726					
<b>Atorvastatina</b>		3,228	-17,725	24,18	0,754					
<b>Triglicérides</b>	0,087					0,087				
<b>Constante</b>		1,206	-2,376	4,788	0,496		1,206	-2,376	4,788	0,496
<b>Sirtuína-1 (ng/mL)</b>		0,008	-0,016	0,032	0,511		0,008	-0,016	0,032	0,511
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>		0,379	-2,216	2,974	0,767		0,379	-2,216	2,974	0,767
<b>HDL-C (mg/dL)</b>		0,067	-0,288	0,423	0,7		0,067	-0,288	0,423	0,7
<b>LDL-C (mg/dL)</b>		0,003	-0,048	0,053	0,912		0,003	-0,048	0,053	0,912
<b>Triglicérides (mg/dL)</b>		0,015	-0,02	0,05	0,387		0,015	-0,02	0,05	0,387
<b>Glicose (mg/dL)</b>		-0,044	-0,184	0,096	0,527		-0,044	-0,184	0,096	0,527
<b>Restrição calórica</b>		0,97	-4,594	6,534	0,723		0,97	-4,594	6,534	0,723
<b>Atorvastatina</b>		-0,06	-6,131	6,012	0,984		-0,06	-6,131	6,012	0,984

Tabela 10: Capacidade antioxidante da HDL.

(Continuação)

Variáveis	Modelo inicial					Modelo final				
	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p
			Mínima	Máxima				Mínima	Máxima	
<i>VMax</i>	0,304					0,238				
Constante		0,075	-0,070	0,221	0,294		0,068	-0,016	0,151	0,110
Sirtuína-1 (ng/mL)		0,000	-0,001	0,001	0,615					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )		0,052	-0,102	0,205	0,492					
HDL-C (mg/dL)		0,011	-0,005	0,026	0,175		0,011	0,000	0,022	0,052
LDL-C (mg/dL)		0,002	0,000	0,004	0,06		0,002	0,000	0,003	<b>0,022</b>
Triglicérides (mg/dL)		0,000	-0,002	0,001	0,596					
Glicose (mg/dL)		-0,001	-0,007	0,005	0,689					
Restrição calórica		-0,006	-0,218	0,207	0,955					
Atorvastatina		0,013	-0,205	0,232	0,899					
<i>TMax</i>	0,227					0,212				
Constante		4,135	-7,206	15,476	0,457		3,892	-6,564	14,348	0,450
Sirtuína-1 (ng/mL)		-0,002	-0,08	0,075	0,955					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )		5,420	-6,543	17,383	0,357		4,941	-4,398	14,28	0,286
HDL-C (mg/dL)		0,358	-0,874	1,590	0,553					
LDL-C (mg/dL)		0,17	-0,002	0,341	0,053		0,178	0,027	0,330	<b>0,023</b>
Triglicérides (mg/dL)		-0,041	-0,151	0,068	0,444		-0,057	-0,144	0,030	0,188
Glicose (mg/dL)		-0,010	-0,476	0,456	0,964					
Restrição calórica		4,289	-12,303	20,88	0,597		3,181	-11,279	17,641	0,654
Atorvastatina		4,374	-12,692	21,44	0,600		5,155	-10,59	20,901	0,506



Tabela 10: Capacidade antioxidante da HDL.

(Conclusão)

