MARCOS TADASHI KAKITANI TOYOSHIMA

Proteômica e funcionalidade das subfrações de lipoproteína de densidade alta (HDL) e aterosclerose subclínica no diabetes *mellitus* tipo 1

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

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dra. Marisa Passarelli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2021

MARCOS TADASHI KAKITANI TOYOSHIMA

Proteômica e funcionalidade das subfrações de lipoproteína de densidade alta (HDL) e aterosclerose subclínica no diabetes *mellitus* tipo 1

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

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dra. Marisa Passarelli

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Toyoshima, Marcos Tadashi Kakitani
Proteômica e funcionalidade das subfrações de lipoproteína de densidade alta (HDL) e aterosclerose subclínica no diabetes mellitus tipo 1 / Marcos Tadashi Kakitani Toyoshima. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Complicações do diabetes 2.Diabetes mellitus tipo 1 3.HDL-colesterol 4.Lipoproteínas HDL-2 5.Proteômica 6. Aterosclerose

USP/FM/DBD-332/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

- *Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Lípides (LIM-10) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), com colaboração do Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio (LIM-18) do HCFMUSP, do Ambulatório de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HCFMUSP, da Unidade Clínica de Medicina Interdisciplinar em Cardiologia do Instituto do Coração da FMUSP e do Laboratório de Proteômica Aplicada a Processos Inflamatórios do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.*

- *Projeto aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq # 3.796.622) e da Comissão de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA # 1210/2019).*

- *Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, projeto regular # 2015/21072-5).*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e grande amiga Marisa Passarelli, por me acolher e me fazer entender mais o universo dos lípides e, em especial, da HDL.

À Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella (Malu), que me incentivou a estudar as complicações macrovasculares do diabetes tipo 1.

À Amanda Ribeiro Martins da Silva e à Graziella E. Ronsein do Instituto de Química da USP, por me ajudarem na proteômica da HDL.

Ao Dr. Bruno Caramelli, Adriana Pastana e Mariana Gomes Matheus da Unidade Clínica de Medicina Interdisciplinar em Cardiologia do InCor – FMUSP, por todo o apoio nos testes vasculares.

À enfermeira Marisa Fernandes da Silva Goes, que me ajudou no teste de função endotelial.

À Valéria Hong, que me ensinou pacientemente o teste de velocidade de onda de pulso.

À Adriana Bosco, que me ajudou com os testes para neuropatia autonômica cardiovascular.

Ao bioestatístico Isac de Castro, que me ajudou na análise estatística.

Aos “Malunos”, em especial a Daniela Pereira dos Santos Bezerra (Dani), e a todos os “Frutos de Passarelli”, em especial a Monique de Fátima Mello Santana, Fabiana Dias Ferreira, Kelly Gomes, Raphael de Souza Pinto (Rapha) , Paula Ramos Pinto (Paulinha) e Gabriela Bueno Mello.

A todos os pacientes e controles voluntários a minha gratidão, por ajudarem a realizar este trabalho.

A todos do Serviço de Endocrinologia do HCFMUSP e, em especial, aos amigos da Unidade de Diabetes e de Lípides.

A todos os meus amigos da Unidade de Onco-Endocrinologia do ICESP-HCFMUSP.

Aos secretários da Endocrinologia Rubens Silva, Maria Aparecida da Silva (Cida) e Rosana Zamboni.

À Dra. Marcia Nery a à Dra. Maria Adelaide Albergaria Pereira (Adelaide), que foram e são minha inspiração desde a minha residência médica.

Ao Dr. Alexander Jorge (Alex), que me iniciou nas pesquisas em endocrinologia e me incentivou na vida acadêmica.

À “Turminha Bacana” e, em especial, à Adriana Perez Angelucci (Dri), que foi meu anjo da guarda em um dos momentos mais difíceis da minha vida.

A todos os meus “filhos da preceptoria” da Endocrinologia – HCFMUSP.

À Professora Doutora Berenice Bilharinho de Mendonça, que me apoiou profissional e academicamente.

A toda a equipe da Unidade Jardins (Check-up) do Hospital Israelita Albert Einstein.

A toda a equipe de hospitalistas do HCFMUSP, que se dedicam arduamente para melhorar os cuidados dos pacientes hospitalizados.

À Danielle Cardia e Marcia Morikawa por me deixar são mentalmente, inclusive durante a terrível e triste pandemia do SARS-Cov-2.

Aos meus amigos da “Japanela 85”.

A todos da minha família Kakitani, Toyoshima, Murata e Maeda.

À minha tia Iná Kakitani, por todo o apoio e experiência acadêmica.

À minha tia Tereza (Tereza Keico Toyoshima), que sempre esteve próxima e me apoiou.

À minha sogra Iracema Keiko Maeda.

À minha amada Ana Paula (Ana Paula Tiyomi Maeda), com quem pretendo viver e vencer novos desafios.

À minha irmã Ana Paula Kakitani Toyoshima, que me apoia e sempre me apoiou e em todos os momentos.

E por fim, mas não menos importante, à minha mãe Katsura Kakitani Toyoshima, que conseguiu a façanha de ser mãe e pai, que trabalhou manhã-tarde-noite para que fosse possível a minha formação acadêmica, nunca negando um material escolar ou livro, e que me inspirou ser uma pessoa cada vez melhor.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, com que se sintam humildes.”

Leonardo da Vinci

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS xii
LISTA DE SÍMBOLOS xviii
LISTA DE FIGURAS xx
LISTA DE TABELAS xxi
RESUMO xxiii
ABSTRACT xxv

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Epidemiologia da doença cardiovascular no diabetes *mellitus* tipo 1 1
1.2. Metabolismo das lipoproteínas no DM1 3
1.3. Avaliação de risco cardiovascular e da aterosclerose subclínica 5
1.4. Proteômica e função da HDL 8
1.5. Justificativa do estudo 12
2. OBJETIVO 14
3. MÉTODOS 15
3.1. Delineamento do estudo 15
3.2. Aspectos éticos 15
3.3. Casuística 15
3.3.1. Seleção 15
3.3.2. Critérios de inclusão 16
3.3.3. Critérios de não inclusão 16
3.4. Estimativa de risco cardiovascular 16
3.5. Neuropatia autonômica cardiovascular 16
3.6. Coleta de sangue e determinações bioquímicas 17
3.7. Vasodilatação mediada por fluxo (VMF) 17
3.8. Velocidade de onda de pulso carotídeo-femoral (VOP) 18
3.9. Isolamento das subfrações da HDL 18
3.10. Proteômica das subfrações da HDL 19
3.10.1. Digestão proteolítica e purificação das amostras 19

3.10.2. Análise semi-quantitativa por proteômica *shotgun* ou análise dependente de dados (DDA) 19
3.10.3. Identificação das proteínas ……..…… 20
3.10.4. Análise quantitativa do proteoma da HDL por monitoramento de reações em paralelo (PRM) 21
3.10.5. Seleção dos peptídeos para a quantificação relativa das proteínas presentes na HDL em amostras biológicas 21
3.10.6. Controle de qualidade usado para PRM 22
3.10.7. Processamento de dados 22
3.11. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos mediado pelas subfrações de HDL 22
3.12. Análise estatística …….... 23
4. RESULTADOS ……. 25
4.1. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais 25
4.2. Proteômica da HDL 30
4.2.1. Análise descritiva geral da proteômica das subfrações de HDL …....…….....…… 30
4.2.2. Avaliação da proteômica da HDL_2 ……..... 33
4.2.3. Avaliação da proteômica da HDL_3 ……..... 34
4.3. HDL-colesterol e proteômica de HDL_2 e HDL_3 36
4.4. Interferência de outras variáveis na proteômica de HDL em indivíduos com DM1 38
4.4.1. Hipertensão arterial 38
4.4.2. Controle glicêmico 38
4.4.3. Uso de estatina 40
4.4.4. Neuropatia autonômica cardiovascular …… 40
4.5. Proteômica de HDL e risco cardiovascular estimado em indivíduos com DM1 41
4.6. Avaliação da rigidez arterial - velocidade de onda de pulso carotídeo-femoral (VOP) e da função endotelial – dilatação mediada por fluxo (VMF) 42
4.6.1. Testes de função vascular em indivíduos com DM1 e controles 42

4.6.2. Testes de função vascular e fatores que interferem no risco cardiovascular em indivíduos com DM1 43
4.6.3. Testes de função vascular e risco cardiovascular estimado em indivíduos com DM1 45
4.7. Testes de Função vascular e proteômica da HDL_2 e HDL_3 no grupo controle e DM1 45
4.8. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos mediado pelas subfrações da HDL 49
5. DISCUSSÃO …… 51
6. CONCLUSÃO ……..… 74
7. ANEXOS ……...… 75
8. REFERÊNCIAS …… 87

LISTA DE SIGLAS

A1AT	Alfa-1-antitripsina ou serpina-1
A1BG	Glicoproteína alfa-1B
A1M	Alfa-1-microglobulina
ABCA-1	Transportador cassete A1 de ligação ao ATP
ABCG-1	Transportador cassete G1 de ligação ao ATP
AGE	Produtos de glicação avançada
AGT	Angiotensinogênio
AHSG	Glicoproteína alfa-2-Heremans-Schmid ou fetuína A
ALB	Albumina
AMBP	Precursor da alfa1-microglobulina e da bicunina
AMP	Alfa-1 microglobulina
APMAP	Proteína associada à membrana plasmática de adipócito
Apo	Apolipoproteína
APOA	Gene que codifica a apolipoproteína (a)
Apo(a)	Apolipoproteína (a)
APOA1	Gene que codifica a apolipoproteína A-I
ApoA-I	Apolipoproteína A-I
APOA2	Gene que codifica a apolipoproteína A-II
ApoA-II	Apolipoproteína A-II
APOA4	Gene que codifica a apolipoproteína A-IV
ApoA-IV	Apolipoproteína A-IV
APOA5	Gene que codifica a apolipoproteína A-V
ApoA-V	Apolipoproteína A-V
ApoB	Apolipoproteína B
APOB100	Gene que codifica a apolipoproteína B-100
ApoB-100	Apolipoproteína B-100
APOC1	Gene que codifica a apolipoproteína C-I
ApoC-I	Apolipoproteína C-I
APOC2	Gene que codifica a apolipoproteína C-II
ApoC-II	Apolipoproteína C-II

APOC3	Gene que codifica a apolipoproteína C-III
ApoC-III	Apolipoproteína C-III
APOC4	Gene que codifica a apolipoproteína C-IV
ApoC-IV	Apolipoproteína C-IV
ApoD	Apolipoproteína D
ApoE	Apolipoproteína E
ApoF	Apolipoproteína F
ApoH	Apolipoproteína H ou Beta-2-glicoproteína 1
ApoJ	Apolipoproteína J
APOL1	Gene que codifica a apolipoproteína L-I
ApoL-I	Apolipoproteína L-I
ApoM	Apolipoproteína M
ATR	Receptor da toxina do antrax ou receptor ATR
BRA	Bloqueador do receptor de angiotensina II
^{14}C	Carbono-14
C3	Complemento C3
C4	Complemento C4
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CEUA	Comissão de Ética no Uso dos Animais
CFAH	Fator H do complemento
CLU	Gene que codifica a Clusterina, apolipoproteína J ou glicoproteína-2 sulfatada
CO_2	Dióxido de carbono ou gás carbônico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CST3	Cistatina C
$CuSO_4$	Sulfato de cobre
Cys	Cisteína
DCCT	*Diabetes Control and Complications Trial*
DCV	Doença cardiovascular
DM	Diabetes *mellitus*

DM1	Diabetes *mellitus* tipo 1
DM2	Diabetes *mellitus* tipo 2
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
EC	Efluxo de ^{14}C-colesterol
EDIC	*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
eTFG	Taxa de filtração glomerular estimada
EUA	Estados Unidos da América
FAFA	Albumina isenta de ácidos graxos
FCS	Soro fetal bovino
FGA	Fibrinogênio
FHR1	Proteína 1 relacionada ao fator H do complemento
FHR2	Proteína 2 relacionada ao fator H do complemento
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GC	Proteína ligadora da vitamina D ou componente grupo específico
GL	Grau de liberdade
GLUT4	Transportador 4 de glicose
GPLD1	Fosfolipase D fosfatidilinositol-glicano-específica ou ou fosfolipase D1 glicosilfosfatidilinositol-específica
H_2O	Água
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hb	Hemoglobina
HbA1c/ A1c	Hemoglobina glicada
HBB	Subunidade beta da hemoglobina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HDL	Lipoproteína de densidade alta
HDL-c	Conteúdo de colesterol na lipoproteína de densidade alta
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
HP	Haptoglobina
HPHPR	Haptoglobulina ou proteína relacionada à haptoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPR ou HRP	Proteína relacionada à haptoglobina
HPX	Hemopexina
HR	Hiperemia reativa
IGFALS	Subunidade ácido lábil
IGHA2	Cadeia pesada da imunoglobulina alfa-2
IMC	Índice de massa corpórea
InCor	Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ITH	Inter-alfa-tripsina
ITIH	Cadeia pesada H do inibidor inter-alfa-tripsina
ITIH3	Cadeia pesada H3 do inibidor inter-alfa-tripsina
ITIH4	Cadeia pesada H4 do inibidor inter-alfa-tripsina
KNG1	Cininogênio-1
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LDL-c	Conteúdo de colesterol na lipoproteína de densidade baixa
LDL-ox	LDL oxidada
LFQ	Quantificação *label free*
LPH	Lipoproteína lipase hepática
LPL	Lipoproteína lipase
Met	Metionina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MODY	*Maturity-Onset Diabetes of the Young*

MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectro de fragmentação
NAC	Neuropatia autonômica cardiovascular
NH_4HCO_3	Bicarbonato de amônio
ND	Não disponível
NGSP	*National Glyco Hemoglobin Standardization Program*
NO	Óxido nítrico
NR	Não realizado
NS	Não significativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
Orm1	Alfa-1 glicoproteína ácida 1 ou orosomucoide
Orm2	Alfa-1 glicoproteína ácida 2
PAF-AH	Acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas ou fosfolipase A2 associada à lipoproteína
PBS	Salina tampão fosfato
PCSK9	Pró-proteína convertase subtilisina kexina tipo 9
PCYOX	Prenilcisteína oxidase 1
PEDF	Fator derivado de epitélio pigmentado
PGRP2	Peptídeo-2 de reconhecimento de peptideoglicano
PKC	Proteína cinase C
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípides
PON	Paraoxonase
%EC	Porcentagem de efluxo de ^{14}C-colesterol
p/p	Peso/ peso
PRM	Monitoramento de reações em paralelo
PZP	Proteína zona de gravidez
QM	Quilomícron
RBP4	Proteína ligante de retinol tipo 4
ROC	*Receiver Operating Characteristic*
S1P	Esfingosina 1-fosfato
SAA	Amiloide A sérico
SERF1	Inibidor da peptidase da serpina
SERF2	Alfa-2-antiplasmina

SERPINA1	Serpina-1 ou alfa-1-antitripsina
SHBG	Globulina ligadora de hormônio sexual
SR-BI	Receptor *scavenge*r classe B tipo I
SREBP	Proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroide
SWATH/MS	*Sequential window acquisition of all theoretical mass spectra*
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TF	Serotransferrina
TFG	Taxa de filtração glomerular
TG	Triglicérides
THRB*	Subunidade beta do receptor do hormônio tireoidiano
TLF1	Fator lítico de tripanossoma 1
TRC	Transporte reverso do colesterol
TTR	Transtirretina
VDE	Vasodilatação dependente do endotélio
VIE	Vasodilatação independente do endotélio
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VMF	Vasodilatação mediada por fluxo
VOP	Velocidade de onda de pulso
VTN	Vitronectina
v/v	Volume/ volume
ZAG	Zinco-alfa-2-glicoproteína

* No estudo de Oliveira e cols (2018), a sigla THRB foi caracterizada como sendo a protrombina, mas esta abreviatura normalmente é utilizada para o gene da subunidade beta do receptor do hormônio tireoidiano.

LISTA DE SÍMBOLOS

ºC	Grau Celsius
dL	Decilitro
g	Grama
g	Giro
h	Hora
kg	Quilograma
L	Litro
log	Logaritmo
log_{10}	Logaritmo base 10
µCi	Microcurie
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µmol	Micromol
M	Mol
m^2	Metros quadrados
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol
mm	Milímetro
mm^2	Milímetro quadrado
mm^3	Milímetro cúbico
ms	Milissegundo
m/z	Relação massa/carga
ng	Nanograma
nL	Nanolitro
pg	Picograma
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo

$<$	Menor
$\leq$	Menor ou igual
$>$	Maior
$\geq$	Maior ou igual
$\pm$	Mais ou menos
%	Por cento
Δ	Delta ou variação
~	Aproximadamente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão global de proteínas ligadas a HDL, divididas por funções biológicas **11**

Figura 2: *Volcano Plot* indicando a abundância, em log_2, de proteínas detectadas na HDL_2 entre indivíduos com diabetes tipo 1 e controles e significância, em $-log_{10}$ **33**

Figura 3: Razão de chances com intervalo de confiança de 95% para a associação de proteínas da HDL_2 com indivíduos com diabetes tipo 1 e controles **34**

Figura 4: *Volcano Plot* indicando a abundância, em log_2, de proteínas detectadas na HDL_3 entre indivíduos com diabetes tipo 1 e controles e significância, em $-log_{10}$ **35**

Figura 5: Razão de chances com intervalo de confiança de 95% para a associação de proteínas da HDL_3 com indivíduos com diabetes tipo 1 ou controles..... **36**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características antropométricas, clínicas e laboratoriais dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 1 e controles **26**

Tabela 2: Características dos indivíduos com diabetes tipo 1 quanto à presença ou não de hipertensão arterial **27**

Tabela 3: Características dos indivíduos com diabetes tipo 1 quanto ao controle glicêmico **28**

Tabela 4: Características dos indivíduos com diabetes tipo 1 quanto ao uso de estatina **29**

Tabela 5: Características dos indivíduos com diabetes tipo 1 quanto à presença de neuropatia autonômica cardiovascular..... **30**

Tabela 6: Proteínas selecionadas e quantificadas na proteômica da HDL_2 e HDL_3, divididas pela principal função **31**

Tabela 7: Coeficientes de correlação de Pearson entre HDL-colesterol e proteínas encontradas nas HDL_2 e HDL_3 de indivíduos com diabetes tipo 1 e controles **37**

Tabela 8: Comparação dos proteomas da HDL_2 e HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1 quanto à presença de hipertensão arterial **38**

Tabela 9: Comparação dos proteomas da HDL_2 e HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1 quanto ao controle glicêmico **39**

Tabela 10: Comparação dos proteomas da HDL_2 e HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1 quanto ao uso da estatina **40**

Tabela 11: Comparação dos proteomas da HDL_2 e HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1 quanto à neuropatia autonômica cardiovascular **41**

Tabela 12: Correlação de risco cardiovascular em dez anos e dados da proteômica da HDL_2 em indivíduos com diabetes tipo 1 ..... **41**

Tabela 13: Correlação de risco cardiovascular em dez anos e dados da proteômica da HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1..... **42**

Tabela 14: Função endotelial e rigidez arterial em indivíduos com diabetes tipo 1 e controles **43**

Tabela 15: Efeito do controle glicêmico nos testes de função vascular dos indivíduos com diabetes tipo 1 ..... **43**

Tabela 16: Efeito da hipertensão arterial sobre os testes de função vascular dos indivíduos com diabetes tipo 1 ..... **44**

Tabela 17: Uso de estatina e testes de função vascular dos indivíduos com diabetes tipo 1..... **44**

Tabela 18: Neuropatia autonômica cardiovascular e testes de função vascular dos indivíduos com diabetes tipo 1 ..... **44**

Tabela 19: Correlação de risco cardiovascular em dez anos e testes de função vascular em indivíduos com diabetes tipo 1..... **45**

Tabela 20: Correlação entre função vascular e proteômica da HDL_2 em indivíduos com diabetes tipo 1..... **46**

Tabela 21: Correlação entre função vascular e proteômica da HDL_2 em controles **47**

Tabela 22: Correlação entre função vascular e proteômica da HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1..... **48**

Tabela 23: Correlação entre função vascular e proteômica da HDL_3 em controles **49**

Tabela 24: Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos em indivíduos com diabetes tipo 1 e controles **49**

Tabela 25: Comparação de dados de abundância das proteínas na proteômica da HDL_2 e HDL_3 do presente estudo com outros estudos caso-controle em diabetes tipo 1..... **53**

Anexo 1: Proteínas e peptídeos determinados pelo método PRM **75**

Anexo 2: Dados da proteômica da HDL_2 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1..... **78**

Anexo 3: Acurácia da proteômica da HDL_2 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1 por meio da curva ROC **79**

Anexo 4: Validação interna da nota de corte da curva ROC da proteômica da HDL_2 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1 ..... **80**

Anexo 5: Análise discriminante da proteômica da HDL_2 de indivíduos com diabetes tipo 1 e controles **81**

Anexo 6: Proteômica da HDL_3 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1 ..... **82**

Anexo 7: Acurácia da proteômica da HDL_3 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1 por meio da curva ROC **82**

Anexo 8: Validação interna da nota de corte da curva ROC da proteômica da HDL_3 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1 ..... **83**

Anexo 9: Análise discriminante da proteômica da HDL_3 para capacidade de discriminação entre indivíduos controles e com diabetes tipo 1 ..... **84**

Anexo 10: Correlação entre variáveis clínicas e laboratoriais e o efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos mediado por HDL em indivíduos com diabetes tipo 1..... **85**

Anexo 11: Correlação entre variáveis clínicas e laboratoriais e o efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos mediado por HDL em controles **86**

RESUMO

Toyoshima MTK. *Proteômica e funcionalidade das subfrações de lipoproteína de densidade alta (HDL) e aterosclerose subclínica no diabetes mellitus tipo 1* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

INTRODUÇÃO: A aterosclerose é a principal causa de morbimortalidade em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), para a qual concorrem alterações no metabolismo de lípides e lipoproteínas. A redução do colesterol nas lipoproteínas de densidade alta (HDL-c) associa-se ao maior risco cardiovascular. No entanto, indivíduos com DM1 não necessariamente apresentam redução do HDL-c e, neste aspecto, considera-se que alteração em sua funcionalidade possa conferir maior risco cardiovascular. OBJETIVO: Avaliar a proteômica das subfrações da HDL (HDL_2 e HDL_3) e sua associação com a funcionalidade desta lipoproteína, variáveis clínico-metabólicas e função vascular, indicativa de aterosclerose subclínica, em portadores de DM1 e controles sem diabetes. MÉTODOS: Foram selecionados 50 indivíduos com DM1 e 30 controles, pareados por idade e sexo. As HDL_2 e HDL_3 foram isoladas por ultracentrifugação e sua proteômica foi determinada por espectrometria de massas e monitoramento de reações em paralelo (PRM). A capacidade de remoção de colesterol foi determinada pela incubação com macrófagos sobrecarregados com LDL acetilada e ^{14}C-colesterol. A função vascular foi avaliada pela velocidade de onda de pulso (VOP) e vasodilatação mediada por fluxo (VMF), e a neuropatia autonômica cardiovascular (NAC), pelo teste de Ewing e análise espectral. RESULTADOS: Um total de 45 proteínas foi selecionado na proteômica da HDL_2 e HDL_3; com diferença no conteúdo de 13 proteínas na HDL_2 e 33 na HDL_3, entre o grupo DM1 e controle. Destas, 10 (seis relacionadas ao metabolismo lipídico, uma proteína de fase aguda inflamatória, uma do sistema do complemento, uma antioxidante e uma sem função muito conhecida) foram mais abundantes na HDL_2 e 23 (14 relacionadas ao metabolismo lipídico, três proteínas de fase aguda inflamatória, três antioxidantes, uma transportadora e três sem função muito conhecida), na HDL_3 de DM1. Uma proteína do metabolismo lipídico, uma transportadora e outra sem função bem conhecida, foram mais abundantes na

HDL_2; e uma proteína associada ao metabolismo lipídico, cinco transportadoras, um inibidor de protease e três sem função bem conhecida, foram mais abundantes na HDL_3 de controles. Para HDL_2, avaliação de razão de chances mostrou que o grupo DM1 teve maior força de associação com sete proteínas (apoB, apoC-II, apoE, APMAP, C3, GPLD1 e PLTP), sendo a maioria delas relacionada ao metabolismo lipídico. Já o grupo controle esteve mais associado com quatro proteínas (A1BG, apoC-III, subunidade beta da hemoglobina e transtirretina), sendo duas proteínas transportadoras. Para a HDL_3, análise de razão de chances mostrou que o grupo DM1 teve maior força de associação com 17 proteínas, sendo a maioria relacionada ao metabolismo lipídico. Já o grupo controle, a associação foi com sete proteínas, sendo três proteínas transportadoras. Análise discriminante mostrou que seis proteínas (APMAP, apoC-II, apoC-III, complemento C3, PLTP e subunidade beta da hemoglobina) na HDL_2 tiveram capacidade discriminatória entre os grupos DM1 e controle e cinco proteínas (apoA-I, APMAP, LCAT, PCSK9 e subunidade beta da hemoglobina) na HDL_3. Os indivíduos com DM1 apresentaram maior VOP e menor VMF, além de maior risco cardiovascular estimado em comparação ao grupo controle. Não houve diferença de efluxo de colesterol do macrófago entre os grupos. Algumas proteínas nas HDL_2 e HDL_3, especialmente relacionadas ao metabolismo lipídico, correlacionaram-se com a função vascular, principalmente com a VOP, a NAC, o efluxo de ^{14}C colesterol de macrófagos, HDL-c, hipertensão arterial sistêmica, controle glicêmico, risco cardiovascular estimado e uso de estatinas. CONCLUSÃO: A proteômica da HDL pode ser preditiva de alteração na funcionalidade desta lipoproteína e de aterosclerose subclínica no DM1.