Variáveis	Modelo inicial					Modelo final				
	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p	R <sup>2</sup>	β	IC 95% β		p
			Mínima	Máxima				Mínima	Máxima	
<i>Pico de densidade óptica</i>	0,244					0,23				
Constante		0,017	-0,026	0,059	0,425		0,014	-0,023	0,051	0,432
Sirtuína-1 (ng/mL)		0	0	0	0,95					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )		0,008	-0,037	0,053	0,714					
HDL-C (mg/dL)		0,002	-0,003	0,007	0,401		0,002	-0,001	0,006	0,178
LDL-C (mg/dL)		0,001	0	0,001	0,054		0,001	0	0,001	<b>0,029</b>
Triglicérides (mg/dL)		0	0	0	0,714					
Glicose (mg/dL)		0	-0,001	0,002	0,665					
Restrição calórica		0,004	-0,058	0,067	0,885		0,005	-0,042	0,053	0,822
Atorvastatina		0,014	-0,05	0,078	0,648		0,013	-0,044	0,07	0,637
<i>Área sob a curva</i>	0,174					0,103				
Constante		215,151	-421,24	851,542	0,49		158,209	-187,4	503,82	0,356
Sirtuína-1 (ng/mL)		0,205	-4,145	4,555	0,923					
IMC (kg/m <sup>2</sup> )		18,952	-652,32	690,22	0,954					
HDL-C (mg/dL)		20,817	-48,32	89,955	0,538					
LDL-C (mg/dL)		6,981	-2,657	16,619	0,147		5,429	-0,778	11,636	0,084
Triglicérides (mg/dL)		-0,285	-6,43	5,86	0,924					
Glicose (mg/dL)		5,801	-20,341	31,942	0,649					
Restrição calórica		-52,767	-983,76	878,228	0,907					
Atorvastatina		169,693	-787,92	1127,31	0,716					

## 6. Discussão

Neste estudo randomizado avaliamos o efeito da restrição calórica e a administração da atorvastatina nas concentrações séricas da Sirt-1, RAGE solúvel e funcionalidade da HDL. Observou-se que a restrição calórica e a atorvastatina foram associadas a melhorias do perfil lipídico, concentrações séricas da Sirt-1 e funcionalidade da HDL. A RC promoveu redução do peso, IMC e CC. Sabe-se que o excesso de gordura corporal abdominal pode levar a doença aterosclerótica (SAHAKYAN et al., 2015). Por outro lado, a redução da obesidade associou-se à melhora no perfil lipídico (PICHÉ ME et al., 2020). Além disso observamos redução dos triglicérides e aumento da concentração sérica de Sirt-1.

Em relação a funcionalidade da HDL, houve uma redução na transferência de colesterol livre e colesterol esterificado para HDL e uma redução no conteúdo de fosfolípidos e colesterol livre na composição da HDL. O grupo Atorvastatina melhorou a funcionalidade da HDL pela redução da produção de dienos conjugados.

Estudos têm demonstrado que o aumento das concentrações de Sirt-1 estão associados a melhora na homeostase vascular, perfil metabólico e proteção contra o envelhecimento endotelial (KANE, A e SINCLAIR, 2018; ROGGERIO; STRUNZ; PACANARO; LEAL et al., 2018). Em contrapartida sua redução tem sido associada à disfunção cardiometabólica (KANE, A e SINCLAIR, 2018). Poucos estudos clínicos mostraram que o aumento de Sirt-1, que pode ser alcançado pela RC ou compostos bioativos da dieta, se correlaciona com a melhora dos fatores de risco cardiovascular.

Estudo anterior em indivíduos saudáveis realizado pelo nosso grupo mostrou a mesma associação, entre RC e aumento da Sirt-1. A Sirt-1 aumenta a síntese de óxido nítrico favorecendo a vasodilatação vascular, promove a regeneração de endotélio e protege os cardiomiócitos das espécies reativas de oxigênio (MANSUR, A. P.; ROGGERIO, A.; GOES, M. F. S.; AVAKIAN, S. D. et al. 2017). Por outro lado, estudos têm demonstrado que níveis circulantes reduzidos e expressão de Sirt-1 são preditivos de placas de aterosclerose coronariana em pacientes assintomáticos, assim como em pacientes com DAC (KANE, A e SINCLAIR, 2018; HE; ZHENG; LIU, 2019). Sabe-se que a Sirt-1 tem uma correlação positiva com a funcionalidade do HDL (HE; ZHENG; LIU, 2019). A proteção anti-aterogênica da HDL deve-se às diversas funções que esta

lipoproteína desempenha, dentre elas atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitrombótica (MEYERS; KASHYAP, 2004). Existe a correlação inversa entre os níveis de HDL e a incidência de doença arterial coronária (DAC). A composição lipídica do HDL é determinada por múltiplos fatores como a composição de gorduras dietéticas (SOLA; BAUDET; MOTTA; MAILLÉ et al., 1990). A composição lipídica da HDL influencia suas funções anti-aterogênicas. Existe uma correlação inversa entre a quantidade de fosfolípidos da HDL e a extensão da aterosclerose coronária (KUNZ et al., 2005). Um estudo observacional caso-controle em 2428 mulheres na pós-menopausa mostrou que o fosfolípido sérico com alto teor ácidos graxos saturados de cadeia longa foi associado ao aumento do risco de doença arterial coronariana (THAKKAR; VINCENT; ROY; GAUTAM et al., 2022).

Além disso, estudos mostram que a diminuição das concentrações séricas e expressão de Sirt-1 foram preditivas de maior intensidade de aterosclerose coronariana em pacientes assintomáticos e sintomáticos com DAC (HE; ZHENG; LIU, 2019; BREITENSTEIN; WYSS; SPESCHA; FRANZECK et al., 2013)

Por outro lado, dados na literatura mostram que a Sirt-1 associou-se com maior concentração sérica de HDL e a melhora na sua função, medida pela atividade da paraoxonase-1 (BREITENSTEIN; WYSS; SPESCHA; FRANZECK et al., 2013).

O colesterol livre e os fosfolípidos são lipídios superficiais do HDL. As baixas concentrações séricas desses lipídios aumentam a fluidez da membrana, reduzindo a formação de complexos lipídicos, que são conhecidos por enrijecer a membrana do HD (DAVIDSON; GILLOTTE; LUND-KATZ; JOHNSON et al., 1995). As partículas de HDL com fluidez reduzida estão mais propensas à oxidação e, portanto, à disfunção da HDL (FERNÁNDEZ-CASTILLEJO; RUBIÓ; HERNÁEZ; CATALÁN et al., 2017).

Dados da literatura mostram que pacientes com DAC apresentaram pior composição e função lipídica da HDL (MARANHÃO; FREITAS; STRUNZ; SANTOS et al., 2012). Além disso, a composição de ácidos graxos fosfolipídicos também contribui para a fluidez da membrana, e membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, especialmente da família ômega-3, associou-se à menor o risco cardiovascular (GONÇALINHO; SAMPAIO; SOARES-FREITAS; DAMASCENO, 2021). Portanto, nossos resultados sugerem que o aumento de Sirt-1 induziu uma melhor composição lipídica das membranas de HDL, o que se traduz em melhor função da HDL.

Outro achado do nosso estudo foi a associação entre redução de triglicerídeos séricos e transferência de colesterol livre e esterificado para HDL. A menor transferência de colesterol livre e esterificado para HDL diminui o transporte reverso de colesterol devido à redução da concentração e atividade da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP). Essas alterações na CETP resultam, dentre outros mecanismos, da redução de triglicerídeos pela restrição calórica ou por ação da atorvastatina. Apesar da diminuição da CETP plasmática, as propriedades de efluxo de colesterol do HDL não se modificaram após a restrição energética (WANG; SNEL; JONKER; HAMMER et al., 2011).

Nossos resultados também mostraram que a restrição energética diminuiu o HDL-c e apoA-I no plasma. Uma meta-análise de 70 estudos mostrou que o HDL diminuiu após a perda de peso inicial, mas o nível de HDL aumenta após a fase de estabilização do peso (DATTILO; KRIS-ETHERTON, 1992). O curto tempo de intervenção de restrição calórica de nossos pacientes pode explicar a baixa concentração plasmática de HDL, pois não atingiram a fase de estabilização do peso. Além disso, a redução de triglicerídeos pela atorvastatina foi de quase 40%, semelhante aos descritos na literatura (ADAMS; TSANG; WRIGH, 2015).

Outro achado em nosso estudo foi a correlação positiva entre as alterações da Sirt-1 e do IMC. Essa associação é pouco compreendida, mas estudo anterior mostrou resultados semelhantes em mulheres, mas inversa nos homens (OPSTAD; SUNDFOR; TONSTAD; SELJEFLOT, 2021)

Nosso estudo mostrou que não houve diferença nas concentrações séricas do sRAGE em ambos os grupos, mas foi observado um aumento na concentração no grupo controle. Esse aumento não foi observado nos grupos da RC e da atorvastatina. Portanto, o aumento isolado do sRAGE no grupo controle pode ter sido casual.