Descritores em Ciências da Saúde (DeCS/MeSH): Complicações do diabetes, Diabetes mellitus Tipo 1, HDL-colesterol, HDL-2, HDL-3, Proteômica, Aterosclerose

ABSTRACT

Toyoshima MTK. *Proteomics and functionality of high-density lipoprotein (HDL) subfractions and subclinical atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus* [thesis]. “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

INTRODUCTION: Atherosclerosis is the main cause of morbidity and mortality in individuals with type 1 diabetes mellitus (T1D), determined in part by alterations in lipid and lipoproteins metabolism. Lower cholesterol in high-density lipoproteins (HDL-c) is associated with increased cardiovascular risk. However, individuals with T1D do not necessarily present a reduction in HDL-c and, in this respect, it is considered that changes in their functionality may confer greater cardiovascular risk. OBJECTIVE: To evaluate the proteome of HDL subfractions (HDL_2 and HDL_3) and their association with the functionality of this lipoprotein, clinical-metabolic variables and vascular function, indicative of subclinical cardiovascular disease, in individuals with T1D and controls without diabetes. METHODS: A total of 50 individuals with T1D and 30 controls, matched for age and sex, were selected. HDL_2 and HDL_3 were isolated by ultracentrifugation and their proteome determined by mass spectrometry and parallel reaction monitoring (PRM). Cholesterol removal capacity was determined by incubation with macrophages overloaded with acetylated LDL and ^{14}C-cholesterol. Vascular function was assessed by pulse wave velocity (PWV) and flow-mediated vasodilation (FMD), and cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) by the Ewing's test and spectral analysis. RESULTS: A total of 45 proteins were selected in the proteomics of HDL_2 and HDL_3; with difference in the content of 13 proteins in HDL_2 and 33 in HDL_3 between the T1D and control groups. Of these, 10 (six related to lipid metabolism, one inflammatory acute phase protein, one from the complement system, one antioxidant and one without a well-known function) were more abundant in HDL_2 and 23 (14 related to lipid metabolism, three phase proteins inflammatory, three antioxidants, one carrier and three without well-known functions) in HDL_3 in the T1D group. One lipid metabolism protein, one transporter and another without a well-known function, were more abundant in HDL_2; and one protein

associated with lipid metabolism, five transporters, one protease inhibitor and three with no well-known function, more abundant in HDL_3 in the control group. For HDL_2, odds ratio calculation showed that the T1D group had greater strength of association of seven proteins (apoB, apoC-II, apoE, APMAP, C3, GPLD1 and PLTP), most of which were related to lipid metabolism. In the control group, the association was with four proteins (A1BG, apoC-III, hemoglobin subunit beta and transthyretin), with two transport proteins. For HDL_3, odds ratio calculation showed that the T1D group had a stronger association of 17 proteins, most of which were related to lipid metabolism. In the control group, the association was with seven proteins, being three transport proteins. Discriminant analysis between the T1D and control groups showed six proteins (APMAP, apoC-II, apoC-III, complement C3, PLTP and hemoglobin subunit beta), with discriminatory capacity between groups in HDL_2 and five proteins (apoA-I, APMAP, LCAT, PCSK9 and hemoglobin subunit beta) in HDL_3. Individuals with T1D had higher PWV and lower FMD, in addition to higher estimated cardiovascular risk compared to the control group. There was no difference in ^{14}C-cholesterol efflux in macrophages between groups. Some proteins in HDL_2 and HDL_3, especially related to lipid metabolism, correlated with vascular function, mainly with PWV and CAN, with the efflux of ^{14}C-cholesterol from macrophages, HDL-c, systemic arterial hypertension, glycemic control, estimated cardiovascular risk and use of statins. CONCLUSION: HDL proteomics can be predictive of changes in the functionality of this lipoprotein and of subclinical atherosclerosis in T1D.

Descriptors: Diabetes Complication Type 1 Diabetes Mellitus High Density Lipoprotein Cholesterol High Density Lipoprotein HDL2 High Density Lipoprotein HDL3 Proteomics Atherosclerosis

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da doença cardiovascular no diabetes *mellitus* tipo 1

O diabetes *mellitus* (DM) é uma desordem metabólica complexa que favorece, em longo prazo, o desenvolvimento de complicações micro (retinopatia, doença renal e neuropatia) e macrovasculares (coronariopatia, doença arterial periférica e doença cerebrovascular), as quais reduzem significativamente a qualidade e a expectativa de vida e aumentam os custos em saúde pública. O DM é considerado um fator de risco primário para doença cardiovascular (DCV) e incorre em manifestação precoce de morbimortalidade por doença macrovascular aterosclerótica, em especial eventos coronarianos (1–3).

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) corresponde a 5 a 10% dos casos de DM, sendo caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas, por mecanismos imunológicos de natureza humoral e celular, levando à deficiência absoluta de insulina (1,4). Complicações agudas, como a cetoacidose, e a doença renal diabética foram as principais causas de mortalidade de indivíduos com DM1 antes do advento da insulina e do uso de controle glicêmico intensivo, respectivamente (5–7). Atualmente, a DCV é a principal causa de morbimortalidade, em longo prazo, nesta população (8,9). O aumento da expectativa de vida dos indivíduos com DM1 possibilitou maior exposição a fatores de risco cardiovascular, associados ao envelhecimento (5–7).

A maioria dos estudos epidemiológicos em indivíduos com DM foi realizada em diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Apesar da escassez de estudos em portadores de DM1, a DCV tem prevalência maior e ocorre mais precocemente em indivíduos com DM1 em comparação à população geral (1,5,10–12). Estudos de coorte indicam que a prevalência de DCV em indivíduos com DM1 varia de acordo com a duração do DM, faixa etária e, possivelmente, com a etnia (1). Um estudo de coorte multinacional da Organização Mundial da Saúde (OMS) evidenciou que 44% das mortes em indivíduos com DM1 foram causadas por DCV (9). Em comparação a não portadores de DM, a mortalidade por DCV em indivíduos com DM1 chega a ser

maior em até oito vezes (9,13–16). No estudo europeu *EURODIAB IDDM Complications Study*, com mais de 3.200 indivíduos com DM1, a prevalência de coronariopatia foi ao redor de 10%. Ela aumentou de acordo a duração do DM e a idade, sendo de 25% na faixa etária entre 45 e 59 anos (17).

O *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) foi um estudo prospectivo randomizado delineado para comparar o efeito do controle glicêmico intensivo com a terapia conservadora sobre o desenvolvimento de complicações crônicas do DM1. Nele, observou-se que a incidência de DCV foi baixa na população geral do estudo, mas a média de idade dos participantes ao final do estudo era de apenas 33 anos, variando de 18 a 45 anos (8). No entanto, evidenciou uma tendência de redução da taxa de eventos coronarianos mediante controle glicêmico intensivo (6,18). Após o término do DCCT em 1993, 93% dos indivíduos participaram do estudo observacional *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC), no qual a terapia intensiva foi também orientada aos indivíduos do grupo de tratamento convencional. O EDIC evidenciou que no grupo de controle glicêmico intensivo do DCCT houve redução de 42% nos eventos cardiovasculares e 57% da ocorrência de infarto agudo do miocárdio não fatal, AVC ou morte por DCV após uma média de 18 anos de seguimento (6,19).

Uma das complicações microvasculares do DM é a neuropatia autonômica cardiovascular (NAC), que resulta em alteração da função parassimpática e/ou simpática cardiovascular. É um fator preditor importante de mortalidade cardiovascular devido ao aumento dos riscos de arritmias, infarto silencioso do miocárdio e morte súbita (12,20,21). A prevalência de NAC é baixa em indivíduos com DM1 recém-diagnosticados, mas a prevalência aumenta consideravelmente com a duração do DM (21). No estudo DCCT, a prevalência de NAC era em torno de 4% e em sua continuação pelo estudo EDIC, era em torno de 30% após 20 anos de duração do DM (22,23). Moţăţăianu e cols. avaliaram 34 indivíduos com DM1 com idade média de 36 anos e duração média do DM de 15 anos, demonstrando a presença de NAC em 62% dos indivíduos (24). Em 341 indivíduos com DM1 avaliados no HCFMUSP, com mediana de idade de 34 anos e de duração do DM de 21 anos, a prevalência da NAC foi de 29% (25).

Quanto às complicações macrovasculares, a aterosclerose está diretamente envolvida, sendo caracterizada pelo acúmulo gradual de colesterol em macrófagos e células musculares lisas infiltradas na íntima arterial, ao qual se somam eventos inflamatórios e trombóticos (26). Sua progressão está envolvida, diretamente, na patogênese das DCV. Os mecanismos responsáveis pelo aumento da aterosclerose e DCV em DM1 ainda não são completamente elucidados (12). Além dos fatores de risco cardiovascular clássicos, como hiperglicemia crônica, dislipidemias, hipertensão arterial (HAS), tabagismo, inflamação e predisposição genética, vários outros fatores contribuem para a aceleração da aterosclerose, tais como a nefropatia, NAC e variabilidade glicêmica (8,12,27,28).

A lesão endotelial é o denominador comum a estes fatores de risco e favorece a infiltração de lipoproteínas de densidade baixa (LDL) na íntima arterial. Além disso, independentemente da lesão ou disfunção endotelial, as LDL podem atravessar as células endoteliais por transcitose, atingindo a íntima. Neste compartimento, as LDL sofrem modificação por oxidação, o que promove a quimiotaxia de monócitos e sua diferenciação em macrófagos, os quais captam as lipoproteínas modificadas por intermédio dos receptores *scavenger*. No DM, as LDL podem ser modificadas na circulação sanguínea, por exemplo, com redução de seu tamanho (LDL pequenas e densas) ou com modificação química por glicação, carbamoilação, entre outras. Neste caso, estas lipoproteínas já modificadas atingem a camada arterial, o que facilita sua captação por macrófagos.

1.2. Metabolismo das lipoproteínas no DM1

As elevações de colesterol na LDL (LDL-c) e de triglicérides (TG) e a redução de colesterol nas lipoproteínas de densidade alta (HDL-c) estão associadas com maior risco cardiovascular na população geral (26,29). Estas alterações são tipicamente observadas no DM2, mas menos comumente no DM1. No entanto, o risco cardiovascular no DM1 é mais alto do que na população geral e, quando ajustado para idade, pode até exceder o risco no DM2 (8,30).

Apesar de o DM1 ser caracterizado pela deficiência absoluta de insulina, a resistência insulínica mais comumente observada em DM2 pode também estar presente em DM1, especialmente com o aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade nesta população. O impacto da resistência insulínica em indivíduos com DM1 ainda não está totalmente esclarecido (1).

A insulina é o principal modulador fisiológico do metabolismo de lípides, por modular a expressão de vários genes e a atividade de enzimas, como, por exemplo, a lipoproteína lipase (LPL) (31,32). O grau de deficiência de insulina e o consequente controle glicêmico determinam o estado do metabolismo de lipoproteínas no DM1.

Em indivíduos com DM1 com controle glicêmico inadequado e em cetoacidose, anormalidades lipídicas relacionadas à deficiência grave de insulina são observadas. A atividade da LPL encontra-se diminuída, levando ao aumento de lipoproteínas ricas em TG (quilomícrons - QM e lipoproteínas de densidade muito baixa - VLDL) e, consequentemente, hipertrigliceridemia. As concentrações plasmáticas elevadas de lipoproteínas ricas em TG favorecem, por meio da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), a transferência de TG destas lipoproteínas para as HDL, com a formação de partículas de HDL ricas em TG. Estas são mais suscetíveis à ação da lipoproteína lipase hepática (LLH), ocasionando redução no tamanho das HDL, as quais são associadas ao maior risco cardiovascular em estudos de prevenção primária e secundária (32).

Em indivíduos com DM1 bem controlado, a trigliceridemia é normal ou levemente reduzida. Isto pode ser explicado por uma diminuição na produção de VLDL devido à hiperinsulinemia exógena e ao favorecimento da síntese e atividade da LPL (30,32). A atividade da LPL é favorecida pela síntese de apo C-II e C-III que são, respectivamente, aumentadas e diminuídas pela insulina. A concentração de LDL-c é normal ou levemente reduzida e a de HDL-c, normal ou um pouco aumentada. (33–36) Este aumento da HDL-c decorrente da insulinoterapia, pode ser explicado pela maior ativação da proteína de transferência de fosfolípides (PLTP) e da LPL (30), mas também pela maior geração de partículas nascentes de HDL, pré-beta HDL, inerente à metabolização das VLDL e QM pela LPL (37). Estudos também demonstraram

diferenças entre subfrações da HDL. Alguns evidenciaram aumento na subfração da HDL_2 e outros, na HDL_3. Por fim, as alterações quantitativas nos lípides plasmáticos e em lipoproteínas podem ser mitigadas pela terapia insulínica, embora possam se manifestar alterações qualitativas nestas partículas advindas de sua modificação química ou do conjunto de macromoléculas transportadas por elas (32).

1.3. Avaliação de risco cardiovascular e da aterosclerose subclínica

Estudos de coorte permitiram que ferramentas fossem desenvolvidas para predizer o risco cardiovascular. As ferramentas mais conhecidas são o escore de risco global de Framingham e a calculadora de risco do *American College of Cardiology/ American Heart Association* (1,26,38,39). No entanto, elas não foram desenvolvidas especificamente para uso em indivíduos com DM1 (20).