No grupo atorvastatina observou-se uma relação direta entre a redução do LDL-c e diminuição da geração de dienos conjugados no HDL, indicando possivelmente uma melhora da capacidade antioxidante do HDL. Concentrações de LDL-c mais elevadas estão associados a LDL mais oxidada (oxLDL), uma fonte essencial de estresse oxidativo sistêmico e também da resposta imunoinflamatória característica do processo aterosclerose. Em um estado não inflamatório, o HDL promove o efluxo de colesterol dos macrófagos, inibe a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e aumenta a produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais. No entanto, na resposta de fase aguda ou inflamação sistêmica, sendo

esta última um marco da aterosclerose, promove a agregação da proteína amiloide sérica com o HDL, reduzindo assim sua capacidade de efluxo de colesterol e produção de NO. Além disso, o HDL disfuncional aumenta a produção de ROS, com produção acentuada de peróxidos lipídicos, como dienos conjugados (FOGELMAN, 2015; BRITES; MARTIN; GUILLAS; KONTUSH, 2017).

A atorvastatina também tem um efeito antioxidante, pois regula positivamente a expressão da catalase e negativamente a NAD(P)H oxidase. Esses achados contribuem para a maior capacidade antioxidante do HDL (WASSMANN; LAUFS; MÜLLER; KONKOL et al., 2002).

Nosso estudo tem algumas limitações. Primeiro, a pequena amostra de pacientes limitou a avaliação do efeito real das intervenções. Apesar disso, o tamanho da amostra teve poder suficiente para detectar alterações na função HDL. Outra limitação é que não analisamos a CETP para avaliar as possíveis alterações na capacidade de efluxo de colesterol. E, finalmente, o papel da função do HDL na previsão de resultados clínicos ainda não está claro, e estudos futuros são necessários.

## **7. Conclusão**

Nosso estudo mostrou que a restrição calórica reduziu o IMC e aumentou a concentração sérica de Sirt-1. Observou-se também redução de fosfolípidos e de colesterol livre da composição da HDL que, associado ao aumento da Sirt-1, poderia proteger a HDL da oxidação e aumentar a fluidez da membrana. Quanto à atorvastatina, a capacidade antioxidante da HDL foi provavelmente modulada pela menor produção total de dienos conjugados da HDL devido à redução do LDL-c. Esse é um estudo gerador de hipóteses e outros estudos com maior número de pacientes e longitudinais de longo prazo serão necessários para investigar o impacto dessas alterações na partícula da HDL na saúde vascular.

## 8. Bibliografia

ATHYROS, V. G.; MIKHAILIDIS, D. P. Pharmacotherapy: statins and new-onset diabetes mellitus--a matter for debate. *Nat Rev Endocrinol*, v. 8, n. 3, p. 133-4, Mar 2012. ISSN 1759-5037.

BALES, C. W.; KRAUS, W. E. Caloric restriction: implications for human cardiometabolic health. *J Cardiopulm Rehabil Prev*, v. 33, n. 4, p. 201-8, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1932-751X.

BALLARD, K. D. et al. Dietary carbohydrate restriction improves insulin sensitivity, blood pressure, microvascular function, and cellular adhesion markers in individuals taking statins. *Nutr Res*, v. 33, n. 11, p. 905-12, Nov 2013. ISSN 1879-0739.

BARKAS, F. et al. Statin therapy with or without ezetimibe and the progression to diabetes. *J Clin Lipidol*, v. 10, n. 2, p. 306-13, 2016 Mar-Apr 2016. ISSN 1933-2874.

BREITENSTEIN, A.; WYSS, C. A.; SPESCHA, R. D.; FRANZECK, F. C. et al. Peripheral blood monocyte Sirt1 expression is reduced in patients with coronary artery disease. *PLoS One*, 8, n. 1, p. e53106, 2013.