A ferramenta *Steno T1 Risk Engine* foi desenvolvida na Dinamarca especificamente para indivíduos com DM1. O modelo preditivo inclui 10 fatores de risco: idade, sexo, tempo de DM, pressão arterial sistólica, LDL-c, hemoglobina glicada (HbA1c), albuminúria, taxa de filtração glomerular estimada (eTFG), tabagismo e atividade física (40). Outra ferramenta que considera o DM1, como variável independente, é o protocolo inglês QRISK3. Ela não foi desenvolvida especificamente para DM1, mas é possível selecionar DM1 como uma das variáveis. Esta calculadora leva em conta a idade, sexo, etnia, tabagismo, histórico familiar de DCV, colesterol total, HDL-c, pressão arterial sistólica, índice de massa corpórea (IMC), tratamento para HAS, insuficiência renal, fibrilação atrial, enxaqueca, algumas doenças autoimunes, uso de corticosteroides e doenças psiquiátricas (15,20,41). Ambas as ferramentas ajudam a predizer o risco cardiovascular em dez anos. No entanto, elas ainda carecem de validação externa para serem amplamente utilizadas (20).

Nos indivíduos com DM1, as alterações dos exames que evidenciam a aterosclerose subclínica ocorrem mais precocemente do que na população geral (42). Algumas ferramentas podem ajudar a detectar ou a predizer aterosclerose subclínica por meio de avaliação funcional ou estrutural das artérias, permitindo melhores estratégias de controle e intervenção (43).

A rigidez arterial é um marcador de doença vascular precoce e é considerado um preditor de risco para mortalidade geral e cardiovascular. A idade é o principal determinante de rigidez em grandes artérias. A HAS, o DM, a dislipidemia, o tabagismo, a obesidade, a resistência insulínica e a inflamação sistêmica também contribuem com a aceleração do processo de rigidez arterial (44–46).

O espessamento da parede da aorta está relacionado ao espessamento da camada íntima vascular, cuja matriz extracelular é composta de colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas. O colágeno e a elastina são as principais proteínas relacionadas à estrutura e à elasticidade da parede do vaso, e são reguladas por metaloproteinases. O envelhecimento vascular está fortemente associado à depleção e fragmentação de elastina e à deposição de colágeno (47). O entrecruzamento de moléculas de colágeno, promovido por sua glicação avançada, altera a matriz dos vasos e confere resistência à degradação proteolítica, o que cursa com sua menor taxa de degradação e maior acúmulo na parede arterial. A glicação avançada da elastina também resulta em menor funcionalidade desta proteína na parede do vaso (47–49). Acredita-se que vários hormônios, tais como a angiotensina II e a aldosterona, possam modular a rigidez arterial (47).

A determinação da rigidez arterial pode ser regional, local, sistêmica ou por reflexões de onda, e determinada por meio de diferentes métodos. As propriedades elásticas dos vasos variam ao longo da árvore arterial, sendo que as artérias proximais são mais elásticas e as mais distais, mais rígidas. A rigidez arterial sistêmica pode ser determinada por meio de estimativas de modelos circulatórios e por métodos invasivos (45). A medida de velocidade de onda de pulso (VOP) é um método não invasivo, simples, direto, robusto, reprodutível e pouco oneroso. A medida da VOP carotídea-femoral é um método de determinação regional, sendo considerada como padrão-ouro para medida de rigidez arterial. Este método tem sido usado em estudos epidemiológicos para demonstrar o valor preditivo da rigidez arterial para eventos cardiovasculares (45,50), mostrando-se bem superior à VOP carotídea-radial, pressão de pulso central, índice de amplificação (ou de incremento) e amplificação de pressão carotídea-braquial no estudo de

Framingham (51). A determinação da VOP pode ser feita por meio de ultrassom vascular, mecanotransdutores, tonômetros ou ressonância magnética. A medida da VOP carotídea-femoral é muito relevante clinicamente, porque, além de auxiliar na detecção de alterações pré-clínicas da aterosclerose, também se correlaciona com a doença aterosclerótica instalada em outros territórios vasculares (45,52,53). Baseado em estudos de indivíduos com diferentes populações, um consenso determinou que o valor de corte de 10m/s seja considerado como padrão para se determinar maior risco cardiovascular (50).

Há alguns estudos que avaliaram a rigidez arterial em DM1, mas os métodos utilizados e a faixa etária da população estudada variaram entre eles, e os resultados foram controversos (42,44). Alguns estudos controlados demonstraram maior rigidez arterial em indivíduos com DM1 do que em controles, sendo uma alteração precoce e que antecede as demais complicações clínicas micro e macrovasculares (54–62). Estudos de coorte indicaram associação entre rigidez arterial com a incidência e prevalência de eventos cardiovasculares (63–66).

A disfunção endotelial é considerada um marcador precoce de aterosclerose. As alterações em testes que avaliaram a disfunção endotelial também se mostraram preditoras de DCV em indivíduos com ou sem DM (67,68). A disfunção endotelial é caracterizada por alterações vasculares, tais como a vasoconstrição, a apoptose, a adesão e migração leucocitárias, fenômenos pró-trombóticos e a deposição lipídica. A vasoconstrição ocorre pelo desequilíbrio entre a biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras produzidas pelo endotélio levando a maior vasoconstrição. O principal mediador do tônus vascular é o óxido nítrico (NO), que é um potente vasodilatador produzido pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (27,69).

Como já dito, os fatores de risco cardiovasculares clássicos estão associados com maior disfunção endotelial, incluindo a dislipidemia (70). A LDL oxidada é um importante mediador de dano endotelial. Além disso, os indivíduos com maior proporção de partículas de LDL pequenas e densas podem ter maior disfunção endotelial (70) e o tratamento com estatina pode

melhorar a disfunção (71,72). É cada vez maior o interesse do papel da HDL na aterosclerose. A função mais conhecida da partícula da HDL é o transporte reverso de colesterol (TRC). No entanto, a HDL também possui atividade vasodilatadora que está associada com a biodisponibilidade de NO (68).

A disfunção endotelial ocorre precocemente no DM1 (72–82), podendo ser detectada desde a infância (72,78,80–82). O tempo de diagnóstico de DM1 está relacionado à precocidade da alteração (72,80). A associação entre HbA1c e disfunção endotelial é observada em alguns estudos com DM1. Os mecanismos pelos quais a hiperglicemia crônica leva à disfunção endotelial, são complexos e não completamente compreendidos, mas o estresse oxidativo está envolvido por meio das ativações da via do poliol e do sistema da proteína cinase C e também da formação de produtos finais da glicação avançada (AGE) (72,83).

A função endotelial pode ser investigada por meio de métodos invasivos ou não invasivos. A técnica não invasiva mais utilizada é a de vasodilatação mediada por fluxo (VMF) que pode ser adequadamente realizada com ultrassonografia de alta resolução aplicada às artérias musculares, como a braquial. A medida de VMF permite determinar o grau de dilatação arterial, induzida pela aplicação de estímulos que aumentam a liberação de NO pelo endotélio. Um manguito pneumático do esfigmomanômetro é insuflado ao redor do braço e só é desinsuflado após 5 min. Isto causa uma hiperemia reativa, durante a qual o endotélio é estimulado a produzir e liberar NO, graças ao aumento temporário do fluxo sanguíneo e consequente incremento da tensão de cisalhamento (*shear stress*), resultando em vasodilatação dependente, primariamente, da integridade do endotélio. A variação na VMF com o procedimento é reconhecida como um marcador indireto da bioatividade do NO (72,77).

1.4. Proteômica e função da HDL

As HDL são partículas bastante heterogêneas em suas propriedades físicas e funcionais (29,84). As HDL são constituídas por um núcleo lipídico hidrofóbico, contendo colesterol esterificado (~12%) e TG (~3%) em pequena quantidade, envolvido por uma camada de fosfolípides (~25%) e

apolipoproteínas (85). As proteínas correspondem a cerca de 50-60% da composição das HDL, das quais as principais representantes são a apoA-I (70%) e A-II (20%), A-IV e E (86). As HDL podem ser subfracionadas de acordo com densidade, tamanho e em função de sua composição percentual em lípides e proteínas. Neste aspecto, as HDL_3 são mais densas (1,125-1,21g/mL) enriquecidas em proteínas, principalmente apoA-I, e as HDL_2, menos densas (1,063-1,125g/mL) com conteúdo maior de colesterol esterificado e TG (26,29,87). As partículas nascentes de HDL ou pré-beta HDL não possuem mesma faixa de densidade e, na circulação sanguínea, convertem-se rapidamente nas formas maduras da HDL_3 e HDL_2 (29).

Uma das principais e mais bem estudadas funções das HDL é o TRC. O TRC é um sistema antiaterogênico que favorece o tráfego de colesterol dos tecidos periféricos, incluindo a íntima arterial, ao fígado permitindo sua eliminação nas fezes. Inicia-se com a remoção do excesso de colesterol celular, por meio da interação de apoA-I ou pré-beta HDL com o transportador cassete A1 de ligação ao ATP (ABCA-1). Na HDL, o colesterol livre é rapidamente esterificado pela lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), passando a integrar o núcleo hidrofóbico desta lipoproteína que assume formato esférico. Grandes partículas de HDL (denominadas HDL_2) também removem colesterol livre das células, por meio do transportador cassete G1 de ligação ao ATP (ABCG-1). No plasma, o colesterol esterificado das HDL é transferido para as LDL, VLDL ou QM, por meio da CETP. Estas lipoproteínas podem, então, ser removidas por receptores hepáticos do tipo B-E. Além disso, o colesterol esterificado das HDL pode ser diretamente removido pelos receptores *scavenger* classe B, tipo I (SR-BI) no fígado. As enzimas 7-alfa-hidroxilase e esterol-27-hidroxilase convertem colesterol em ácidos biliares, permitindo sua eliminação na bile e excreção fecal. Alterações em diversas etapas do TRC são descritas no DM, frente à presença de dislipidemia, hiperinsulinemia ou modificação química de lipoproteínas, contribuindo para a DCV no DM (88–91).

Em decorrência do estresse oxidativo e inflamatório, observa-se redução do conteúdo dos receptores da HDL, ABCA-1, o que prejudica a retirada de colesterol celular por meio do TRC (29). A medida da remoção de colesterol

celular pelo soro é referida como uma métrica do TRC, embora possa espelhar a alteração quantitativa da HDL no soro. Por outro lado, a remoção de colesterol celular mediada por HDL reflete a habilidade intrínseca destas lipoproteínas em remover colesterol e proteger contra a aterosclerose, a despeito de possíveis variações em sua concentração no plasma (29,92–94).

Além da função sobre o TRC, as HDL exercem funções antioxidante, anti-inflamatória, antiagregante plaquetária, anticoagulante, antifibrinolítica, vasodilatadora e de transporte de micro-RNAs (29,84,88,95,96). A presença de um estado inflamatório crônico pode fazer com que a HDL deixe de ser anti-inflamatória e passe a ser pró-inflamatória (29). Há evidência de que as HDL também exerçam papel benéfico sobre a secreção pancreática de insulina e sensibilidade periférica a este hormônio (29,86,97) Esta variedade de funções da HDL pode ser explicada por sua composição em lípides e apolipoproteínas, mas também por sua habilidade em carrear diversas proteínas, não diretamente relacionadas ao metabolismo lipídico, mas que impactam na prevenção da aterosclerose (29,98). Há também evidências que modificações químicas das proteínas ligadas à HDL, tais como oxidação, glicação, carbamoilação, podem comprometer a função da HDL e resultar em aumento do risco cardiovascular (29,99).

A análise do proteoma das HDL evidenciou 251 proteínas associadas a esta lipoproteína, incluindo ativadores do sistema complemento, moduladores de proteinases e de resposta de fase aguda, entre outras (96,100–103). Davidson e Shah (2021) apresentaram estes peptídeos em um esquema simplificado e resumido destas proteínas, de acordo com suas principais funções (**Figura 1**) (103).

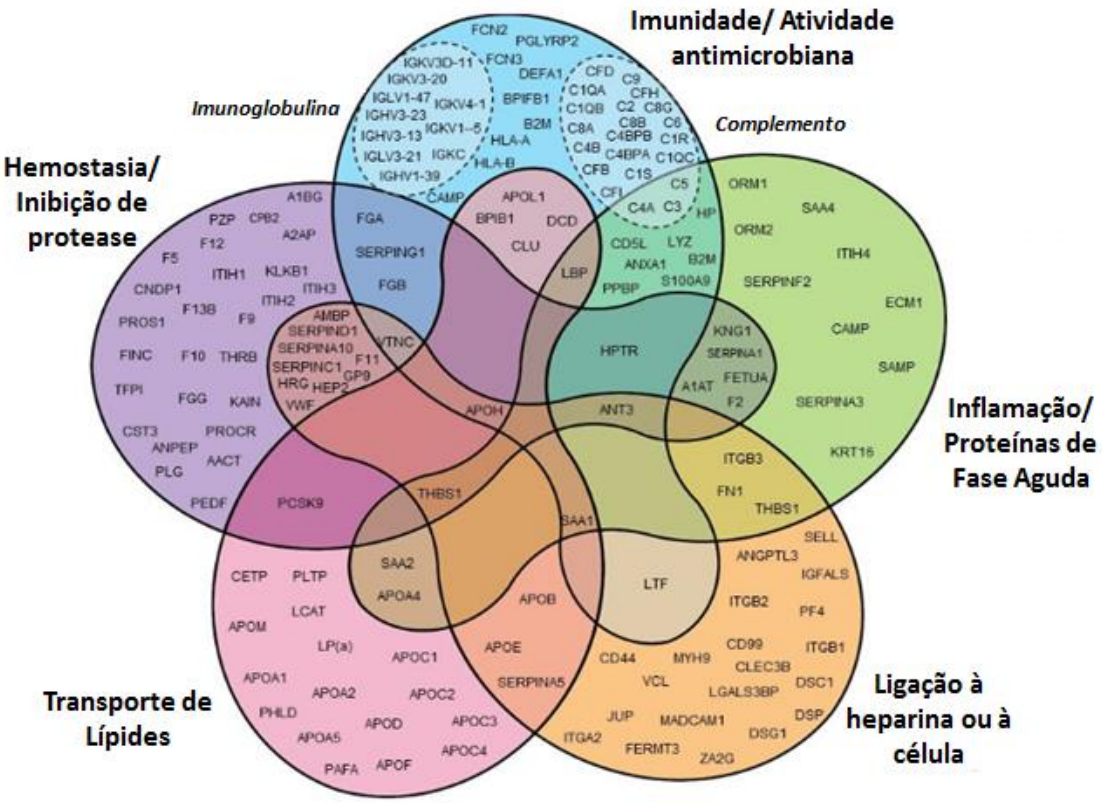


Figura 1: Visão global de proteínas ligadas a HDL, divididas por funções biológicas

Adaptado de *The Davidson/ Shah Lab: HDL Proteome Watch* [Internet]. [acessado em 11 de junho de 2021]. Disponível em: https://homepages.uc.edu/~davidswm/HDLproteome.html

O estudo da proteômica da HDL auxilia na melhor compreensão da funcionalidade da HDL, além de possibilitar a descoberta de biomarcadores tanto diagnósticos quanto prognósticos de doenças, o desenvolvimento de fármacos e a avaliação da resposta terapêutica (102,104). Alguns estudos avaliaram diferenças da proteômica da HDL com uso de estatinas (105,106).

As partículas de HDL_2 e HDL_3 têm perfis diferentes de proteínas carreadas. As apolipoproteínas J, L1 e F, as paraxonases 1 e 3, a PLTP e o fator ativador de plaqueta-acetil hidrolase (PAF-AH) aparecem mais frequentemente nas HDL_3. Por outro lado, as apolipoproteínas E, C1, C2 e C3 são mais observadas nas HDL_2 (93). Há evidência de que a HDL_2 tenha menores capacidades anti-inflamatória e antioxidante do que a HDL_3 (107,108).

Um estudo (98) demonstrou que, independentemente da eficiência no controle glicêmico, indivíduos com DM1 apresentam um perfil de modificações irreversíveis pós-traducionais (oxidação, produto de Amadori e desaminação) de proteínas associadas a HDL (apoA-IV, apoE, apoD, fibrinogênio, albumina, entre outras) diferente daquele de indivíduos sem DM. Isto se associou à menor remoção de colesterol de macrófagos e à redução da capacidade antioxidante, ambas mediadas pelo soro dos indivíduos com DM1 (com controle glicêmico adequado e inadequado) em comparação ao de indivíduos sem DM.

A determinação do HDL-c não necessariamente reflete a presença e a concentração de proteínas carregadas pelas partículas de HDL e, consequentemente, sua possível ação ateroprotetora. Além disso, a HDL é responsável pela maior diversidade proteômica observada entre as lipoproteínas. Sendo assim, a busca por uma assinatura proteica das HDL visa aliar às medidas tradicionais de HDL-c e apo A-I, marcadores mais fidedignos de risco cardiovascular que possam refletir perda de função das HDL ou benefícios as suas funções antiaterogênicas (100).

1.5. Justificativa do estudo

As doenças macrovasculares constituem a principal causa de morbimortalidade em indivíduos com DM1. Embora diversos estudos epidemiológicos apontem para uma associação inversa entre o HDL-c e a incidência de aterosclerose, as terapias recentes para elevação do HDL-c e estudos de randomização mendeliana falharam em apontar benefícios em desfechos cardiovasculares (96). Estes resultados parecem esbarrar na constante associação de HDL-c reduzido com inflamação, outros componentes da síndrome metabólica ou fatores genéticos, que agravam o risco cardiovascular. Além disso, na maioria dos estudos, o uso concomitante de medicamentos dificulta as análises de desfecho. De qualquer modo, a métrica para a quantificação dos efeitos antiaterogênicos da HDL tem sido revista e a determinação das propriedades funcionais desta lipoproteína assume importância fundamental (100).

No DM1, a terapia insulínica, por estimular a síntese e atividade da LPL, favorece a elevação do HDL-c. Entretanto, mesmo com concentração de HDL-c dentro dos valores de referência ou acima deles, os indivíduos com DM1 apresentam risco aumentado de eventos cardiovasculares (1,10,34,109–111) Este achado vai ao encontro de possíveis alterações funcionais das HDL que reduzam sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória, vasodilatadora e de mediar o TRC. A HDL carreia diversas proteínas não totalmente relacionadas ao metabolismo de lípides e a análise de seu proteoma pode fornecer informações sobre outras funções desta lipoproteína que podem ser moduladas em diversas condições patológicas e terapêuticas.

No presente estudo, foi testada a hipótese de que a proteômica da HDL esteja associada com a funcionalidade desta lipoproteína (em particular, remoção de colesterol celular, mediadas pelas partículas isoladas de HDL) e com variáveis de função vascular (VOP e VMF) e NAC de indivíduos com DM1, indicativas de risco cardiovascular. Os achados contribuirão para a melhor compreensão da funcionalidade da partícula de HDL e predição de risco cardiovascular no DM1.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar o proteoma e a funcionalidade das subfrações de HDL (HDL_2 e HDL_3) isoladas de portadores de DM1 e controles não diabéticos e sua associação com a função vascular, indicativa de aterosclerose subclínica.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a assinatura proteica das subfrações da HDL por meio do estudo da proteômica.
- Associar os resultados da proteômica das subfrações da HDL com variáveis clínicas e laboratoriais.
- Associar os resultados dos testes de função vascular com variáveis clínicas e laboratoriais.
- Associar o risco cardiovascular estimado por calculadoras específicas para indivíduos com DM1 com variáveis clínicas e laboratoriais.
- Associar teste de funcionalidade da HDL com variáveis clínicas e laboratoriais.

3. MÉTODOS

3.1. Delineamento do estudo

O presente estudo foi um estudo observacional, analítico e transversal que incluiu indivíduos com DM1 e controles sem DM.

3.2. Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP em 09 de janeiro de 2020 (número do Certificado de Apreciação Ética - CAAE: 26584619.2.0000.0068; número do parecer: 3.796.622). Todos os participantes tomaram ciência do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) previamente aprovado.

3.3. Casuística

3.3.1. Seleção

Foram selecionados 50 indivíduos portadores de DM1 seguidos no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (grupo DM1) e 30 indivíduos sem DM1 para compor o grupo controle. Os dois grupos apresentaram semelhança quanto ao sexo e à idade. Dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos com DM1 foram obtidos de prontuário eletrônico da instituição.

Desta casuística de casos e controles, um subgrupo de 30 indivíduos com DM1 e os 30 indivíduos controles foram reconvocados para realização dos testes de função vascular (determinações de distensão da aorta por VOP carotídeo-femoral e de função endotelial por VMF).

3.3.2. Critérios de inclusão

- Idade maior ou igual a 18 anos.
- No grupo DM1: Diagnóstico de DM1 há, pelo menos, cinco anos.
- No grupo Controle: Ausência de DM.

3.3.3. Critérios de não inclusão

- História pessoal de doença macrovascular aterosclerótica clinicamente evidente (coronariopatia, doença arterial obstrutiva periférica ou doença cerebrovascular).
- Familiares de indivíduos com DM1 recrutados no estudo
- Tabagismo ativo ou aqueles que cessaram o uso há menos de dez anos.
- Concentração de TG > 400 mg/dL.

3.4. Estimativa de risco cardiovascular

Para o cálculo de risco estimado de doença cardiovascular em dez anos, foram utilizadas as ferramentas *T1 Risk Engine* (112) e QRISK3 (113), disponibilizados na Internet, com dados clínicos dos indivíduos com DM1, obtidos em prontuário.

3.5. Neuropatia autonômica cardiovascular

Os dados do teste para NAC foram obtidos a partir de bancos de dados de estudos realizados no Serviço de Endocrinologia do HCFMUSP – Unidade de Diabetes (114,115). A avaliação de função cardíaca simpática e parassimpática foi feita pela análise de sete testes que incluem os testes padronizados de Ewing e a análise espectral realizada pelo *software* Poly-Spectrum (versão 4.8.143; Neurosoft®, Ivanovo, Rússia). A sequência dos testes é: variação da frequência cardíaca (FC) à respiração profunda, relação da FC com manobra de Valsalva, influência da ortostase na FC e avaliação de hipotensão ortostática. A presença de três ou mais testes alterados foi utilizada como critério para a presença de NAC (116–118).

3.6. Coleta de sangue e determinações bioquímicas

Amostras de sangue venoso dos indivíduos controles e DM1 foram obtidas após jejum de 12 h e com dieta habitual. O plasma ou soro foi obtido após centrifugação a 4°C e utilizado para determinação das concentrações de colesterol total (CT), HDL-c, TG, glicemia, creatinina e frutosamina por método enzimático colorimétrico automatizado (Labtest do Brasil, Minas Gerais, Brasil). O HDL-c foi determinado após precipitação das lipoproteínas que contêm apoB, com sulfato de dextrana 0,2%/ cloreto de magnésio 3M (v/v). O LDL-c foi calculado baseado nas fórmulas de Friedewald e de Martin e cols. (119,120) e a eTFG foi calculada por meio da equação da *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) (121). A HbA1c foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), certificada pelo *National Glyco Hemoglobin Standardization Program* (NGSP-EUA).

3.7. Vasodilatação mediada por fluxo (VMF)

A avaliação da função endotelial por meio da manobra de hiperemia reativa é a técnica não invasiva mais utilizada em humanos. Os testes foram realizados após jejum de 8 h, no período da manhã, com o indivíduo em decúbito horizontal e em repouso num ambiente calmo e com temperatura ambiente entre 20°C e 25°C. Monitorizações eletrocardiográfica e da pressão arterial são realizadas nos testes. Os exames foram sempre realizados por um único pesquisador e de acordo com as diretivas da *International Brachial Artery Reactivity Task Force* (versão 2002). De forma sequencial, a VMF dependente do endotélio e a resposta do músculo liso vascular ao vasodilatador dinitrato de isossorbida (independente do endotélio) foram avaliadas na artéria braquial, que foi acessada acima da prega do cotovelo, e o seu diâmetro verificado por aparelho de ultrassom (Sequoia Echocardiography System, versão 6.0, Acuson Siemens®, Malvern, EUA) equipado com um transdutor linear de multifrequencial (7-12 MHz) e acoplado a um computador programado para gravar e analisar este tipo de dados. Para a análise, dois observadores independentes analisaram seis imagens selecionadas para cada fase do teste coincidindo com a onda R do eletrocardiograma. Os dados do diâmetro da

artéria braquial foram obtidos em condições basais, após a indução da hiperemia reativa e depois da administração de um comprimido de dinitrato de isossorbida (Isordil® 10mg). A VMF após hiperemia reativa ou VMF dependente de endotélio (VDE) é expressa, em porcentagem de variação do diâmetro da artéria braquial após o estímulo, em relação ao diâmetro basal: VDE (%) = (Diâmetro HR – Diâmetro Basal)/ Diâmetro basal x 100. A vasodilatação independente do endotélio (VIE) é expressa como a porcentagem de variação do diâmetro da artéria braquial, após 5 minutos da administração do dinitrato de isossorbida, em relação ao diâmetro pré-nitrato: VIE (%) = (Diâmetro pós-nitrato – Diâmetro pré-nitrato)/ Diâmetro pré x100. Por atuar independentemente do endotélio, os vasodilatadores, como a nitroglicerina, permitem a avaliar a causa da eventual redução na VMF, seja por disfunção do endotélio ou do músculo liso arterial. Na literatura, a redução da VDE é comumente utilizada como sinônimo de disfunção endotelial (122).

3.8. Velocidade de onda de pulso carotídeo-femoral (VOP)

A onda de pulso se propaga na árvore arterial, cuja a velocidade é utilizada como uma medida indireta do grau de rigidez da artéria (123). Quanto mais rígidez é a artéria, maior é a velocidade de deslocamento da onda. A VOP é medida por captores externos (mecanotransdutores), colocados em dois pontos conhecidos da árvore arterial. O cálculo é realizado por meio do quociente entre a distância em que a onda percorre em função do tempo (45,50). A VOP foi determinada no segmento carótideo-femoral da árvore arterial por meio de um aparelho já validado e utilizado em diversos estudos no InCor - HCFMUSP (Complior®; Gonesse, França) (124–128). Cada onda pulsátil pode ser observada em tempo real na tela do computador. O início da onda é determinado pela tangente à fase ascendente da onda de pulso. Cada valor obtido da VOP representa a média de pelo menos dez curvas selecionadas pela sua qualidade e nitidez (45,50,129).

3.9. Isolamento das subfrações da HDL

Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para o isolamento das subfrações da HDL.

O plasma foi submetido à ultracentrifugação a 100.000g por 24 h, a 4ºC (ultracentrífuga Beckman com rotor tipo SW 40) para obtenção das subfrações da HDL_2 e HDL_3, por gradiente descontínuo de densidade (HDL_2: 1,063 - 1,125g/mL e HDL_3: 1,125 - 1,21g/mL). Após isolamento, as lipoproteínas foram imediatamente congeladas a -80°C (130).