BRITES, F.; MARTIN, M.; GUILLAS, I.; KONTUSH, A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin*, 8, p. 66-77, Dec 2017.

BIRNBAUM, Y. et al. PTEN upregulation may explain the development of insulin resistance and type 2 diabetes with high dose statins. *Cardiovasc Drugs Ther*, v. 28, n. 5, p. 447-57, Oct 2014. ISSN 1573-7241. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25106875> >.

CAI, W. et al. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 109, n. 39, p. 15888-93, Sep 2012. ISSN 1091-6490.

CALZA, L. et al. No correlation between statin exposure and incident diabetes mellitus in HIV-1-infected patients receiving combination antiretroviral therapy. *HIV Med*, Mar 2016. ISSN 1468-1293.

CASELLA-FILHO, A. et al. Effect of exercise training on plasma levels and functional properties of high-density lipoprotein cholesterol in the metabolic syndrome. *Am J Cardiol*, v. 107, n. 8, p. 1168-72, Apr 2011. ISSN 1879-1913.

CASTELLI, W. P. et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*, v. 256, n. 20, p. 2835-8, Nov 1986. ISSN 0098-7484.

CHIANG, K. H. et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products are associated with endothelial function and predict cardiovascular events in nondiabetic patients. *Coron Artery Dis*, v. 20, n. 4, p. 267-73, Jun 2009. ISSN 1473-5830.

COLEMAN, C. I. et al. The effect of statins on the development of new-onset type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Curr Med Res Opin*, v. 24, n. 5 1359-62, May 2008. ISSN 1473-4877.

CÉSAR, L. A.; MANSUR, A. E. P.; FERREIRA, J. F. Executive Summary of the Guidelines on Stable Coronary Disease. *Arq Bras Cardiol*, v. 105, n. 4, p. 328-38, Oct 2015. ISSN 1678-4170.

DAMINELLI, E. N. et al. Alterations in lipid transfer to high-density lipoprotein (HDL) and activity of paraoxonase-1 in HIV+ patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 50, n. 4, p. 223-7, 2008 Jul-Aug 2008. ISSN 0036-4665.

DAS, S. K. et al. Long-term effects of 2 energy-restricted diets differing in glycemic load on dietary adherence, body composition, and metabolism in CALERIE: a 1-y randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, v. 85, n. 4, p. 1023-30, Apr 2007. ISSN 0002-9165.

DATTILO, A. M.; KRIS-ETHERTON, P. M. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 56, n. 2, p. 320-328, Aug 1992.

DAVIDSON, W. S.; GILLOTTE, K. L.; LUND-KATZ, S.; JOHNSON, W. J. et al. The effect of high density lipoprotein phospholipid acyl chain composition on the efflux of cellular free cholesterol. *J Biol Chem*, 270, n. 11, p. 5882-5890, Mar 17 1995.

DE SOUZA, M. E. F. et al. Serial temporal analysis of ischemic heart disease and stroke death risk in five regions of Brazil from 1981 to 2001. *Arq Bras Cardiol*, v. 87, n. 6, p. 735-40, Dec 2006. ISSN 1678-4170.

DERBY, C. A. et al. Lipid changes during the menopause transition in relation to age and weight: the Study of Women's Health Across the Nation. *Am J Epidemiol*, v. 169, n. 11, p. 1352-61, Jun 2009. ISSN 1476-6256.

DOLINSKY, V. W.; DYCK, J. R. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease. *Biochim Biophys Acta*, v. 1812, n. 11, p. 1477-89, Nov 2011. ISSN 0006-3002.

DORLING, J. L.; RAVUSSIN, E.; REDMAN, L. M.; BHAPKAR, M. et al. Effect of 2 years of calorie restriction on liver biomarkers: results from the CALERIE phase 2 randomized controlled trial. *Eur J Nutr*, 60, n. 3, p. 1633-1643, Apr 2021.

EGOM, E. E.; HAFEEZ, H. Biochemistry of Statins. *Adv Clin Chem*, v. 73, p. 127-68, 2016. ISSN 0065-2423.