3.10. Proteômica das subfrações da HDL

3.10.1. Digestão proteolítica e purificação das amostras

A concentração de proteínas totais em cada subclasse da HDL foi determinada pelo método de Bradford (131), empregando albumina como padrão. A HDL (10 µg de proteína) foi solubilizada em 100 mM de NH_4HCO_3, reduzida com 5µL de ditiotreitol 0,1 M, alquilada com 3mL de iodoacetamida 0,5 M e digerida com 2,5 µL de tripsina (1 tripsina:40 proteína, m/m) por 4h a 37ºC. Em seguida, outra alíquota da enzima (1 tripsina:50 proteína, m/m) foi adicionada e as amostras foram incubadas durante a noite a 37ºC (132,133). Após a hidrólise ácida com ácido trifluoroacético 2,0% (v/v), as amostras foram dessalinizadas, como descrito no protocolo de *clean up StageTip* (134). Depois de secas, as amostras foram armazenadas a -80ºC até análise por espectrometria de massa (MS). As amostras digeridas e limpas foram ressuspendidas em ácido fórmico 0,1% (v/v) (concentração final de proteínas de 25 ng/µL) e submetidas à análise por MS. A angiotensina 0,2 pmol/µL foi usada como padrão interno, a fim de monitorar a variabilidade do MS.

3.10.2. Análise semi-quantitativa por proteômica *shotgun* ou análise dependente de dados (DDA)

O instrumento Easy-nLC 1200 (Thermo Scientific®, Bremen, Alemanha) foi empregado para a separação dos peptídeos com uso de gradiente linear de solvente A (ácido fórmico 0,1%, v/v) e solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila 80%, v/v). Vinte amostras de HDL digeridas (50 ng) de cada condição (DM1 e controles) foram randomicamente selecionadas para análise por *shotgun*. Cada amostra foi carregada numa pré coluna tipo *trap* (nanoViper C18, 3 µm, 75 µm x 2 cm, Thermo Scientific®, Bremen, Alemanha) com adição

de 12 µL de solvente A a 980 bar. Em seguida, os peptídeos aprisionados na coluna *trap* foram eluídos para coluna analítica C18 (*nanoViper* C18, 2 µm, 75 µm x 15 cm, Thermo Scientific®, Bremen, Alemanha) num fluxo de 300 nL/min. Os peptídeos foram eluídos da coluna empregando gradiente linear de 5% a 28% de solvente B durante 25 min, seguido de 28% a 40% por 5 min. Finalmente, a coluna foi lavada por 10 min com 95% de solvente B, e o sistema foi reequilibrado com 100% de solvente A antes de cada injeção. A aquisição dos dados foi realizada em um espectrômetro de massas *Orbitrap Fusion Lumos* (Thermo Scientific®, Bremen, Alemanha) com fonte *nanospray* Flex NG integrada (Thermo Scientific®, Bremen, Alemanha). Um ciclo de 3 s foi empregado para a aquisição do MS1 (espectro de massas dos íons precursores) seguido por sucessivos MS2 dependentes (espectro de massas dos íons fragmentados). Íons precursores selecionados para o MS2 foram excluídos para varreduras subsequentes de MS2 por 20 s. A resolução do modo MS1 foi definida como 120.000 (a 400 m/z), o alvo de controle automático de ganho em 4×10^5 e a faixa de 400 a 1600 m/z foi monitorada. O MS1 foi seguido por *scans* de MS2 dependentes de dados com resolução de 30.000 (a 400 m/z), tempo de preenchimento do *trap* de 54 ms, janela de isolamento de 1,2 m/z e energia de colisão normalizada de 30%. O uso da avaliação da proteômica por *shotgun* é uma análise preliminar para identificação de proteínas. Por este método, foi possível conhecer a amostra, identificando as proteínas presentes nela de uma forma global. No entanto, este método é semiquantitativo, isto é, ele seleciona aleatoriamente para a detecção as proteínas de maior abundância e a reprodutibilidade do método é baixa.

3.10.3. Identificação das proteínas

As proteínas foram identificadas por meio de espectros de fragmentação (MS/MS) comparados com o banco de dados internacional UniProt (Agosto 2018, versão 109, 20.404 entradas) (135), utilizando a ferramenta de busca MaxQuant (versão 1.6.3.3) (136) com carbamidometilação na cisteína (Cys) como modificação fixa e oxidação da metionina (Met) como variável. Tolerâncias de massa estabelecida pelo *software* para os íons precursores e

para os íons fragmentados foram empregadas. A enzima tripsina foi selecionada e foram monitorados dois peptídeos, no mínimo, para cada proteína e permitido apenas dois sítios de clivagem perdidos. O processamento dos resultados foram realizados pelo método de quantificação *label free* (LFQ).

3.10.4. Análise quantitativa do proteoma da HDL por monitoramento de reações em paralelo (PRM)

As mesmas colunas (tipo *trap* e analítica) empregadas nos experimentos de *shotgun* foram empregadas para o método PRM. A HDL digerida (50 ng) foi carregada numa pré-coluna tipo *trap* com 12 µL de solvente A a 980 bar. Em seguida, ao girar a válvula os peptídeos foram eluídos para a coluna analítica num fluxo de 350 nL/min, com gradiente linear de 5% a 28% de solvente B por 15 min, seguido por outro de 28% a 40% durante 2 min. A concentração de solvente B foi aumentada em 2 min e a coluna foi lavada por 10 min a 95%. Ambas as colunas foram reequilibradas com 12 µL e 6 µL, respectivamente, a 980 bar usando 100% de solvente A antes de cada corrida. O espectrômetro de massas *Orbitrap Fusion Lumos* equipado com fonte *nanospray* Flex NG foi utilizado para os experimentos. A resolução empregada foi de 15.000 (a 400 m/z), o alvo AGC em 5 x 10^4 e tempo de preenchimento do *trap* de 22 ms. Energia de colisão normalizada de 30% foi usada para a fragmentação dos íons e janela de isolamento de 1,6 m/z foi selecionada.

3.10.5. Seleção dos peptídeos para a quantificação relativa das proteínas presentes na HDL em amostras biológicas

Bibliotecas espectrais construídas a partir das proteínas determinadas por *shotgun* foram empregadas para a elaboração da metodologia PRM. Um total de 186 peptídeos de 67 proteínas foi identificado, mas esse número foi reduzido pela eliminação de queratinas, imunoglobulinas, e todas as proteínas com erro de massa >10 ppm. Após o critério de exclusão ser aplicado, baseado na frequência observada nas amostras analisadas por *shotgun* e por resultados anteriores (101), 116 peptídeos de 46 proteínas, incluindo o controle angiotensina I, permaneceram em quantidades diferentes (variando de <1% a ~70% do total de proteínas) na HDL foram selecionadas para a quantificação

relativa. Para análise estatística, um peptídeo por proteína foi selecionado e o controle angiotensina I foi excluído. Tal escolha foi baseada em critérios descritos anteriormente (137). A tabela dos peptídeos encontra-se no **Anexo 1**.

3.10.6. Controle de qualidade usado para PRM

A robustez da metodologia PRM foi avaliada usando um peptídeo da angiotensina I (DRVYIHPFHL) como padrão interno. Para isso, angiotensina I 0,2 pmol/µL foi adicionada em cada amostra e a variação nas áreas do peptídeo foi monitorada ao longo de todas as injeções (total de 90 injeções).

3.10.7. Processamento de dados

Para o processamento de dados qualitativos e quantitativos de proteômica, foi empregado o *software* Skyline (versão 4.2, MacCoss Lab Software) (138). Todos os picos cromatográficos foram inspecionados manualmente para que a detecção e a integração correta dos picos fossem garantidas.

3.11. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos mediado pelas subfrações da HDL

De forma estrita, a utilização de animais de laboratório foi de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (CEUA#1015/2018). Os camundongos da linhagem C57BL6 foram submetidos à eutanásia. Células obtidas da medula óssea, por meio da dissecção do fêmur e da tíbia, foram diferenciadas em macrófagos. A medula óssea foi lavada com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo antibióticos, soro fetal bovino (FCS) e meio condicionado advindo de células L929. Em seguida, A medula foi aspirada gentilmente com dissolução dos agregados celulares. As células foram centrifugadas, em temperatura ambiente, a 1000 rpm, durante 6 min, para depois serem semeadas em placas de cultura com incubação por cinco dias, em atmosfera de CO_2 5% e temperatura de 37°C. No quinto dia, o meio de cultura foi trocado por novo meio condicionado de células L929, que auxilia no crescimento e na diferenciação de células da medula óssea em macrófagos.

No sexto dia, as células foram incubadas com meio DMEM com baixa concentração de glicose, contendo 10% de FCS.

Macrófagos foram incubados com sobrecarga de LDL acetilada (50 µg/mL) e ^{14}C-colesterol (0,3 µCi/mL) por 24 horas e a seguir, mantidos, por mais 24 horas, em meio DMEM contendo albumina isenta de ácidos graxos (FAFA 1 mg/mL) para equilíbrio dos *pools* intracelulares de colesterol. A porcentagem de efluxo de ^{14}C-colesterol (%EC) foi determinada após incubação com HDL dos indivíduos com DM1 e controles (50 µg/mL), durante seis horas, como: ^{14}C-colesterol no meio/ (^{14}C-colesterol na célula + ^{14}C-colesterol no meio) x 100. Incubações controles foram realizadas apenas na presença de DMEM-FAFA e o efluxo obtido nesta condição (efluxo basal) foi subtraído daquele obtido com as HDL, de modo a expressar o efluxo específico mediado por HDL (139).

3.12. Análise estatística

Para a análise descritiva, as variáveis quantitativas foram expressas por meio de média ± DP ou mediana (intervalo interquartil 25%-75%). As variáveis qualitativas foram expressas por frequências absoluta (n) e relativa (%). As diferenças das características demográficas entre casos e controles foram estimadas usando o teste de qui-quadrado de Pearson para variáveis categóricas e teste t-Student ou o Mann-Whitney para as variáveis contínuas. Foram realizados testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para a avaliação da suposição de normalidade dos dados. Para avaliação dos dados da proteômica, as proteínas presentes na HDL foram estatisticamente diferenciadas pelo teste não paramétrico pareado e independente de Wilcoxon (teste modificado de Wilcoxon). As abundâncias dos peptídeos foram transformadas em log10 para a análise. Os valores de *p* obtidos na análise estatística foram corrigidos usando o método de Benjamini-Hochberg (140–142). Este método controla a razão de falsas descobertas (*False Discovery Rate* - FDR), assumindo uma correlação não negativa. Um limiar de valor de *p* corrigido foi calculado, e somente as proteínas acima desse limiar foram consideradas significativamente diferentes (141,142). A razão de chances (*Odds ratio*) com intervalo de confiança de 95% foi calculada para a associação

de proteínas com os dois grupos. Análise discriminante foi realizada para determinar a capacidade discriminatória dos dados de proteômica dos grupos DM1 e controle.

Para análise de correlação entre variáveis, foi realizada correlação de Pearson para variáveis contínuas lineares ou correlação de Spearman para avaliar relações monótonas entre variáveis contínuas ou ordinais. Os coeficientes de correlação variam de |0| a |1|, podendo ser positivos ou negativos, sendo que os coeficientes < |0,5| foram considerados fracos; de |0,5| a |0,8|, bons; e maiores que |0,8|, ótimos.

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados usando os *softwares* R Studio versão 1.1.463 (RStudio, Inc.) e SPSS versão 21.0 (SPSS Inc., IBM). O valor de P <0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais

Foram avaliados 50 indivíduos com DM1 e 30 controles (n = 80). Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais são mostrados na **Tabela 1**. Os indivíduos com DM1 e controles não diferiram em idade, sexo, IMC, circunferência abdominal, concentração de HDL-c e eTFG. Os indivíduos com DM1 mostraram maior HbA1c e frutosamina. Já os controles apresentaram maiores concentrações de colesterol total, LDL-c e TG. A HAS e o uso de estatina só estavam presentes no grupo DM1.

Os indivíduos com DM1 mostraram mediana de tempo de DM e de idade ao diagnóstico de 22 (16-30) e 11,5 (6-18) anos, respectivamente. Vinte indivíduos com DM1 usavam estatinas (40%) e 15 apresentaram diagnóstico concomitante de HAS (30%). Quanto às complicações do DM, retinopatia diabética (48%) e NAC (30%) eram as mais prevalentes. Neuropatia periférica, albuminúria persistentemente maior do que 300mg/g de creatinina e eTFG menor que 60 mL/min/1,73m^2 estavam presentes em 12%, 4% e 4% dos indivíduos com DM1, respectivamente (**Tabela 1**).

A **Tabela 2** indica a avaliação de indivíduos com DM1 quanto à presença ou não de HAS. Os indivíduos com DM1 e HAS mostraram maior tempo de DM, maior albuminúria, uso de estatina mais frequente e mais retinopatia diabética. Quanto ao controle glicêmico (HbA1c <8,5% e ≥8,5%), a única variável que esteve associada estatisticamente ao pior controle glicêmico foi a albuminúria (**Tabela 3**). Quanto ao uso de estatina, o tempo de diagnóstico de DM1 e a trigliceridemia foram maiores e a HbA1c e a eTFG menores naqueles em uso de estatina. Além disso, a porcentagem de concomitância com HAS era maior em indivíduos com DM1 que usavam estatina (**Tabela 4**). Quanto à presença ou não de NAC, não houve diferença das variáveis clínicas e laboratoriais entre os grupos (**Tabela 5**).

Tabela 1: Características antropométricas, clínicas e laboratoriais dos indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 1 e controles.

Variável	DM1 n=50	Controles n=30	*P*
Dados antropométricos			
Sexo feminino (%)	50	50	-
Idade (anos)	34 (29-40)	34 (30-46)	0,474
IMC (kg/m²)	22,94 (20,3-26,6)	24,36 (23,2-26,60)	0,077
Circunferência abdominal (cm)	89 (80-96)	86,0 (79,0-95,0)	0,530
Tempo de DM1 (anos)	22 (16 – 30)	-	
Idade ao diagnóstico (anos)	11,5 (6 – 18)	-	
HAS, n (%)	15 (30,0%)	0	
Dados laboratoriais			
HbA1c (%)	8,25 (6,9-9,3)	5,35 (5,0-5,5)	<0,001
Frutosamina (µmol/L)	362 (336-421)	226 (215-237)	<0,001
CT (mg/dL)	163 (145-184)	186,5 (153-199)	0,017
HDL-c (mg/dL)	57 (48-67)	56,5 (46-68)	0,709
LDL-c (mg/dL)	86,5 (75-104)	97 (86-120)	0,021
TG (mg/dL)	69 (57-93)	86 (68-134)	0,036
eTFG (mL/min/1,73m^2)	103,5 (90,2-117,2)	101,0 (89,7-100,1)	0,538
Albuminúria (mg/g creatinina)	6,10 (4,17-16,36)	NA	
Complicações microvasculares			
Retinopatia, n (%)	24 (48%)		
Estágios de albuminúria, n (%)			
A1: < 30mg/g Cr	40 (80%)		
A2: 30-300 mg/g Cr	8 (16%)		
A3: >300 mg/g Cr	2 (4%)		
Estágios de eTFG (mL/min/1,73m^2)			
G1: ≥90	38 (76%)		
G2: 60-89	8 (16%)		
G3a: 45-59	2 (4%)		
G3b: 30-44	1 (2%)		
G4: 15-29	0		
G5: <15	1 (2%)		
Neuropatia periférica, n (%)	6 (12%)		
NAC, n (%)	15 (30%)		
Medicações, n (%)			
Estatinas	20 (40%)		
Atorvastatina	10 (20%)		
Sinvastatina	10 (20%)		
IECA	12 (24%)		
BRA	7 (14%)		
Diuréticos tiazídicos	7 (14%)		
Espironolactona	1 (2%)		
Betabloqueador	2 (4%)		
BCC	1 (2%)		
Hidralazina, n (%)	1 (2%)		
RCV em dez anos (%)			
Steno T1 Engine	6,90 (4,20-15,60)		
QRISK3	4,50 (2,00-7,60)		

Variáveis categóricas: Frequência absoluta (n) e relativa (%), Teste de Qui-quadrado de Pearson. Variáveis contínuas: Mediana (percentil 25- percentil 75), Teste de Mann Whitney.
Abreviaturas: BCC – bloqueador de canal de cálcio, BRA – bloqueador do receptor de angiotensina I, CT – colesterol total, eTFG – taxa de filtração glomerular estimada, HAS – hipertensão arterial, HDL-c – HDL-colesterol, IMC – índice de massa corpórea, IECA – inibidor da enzima de conversão de angiotensina, LDL-c – LDL-colesterol, NA – não avaliado, NAC – neuropatia autonômica cardiovascular, RCV – risco cardiovascular, TG – triglicérides.

Tabela 2: Características dos indivíduos com diabetes tipo 1 quanto à presença ou não de hipertensão arterial.

Variável	Hipertensão arterial		
	Ausente n=29	**Presente n=21**	***P***
Dados clínicos			
Sexo Feminino	17 (58,6%)	8 (38,1%)	0,152
Faixa etária			0,065
20 a 29 anos	12 (41,4%)	3 (14,3%)	
30 a 39 anos	13 (44,8%)	9 (42,9%)	
40 a 59 anos	2 (6,9%)	6 (28,6%)	
50 a 69 anos	2 (6,9%)	3 (14,3%)	
Idade ao diagnóstico de DM1 (anos)	12 (11-19)	10 (3-16)	0,115
Tempo de diagnóstico de DM1 (anos)	19 (15-24)	27 (20-36)	0,014
IMC (kg/m^2)	22,3 (20,3-26,6)	23,9 (20,6-26,0)	0,673
Circunferência abdominal (cm)	85,3 (79,3-96,3)	92,0 (81,0-96,0)	0,660
Exames laboratoriais			
HbA1c (%)	8,0 (6,9-9,0)	8,7 (7,9-9,9)	0,284
Frutosamina (µmol/L)	360 (334-407)	363 (338-436)	0,709
CT (mg/dL)	163 (145-176)	155 (147-185)	0,929
HDL-c (mg/dL)	58 (47-66)	57 (50-72)	0,883
LDL-c (mg/dL)	85 (77-102)	90 (75-104)	0,914
TG (mg/dL)	67 (57-86)	83 (58-106)	0,426
eTFG (mL/min/1,73m^2)	105,4 (90,6-117,4)	96,9 (83,6-114,4)	0,404
Albuminúria (mg/g Cr)	5,3 (4,2-8,0)	16,0 (4,8-39,2)	0,010
Complicações diabéticas			
Retinopatia	10 (34,5%)	14 (66,7%)	0,025
Doença renal	1 (3,4%)	4 (19,0%)	0,070
Neuropatia periférica	4 (13,8%)	2 (9,5%)	0,647
NAC	7 (24,1%)	8 (38,1%)	0,288
Medicações			
Estatina	7 (24,1%)	13 (61,9%)	0,015
IECA	0 (0%)	12 (57,1%)	<0,001
BRA	0 (0%)	7 (33,3%)	0,001
Betabloqueador/ BCC	0 (0%)	3 (14,3%)	0,036
Diurético tiazídico/ Espironolactona	0 (0%)	8 (38,1%)	<0,001

Variáveis categóricas: Frequência absoluta (n) e relativa (%), Teste de Qui-quadrado de Pearson. Variáveis contínuas: Mediana (percentil 25- percentil 75), Teste de Mann Whitney.
Abreviaturas: BCC – bloqueador de canal de cálcio, BRA – bloqueador de receptor de angiotensina II, CT – colesterol total, eTFG – taxa de filtração glomerular estimada, HDL-c – HDL-colesterol, IECA – inibidor da enzima de conversão de angiotensina, IMC – índice de massa corpórea, LDL-c – LDL-colesterol, NAC - Neuropatia autonômica cardiovascular, TG – triglicérides.

Tabela 3: Características dos indivíduos com diabetes tipo 1 quanto ao controle glicêmico.

Variável	HbA1c <8,5% n=29	HbA1c ≥8,5% n=21	*P*
Dados clínicos			
Sexo Feminino	15 (51,7%)	10 (47,6%)	0,774
Faixa etária			0,201
20 a 29 anos	7 (24,1%)	8 (38,1%)	
30 a 39 anos	13 (44,8%)	9 (42,9%)	
40 a 59 anos	4 (13,8%)	4 (19,0%)	
50 a 69 anos	5 (17,2%)	0 (0%)	
Idade ao diagnóstico de DM1 (anos)	12 (9-18)	11 (5-18)	0,528
Tempo de diagnóstico de DM1 (anos)	23 (16-34)	20 (15-27)	0,284
HAS	10 (34,5%)	11 (52,4%)	0,206
IMC (kg/m^2)	24 (22-26)	24 (19-27)	0,823
Circunferência abdominal (cm)	86,0 (78,5-96,0)	86,5 (81,0-94,0)	0,945
Exames laboratoriais			
HbA1c (%)	5,7 (5,3-7,4)	9,5 (9,0-11,0)	0,000
Frutosamina (µmol/L)	248 (225-342)	403 (363-501)	0,000
CT (mg/dL)	170 (146-190)	168 (149-185)	0,823
HDL-c (mg/dL)	57 (47-68)	57 (46-67)	0,917
LDL-c (mg/dL)	93 (79-105)	92 (82-111)	0,922
TG (mg/dL)	76 (58-115)	70 (61-93)	0,603
eTFG (mL/min/1,73m^2)	101,7 (89,7-112,4)	101,9 (94,6-117,2)	0,952
Albuminúria (mg/g Cr)	5,26 (4,15-9,57)	13,11 (5,00-36,00)	0,025
Complicações diabéticas			
Retinopatia	12 (41,4%)	12 (57,1%)	0,271
Doença renal	1 (3,4%)	4 (19,0%)	0,070
Neuropatia periférica	2 (6,9%)	4 (19,0%)	0,192
NAC	9 (31,0%)	6 (28,6%)	0,851
Medicações			
Uso de estatina	14 (48,3%)	7 (33,3%)	0,291
IECA	5 (17,2%)	7 (33,3%)	0,189
BRA	5 (17,2%)	2 (9,5%)	0,438
Betabloqueador/ BCC	2 (6,9%)	1 (4,8%)	0,754
Diurético tiazídico/ Espironolactona	6 (20,7%)	2 (9,5%)	0,288

Variáveis categóricas: Frequência absoluta (n) e relativa (%), Teste de Qui-quadrado de Pearson. Variáveis contínuas: Mediana (percentil 25 – percentil 75), Teste de Mann Whitney.
Abreviaturas: BCC – bloqueador de canal de cálcio, BRA – bloqueador de receptor de angiotensina II, CT – colesterol total, eTFG – taxa de filtração glomerular estimada, HAS – hipertensão arterial sistêmica, HDL-c – HDL-colesterol, IECA – inibidor da enzima de conversão de angiotensina, IMC – índice de massa corpórea, LDL-c – LDL-colesterol, NAC - Neuropatia autonômica cardiovascular, TG – triglicérides

Tabela 4: Características dos indivíduos com diabetes tipo 1 quanto ao uso de estatina.

Variável	Uso de estatina		
	Não n=30	**Sim n=20**	***P***
Dados clínicos			
Idade (anos)	31 (27-39)	35 (32-40)	0,06
Idade ao diagnóstico de DM1 (anos)	12 (8-18)	11 (3-18)	0,320
Tempo de diagnóstico de DM1 (anos)	20 (14-27)	27 (19-31)	0,041
IMC (kg/m^2)	23 (19-27)	23 (21-25)	0,860
HAS (%)	13,8%	52,4%	0,003
Retinopatia (%)	41,4%	57,1%	0,271
Neuropatia periférica	13,8%	9,5%	0,647
Exames laboratoriais			
HbA1c (%)	8,4 (7,8,3-9,5)	7,8 (6,8-8,8)	0,046
Frutosamina (µmol/L)	374 (336-434)	361 (336-379)	0,709
CT (mg/dL)	163 (147-176)	152 (143-194)	0,616
HDL-c (mg/dL)	58 (53-67)	54 (43-63)	0,103
LDL-c (mg/dL)	85 (69-102)	92 (84-108)	0,188
TG (mg/dL)	64 (58-76)	93 (56-116)	0,035
Albuminúria (mg/g Cr)	5,99 (4,76-13,86)	7,20 (4,00-16,36)	0,992
eTFG (mL/min/1,73m^2)	107,6 (96,9-118,5)	95,7 (83,6-110,8)	0,026

Mediana (percentil 25 – percentil 75), Teste de Mann Whitney.
Abreviaturas: CT – colesterol total, eTFG – taxa de filtração glomerular estimada, HAS – hipertensão arterial sistêmica, HDL-c – HDL-colesterol, IMC – índice de massa corpórea, LDL-c - LDL-colesterol, TG - triglicérides

Tabela 5: Características dos indivíduos com diabetes tipo 1 quanto à presença de neuropatia autonômica cardiovascular.

Parâmetro	Neuropatia autonômica cardiovascular		
	Não n=35	Sim n=15	*P*
Dados clínicos			
Idade (anos)	32 (28-40)	35 (32-40)	0,45
Idade ao diagnóstico de DM1 (anos)	12 (6-18)	11 (6-22)	0,60
Tempo de diagnóstico de DM1 (anos)	22 (16-30)	19 (15-30)	0,82
IMC (kg/m^2)	24 (20-27)	21 (19-25)	0,11
HAS (%)	37,1	53,3	0,29
Retinopatia (%)	40,0	66,7%	0,08
Neuropatia periférica (%)	8,6%	20,0%	0,25
Exames laboratoriais			
HbA1c (%)	8,3 (6,9-9,3)	8,1 (7,2-11,0)	0,69
Frutosamina (µmol/L)	362 (334-403)	360 (338-501)	0,53
CT (mg/dL)	163 (147-179)	151 (140-185)	0,56
HDL-c (mg/dL)	58 (50-75)	55 (46-58)	0,24
LDL-c (mg/dL)	87 (75-104)	85 (74-111)	0,92
TG (mg/dL)	65 (56-86)	90 (57-130)	0,10
Albuminúria (mg/g Cr)	6,0 (4,2-16,0)	6,2 (4,8-41,0)	0,48
eTFG (mL/min/1,73m^2)	105,4 (94,6 – 117,8)	95,6 (76,0 – 114,4)	0,09

Mediana (percentil 25 – percentil 75), Teste de Mann Whitney.
Abreviaturas: CT – colesterol total, eTFG – taxa de filtração glomerular estimada, HAS – hipertensão arterial sistêmica, HDL-c – HDL-colesterol, IMC – índice de massa corpórea, LDL-c – LDL-colesterol.