FALCONE, C. et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 25, n. 5, p. 1032-7, May 2005. ISSN 1524-4636.



FERNÁNDEZ-CASTILLEJO, S.; RUBIÓ, L.; HERNÁEZ, Á.; CATALÁN, Ú. et al. Determinants of HDL Cholesterol Efflux Capacity after Virgin Olive Oil Ingestion: Interrelationships with Fluidity of HDL Monolayer. *Mol Nutr Food Res*, 61, n. 12, 12 2017.

FEITOSA-FILHO, G. S. et al. Lipid transfer to HDL in type-2 diabetic patients: associations with microalbuminuria, statin, and insulin. *Arq Bras Cardiol*, v. 92, n. 2, p. 94-106, Feb 2009. ISSN 1678-4170.

FOGARI, R. et al. Effect of body weight loss and normalization on blood pressure in overweight non-obese patients with stage 1 hypertension. *Hypertens Res*, v. 33, n. 3, p. 236-42, Mar 2010. ISSN 1348-4214.

FONTANA, L. et al. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 17, p. 6659-63, Apr 2004. ISSN 0027-8424.

FORD, E. S. et al. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N Engl J Med*, v. 356, n. 23, p. 2388-98, Jun 2007. ISSN 1533-4406.

FOGELMAN, A. M. Further evidence that high-density lipoprotein is a chameleon-like lipoprotein. *Eur Heart J*, 36, n. 43, p. 3017-3019, Nov 14 2015.

FRANCESCHINI, G. Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol*, v. 88, n. 12A, p. 9N-13N, Dec 2001. ISSN 0002-9149

GERAGHTY L, FIGTREE GA, SCHUTTE AE, PATEL S, WOODWARD M, ARNOTT C. Cardiovascular Disease in Women: From Pathophysiology to Novel and Emerging Risk Factors. *Heart Lung Circ*. 2021 Jan;30(1):9-17. doi: 10.1016/j.hlc.2020.05.108. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32843293.

GONÇALINHO, G. H. F.; SAMPAIO, G. R.; SOARES-FREITAS, R. A. M.; DAMASCENO, N. R. T. Omega-3 Fatty Acids in Erythrocyte Membranes as Predictors

of Lower Cardiovascular Risk in Adults without Previous Cardiovascular Events. *Nutrients*, 13, n. 6, Jun 03 2021.

GIRIBELA, A. H. et al. HDL concentration, lipid transfer to HDL, and HDL size in normolipidemic nonobese menopausal women. *Int J Gynaecol Obstet*, v. 104, n. 2, p. 117-20, Feb 2009. ISSN 0020-7292.

GUO, Z. et al. Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice. *Mech Ageing Dev*, v. 123, n. 8, p. 1121-31, Apr 2002. ISSN 0047-6374. >.

HANFORD, L. E. et al. Purification and characterization of mouse soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE). *J Biol Chem*, v. 279, n. 48, p. 50019-24, Nov 2004. ISSN 0021-9258.

HEIER, M. et al. Soluble RAGE and atherosclerosis in youth with type 1 diabetes: a 5-year follow-up study. *Cardiovasc Diabetol*, v. 14, n. 1, p. 126, 2015. ISSN 1475-2840.

HE, X.; ZHENG, J.; LIU, C. Low serum level of sirtuin 1 predicts coronary atherosclerosis plaques during computed tomography angiography among an asymptomatic cohort. *Coron Artery Dis*, 30, n. 8, p. 621-625, Dec 2019.

HINDLE, A. K. et al. Identification of cardiovascular genes in omentum from morbidly obese patients with type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)*, v. 34, n. 6, p. 1020-7, Jun 2010. ISSN 1476-5497.

HOFMANN, M. A. et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, v. 97, n. 7, p. 889-901, Jun 1999. ISSN 0092-8674.

HUDSON, B. I. et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J*, v. 22, n. 5, p. 1572-80, May 2008. ISSN 1530-6860.

JONASSON, L. et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, v. 6, n. 2, p. 131-8, 1986 Mar-Apr 1986. ISSN 0276-5047.

KISLINGER, T. et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem*, v. 274, n. 44, p. 31740-9, Oct 1999. ISSN 0021-9258.

KOJIĆ, N. E.; DERIĆ, M.; DEJANOVIĆ, J. Effect of serum lipid level change on 10-year coronary heart risk distribution estimated by means of seven different coronary risk scores during one-year treatment. *Med Pregl*, v. 67, n. 7-8, p. 208-15, 2014 Jul-Aug 2014. ISSN 0025-8105.

KOK, H. S. et al. Heart disease risk determines menopausal age rather than the reverse. *J Am Coll Cardiol*, v. 47, n. 10, p. 1976-83, May 2006. ISSN 1558-3597.

LIN, Z. F. et al. Statin Use and the Risk for Incident Diabetes Mellitus in Patients with Acute Coronary Syndrome after Percutaneous Coronary Intervention: A Population-Based Retrospective Cohort Study in Taiwan. *Can J Diabetes*, Mar 2016. ISSN 2352-3840.

LINDSEY, J. B. et al. Association between circulating soluble receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study. *Diabetes Care*, v. 32, n. 7, p. 1218-20, Jul 2009. ISSN 1935-5548.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D.; STRUNZ, C. M. C.; AVAKIAN, S. D. et al. Sex Differences in Cardiovascular Disease Mortality in Brazil between 1996 and 2019. *Int J Environ Res Public Health*, 19, n. 19, Oct 07 2022.

MANSUR, A. P. et al. Serum concentrations and gene expression of sirtuin 1 in healthy and slightly overweight subjects after caloric restriction or resveratrol supplementation: A randomized trial. *Int J Cardiol*, v. 227, p. 788-794, Jan 2017. ISSN 1874-1754.

MARANHÃO, R. C.; FREITAS, F. R. HDL metabolism and atheroprotection: predictive value of lipid transfers. *Adv Clin Chem*, v. 65, p. 1-41, 2014. ISSN 0065-2423.

MARANHÃO, R. C. et al. Lipid transfers to HDL are predictors of precocious clinical coronary heart disease. *Clin Chim Acta*, v. 413, n. 3-4, p. 502-5, Feb 2012. ISSN 1873-3492.

MATEO-GALLEGO, R. et al. Energy-restricted, high-protein diets more effectively impact cardiometabolic profile in overweight and obese women than lower-protein diets. *Clin Nutr*, Jan 2016. ISSN 1532-1983.

MATTAGAJASINGH, I. et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 37, p. 14855-60, Sep 2007. ISSN 0027-8424.

MEEHAN, C. A. et al. Mild Caloric Restriction Decreases Insulin Requirements in Patients With Type 2 Diabetes and Severe Insulin Resistance. *Medicine (Baltimore)*, v. 94, n. 30, p. e1160, Jul 2015. ISSN 1536-5964.

MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, v. 404, n. 1, p. 1-13, May 2007. ISSN 1470-8728.

MICHISHITA, E. et al. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*, v. 16, n. 10, p. 4623-35, Oct 2005. ISSN 1059-1524.

NEEPER, M. et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*, v. 267, n. 21, p. 14998-5004, Jul 1992. ISSN 0021-9258.

OELLERICH, M. F.; POTENTE, M. FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging. *Circ Res*, v. 110, n. 9, p. 1238-51, Apr 2012. ISSN 1524-4571.

OPSTAD, T. B.; SUNDFØR, T.; TONSTAD, S.; SELJEFLOT, I. Effect of intermittent and continuous caloric restriction on Sirtuin1 concentration depends on sex and body mass index. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 31, n. 6, p. 1871-1878, 06 07 2021.

PARK, S.; MORI, R.; SHIMOKAWA, I. Do sirtuins promote mammalian longevity? A critical review on its relevance to the longevity effect induced by calorie restriction. *Mol Cells*, v. 35, n. 6, p. 474-80, Jun 2013. ISSN 0219-1032.

PLANAVILA, A. et al. Sirt1 acts in association with PPAR $\alpha$  to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc Res*, v. 90, n. 2, p. 276-84, May 2011. ISSN 1755-3245.

PUK, C. G. et al. Transfer of cholesterol and other lipids from a lipid nanoemulsion to high-density lipoprotein in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*, v. 28, n. 10, p. 1075-80, Oct 2009. ISSN 1557-3117.

ROCHA, M. P. et al. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and lipid transfer to high-density lipoprotein in young obese and normal-weight patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, v. 93, n. 6, p. 1948-56, Apr 2010. ISSN 1556-5653.

ROGGERIO, A.; STRUNZ, C. M. C.; PACANARO, A. P.; LEAL, D. P. et al. Gene Expression of Sirtuin-1 and Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End Products in Healthy and Slightly Overweight Subjects after Caloric Restriction and Resveratrol Administration. *Nutrients*, 10, n. 7, Jul 2018.

ROSENSON, R. S. et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem*, v. 57, n. 3, p. 392-410, Mar 2011. ISSN 1530-8561.

SIMSEK, S.; SCHALKWIJK, C. G.; WOLFFENBUTTEL, B. H. Effects of rosuvastatin and atorvastatin on glycaemic control in Type 2 diabetes---the CORALL study. *Diabet Med*, v. 29, n. 5, p. 628-31, May 2012. ISSN 1464-5491.

SOULIS, T. et al. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia*, v. 40, n. 6, p. 619-28, Jun 1997. ISSN 0012-186X.

SOLA, R.; BAUDET, M. F.; MOTTA, C.; MAILLÉ, M. et al. Effects of dietary fats on the fluidity of human high-density lipoprotein: influence of the overall composition and phospholipid fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1043, n. 1, p. 43-51, Mar 12 1990.

SULTAN, N. et al. Effect of menopause on serum HDL-cholesterol level. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, v. 15, n. 3, p. 24-6, 2003 Jul-Sep 2003. ISSN 1025-9589.

TALL, A. Plasma lipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem*, v. 64, p. 235-57, 1995. ISSN 0066-4154.

THAKKAR, H.; VINCENT, V.; ROY, A.; GAUTAM, A. K. et al. Determinants of high-density lipoprotein (HDL) functions beyond proteome in Asian Indians: exploring the fatty acid profile of HDL phospholipids. *Mol Cell Biochem*, 477, n. 2, p. 559-570, Feb 2022

TENNEN, R. I.; BERBER, E.; CHUA, K. F. Functional dissection of SIRT6: identification of domains that regulate histone deacetylase activity and chromatin localization. *Mech Ageing Dev*, v. 131, n. 3, p. 185-92, Mar 2010. ISSN 1872-6216.

URIBARRI, J. et al. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care*, v. 34, n. 7, p. 1610-6, Jul 2011. ISSN 1935-5548.

VALLE, V. S. et al. Effect of diet and indoor cycling on body composition and serum lipid. *Arq Bras Cardiol*, v. 95, n. 2, p. 173-8, Aug 2010.

VOLEK, J. S. et al. Dietary carbohydrate restriction induces a unique metabolic state positively affecting atherogenic dyslipidemia, fatty acid partitioning, and metabolic syndrome. *Prog Lipid Res*, v. 47, n. 5, p. 307-18, Sep 2008. ISSN 0163-7827.

WANG, Y.; SNEL, M.; JONKER, J. T.; HAMMER, S. et al. Prolonged caloric restriction in obese patients with type 2 diabetes mellitus decreases plasma CETP and increases apolipoprotein AI levels without improving the cholesterol efflux properties of HDL. *Diabetes Care*, 34, n. 12, p. 2576-2580, Dec 2011.

WASSMANN, S.; LAUFS, U.; MÜLLER, K.; KONKOL, C. et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, n. 2, p. 300-305, Feb 01 2002.

WEISS, E. P.; FONTANA, L. Caloric restriction: powerful protection for the aging heart and vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 301, n. 4, p. H1205-19, Oct 2011. ISSN 1522-1539.

XUE, J. et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs. *Biochemistry*, v. 53, n. 20, p. 3327-35, May 2014. ISSN 1520-4995.