4.2. Proteômica da HDL

4.2.1. Avaliação descritiva geral da proteômica das subfrações da HDL

Os dados brutos da proteômica, advindos da MS, foram armazenados no *Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment* (MassIVE) com acesso via ftp://MSV000087986@massive.ucsd.edu e doi:10.25345/C5MP1C.

Foram selecionadas e quantificadas 45 proteínas presentes nas HDL_2 e HDL_3 dos 50 indivíduos com DM1 e dos 30 controles. A quantificação das proteínas foi expressa em escala logarítmica decimal (log10). Para fins didáticos e de forma simplificada, estas proteínas foram classificadas, de

acordo com sua principal função, baseado em classificações de estudos prévios (96,101,104). Um total de 18 proteínas está associado ao metabolismo lipídico (apo(a), apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoA-V, apoB, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV, apoD, apoE, apoF, apoM, CETP, LCAT, PCSK9 e PLTP), cinco proteínas à fase aguda inflamatória (SAA1, SAA4, HP, HPR e Orm1), uma proteína ao sistema complemento (C3), uma proteína antitrombótica (apoH), quatro proteínas antioxidantes (APMAP, apoJ/ CLU, PON1 e PON3), seis proteínas transportadoras (ALB, GC, IGFALS, RBP4, TF e TTR), cinco inibidores de protease (AHSG, AMBP, CST3, A1AT e VTN), duas enzimas não envolvidas com o metabolismo lipídico (GLPD1 e PCYOX) e outras três proteínas com outra função ou função ainda pouco conhecida (apoL1, A1BG e HBB) (**Tabela 6**).

Tabela 6: Proteínas selecionadas e quantificadas na proteômica da HDL_2 e HDL_3, divididas pela principal função.

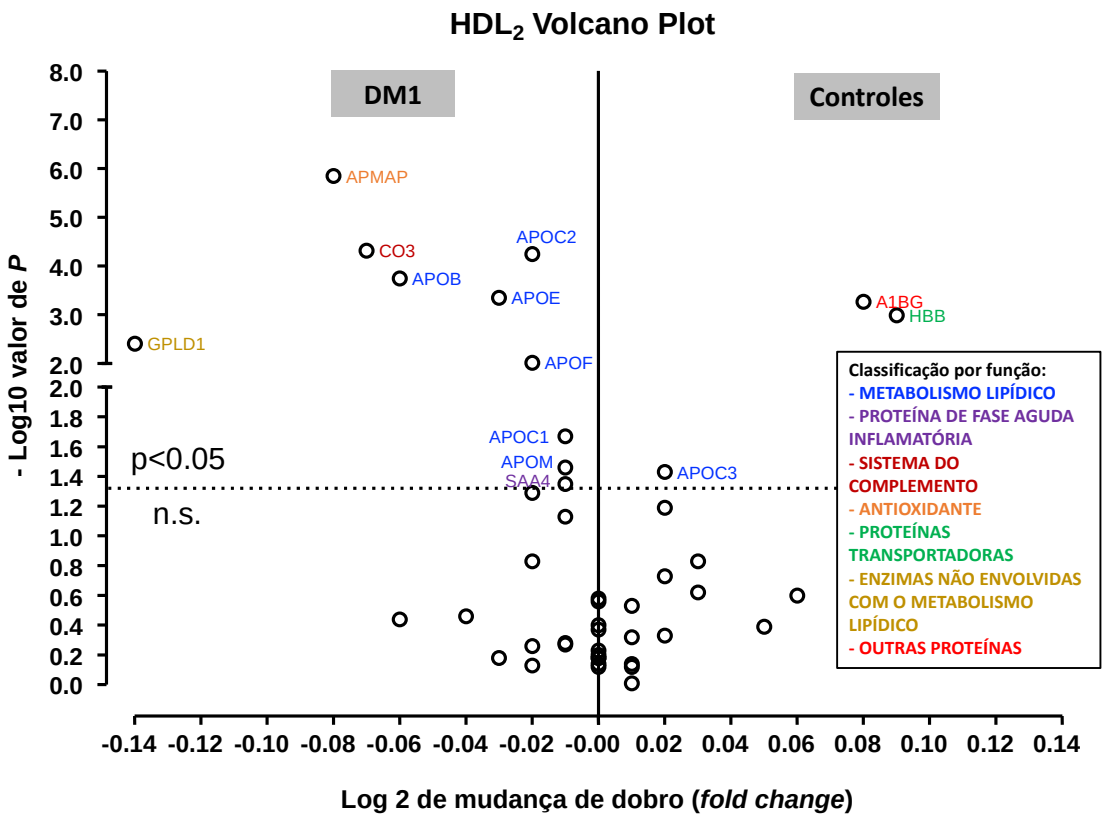
Abreviatura	Proteína	Gene
METABOLISMO LIPÍDICO		
Apo(a)	Apolipoproteína (a)	*LPA*
ApoA-I	Apolipoproteína A-I	*APOA1*
ApoA-II	Apolipoproteína A-II	*APOA2*
ApoA-IV	Apolipoproteína A-IV	*APOA4*
ApoA-V	Apolipoproteína A-V	*APOA5*
ApoB	Apolipoproteína B	*APOB*
ApoC-I	Apolipoproteína C-I	*APOC1*
Apo-C-II	Apolipoproteína C-II	*APOC2*
ApoC-III	Apolipoproteína C-III	*APOC3*
ApoC-IV	Apolipoproteína C-IV	*APOC4*
ApoD	Apolipoproteína D	*APOD*
ApoE	Apolipoproteína E	*APOE*
ApoF	Apolipoproteína F ou proteína inibidora da transferência de lípides	*APOF*
ApoM	Apolipoproteína M	*APOM*
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado	*CETP*
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase	*LCAT*
PCSK9	Pró-proteína convertase subtilisina-hexina tipo 9	*PCSK9*
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípides	*PLTP*

PROTEÍNA DE FASE AGUDA INFLAMATÓRIA		
SAA1	Amiloide A sérico tipo 1	*SAA1*
SAA4	Amiloide A sérico tipo 4	*SAA4*
HP	Haptoglobina	*HP*
HPR	Proteína relacionada à haptoglobina	*HPR*
Orm1	Alfa-1 glicoproteína ácida 1 ou orosomucoide	*ORM1*
VTN	Vitronectina	*VTN*
SISTEMA DO COMPLEMENTO		
C3	Complemento C3	*C3*
ANTITROMBÓTICO		
ApoH	Apolipoproteína H ou beta-2-glicoproteína 1	*APOH*
ANTIOXIDANTE		
APMAP	Proteína associada à membrana plasmática de adipócito	*APMAP*
ApoJ/ CLU	Clusterina, apolipoproteína J ou glicoproteína-2 sulfatada	*CLU*
Pon1	Paraoxonase-1	*PON1*
Pon3	Paraoxonase-3	*PON3*
PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS		
Alb	Albumina	*ALB*
GC	Proteína ligadora da vitamina D ou componente grupo específico	*GC*
HBB	Subunidade beta da hemoglobina	*HBB*
IGFALS	Subunidade ácido-lábil	*IGFALS*
RBP4	Proteína ligante de retinol tipo 4	*RBP4*
TF	Serotransferrina	*TF*
TTR	Transtirretina	*TTR*
INIBIDORES DE PROTEASE		
A1AT	Alfa-1-antitripsina	*SERPINA1*
AHSG	Glicoproteína alfa-2-Heremans-Schmid ou fetuína A	*AHSG*
AMBP	Precursor da alfa1-microglobulina e da bicunina	*AMBP*
CST3	Cistatina C	*CST3*
VTN	Vitronectina	*VTN*
ENZIMAS NÃO ENVOLVIDAS COM O METABOLISMO LIPÍDICO		
GPLD1	Fosfolipase D fosfatidilinositol-glicano-específica ou Fosfolipase D1 glicosilfosfatidilinositol-específica	*GPLD1*
PCYOX	Prenilcisteína oxidase 1	*PCYOX1*
OUTRAS PROTEÍNAS		
ApoL-I	**Apolipoproteína** L-I	*APOL1*
A1BG	Glicoproteína alfa-1B	*A1BG*

4.2.2. Avaliação da proteômica da HDL_2

A **Figura 2** mostra o gráfico de *Volcano Plot* com as diferenças entre as abundâncias das proteínas detectadas na HDL_2 entre indivíduos com DM1 e controles. Houve diferença entre indivíduos com DM1 e controles em 13 proteínas, sendo 10 (APMAP, apoB, apoC-I, apoC-II, apoE, apoF, apoM, complemento C3, GPLD1 e SAA4) mais abundantes em DM1 e três (A1BG, apoC-III e HBB) em controles. Os dados mais completos de todas as proteínas, a acurácia e a validação interna da análise estão nos **Anexos 2, 3 e 4**.

Figura 2: *Volcano Plot* indicando a diferença da abundância, em log_2, de proteínas detectadas na HDL_2 entre indivíduos com diabetes tipo 1 e controles e significância, em $-log_{10}$.



As proteínas estão representadas pelos nomes dos genes que as codificam.
Abreviaturas: APMAP, proteína associada a membrana plasmática de adipócito; A1BG, glicoproteína alfa-1B; CO3, complemento C3; GPLD1, fosfolipase D fosfatidilinositol-glicano-específica; HBB, subunidade beta da hemoglobina; SAA4, Amiloide A sérico tipo 4.

A **Figura 3** mostra a razão de chances com intervalo de confiança de 95% para associação da maior abundância de proteínas da HDL_2. O grupo DM1 esteve mais associado com a maior abundância de sete proteínas (C3, apoE, APMAP, apoC-II, apoB, GPLD-1 e PLTP). Já no grupo controle, a associação foi com quatro proteínas (A1BG, TTR, HBB e apoC-III).

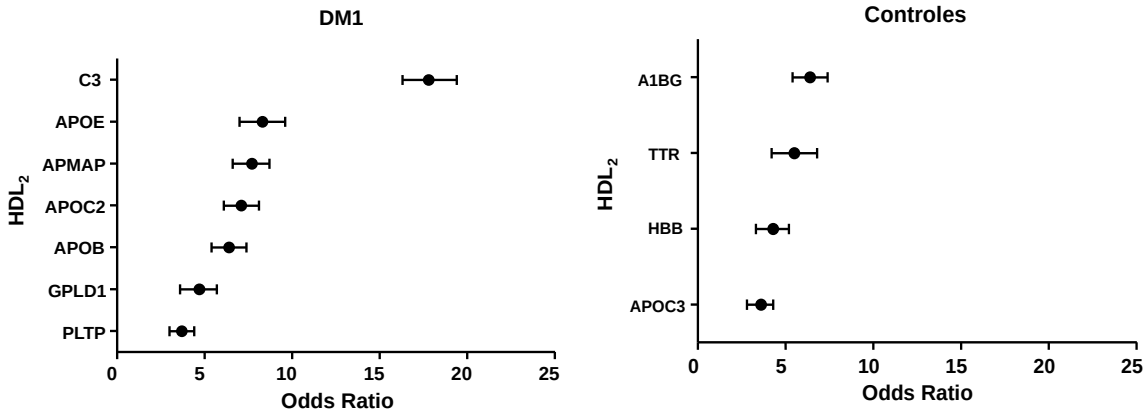


Figura 3: Razão de chances com intervalo de confiança de 95% para a associação de proteínas da HDL_2 com indivíduos com diabetes tipo 1 e controles.
As proteínas estão representadas pelos nomes dos genes que as codificam.
Abreviaturas: APMAP, proteína associada a membrana plasmática de adipócito; A1BG, glicoproteína alfa-1B; C3, complemento C3; DM1, diabetes *mellitus* tipo 1; GPLD1, fosfolipase D fosfatidilinositol-glicano-específica; HBB, subunidade beta da hemoglobina; PLTP, proteína de transferência de fosfolípides; TTR, transtirretina.

Os resultados da análise discriminante evidenciaram que seis proteínas (APMAP, apoC-II, apoC-III, C3, HBB e PLTP) tiveram capacidade discriminatória na proteômica da HDL_2 entre indivíduos com DM1 e os controles (**Anexo 5**).

4.2.3. Avaliação da proteômica da HDL_3

A **Figura 4** mostra o gráfico de *Volcano Plot* com as diferenças entre as abundâncias de proteínas detectadas na HDL_3 entre indivíduos com DM1 e controles. Um total de 33 peptídeos representando proteínas ligadas a HDL_3 foi diferente entre indivíduos com DM1 e controles, sendo que em 23 (APMAP, apoA-I, apoA-II, apoA-V, apoB, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV, apoD, apoE, apoL-I, apoM, CETP, GPLD1, HPHPR, PCSK9, PLTP, PON1, PON3, SAA1, SAA4 e TF) foram mais abundantes em DM1 e dez (A1BG, AHSG, Alb, apoF, apoH, CST3, GC, HBB, RBP4 e TTR), mais abundantes nos controles. Os

dados mais detalhados de todas as proteínas, a acurácia e a validação interna da análise estão nos **Anexos 5, 6 e 7**.

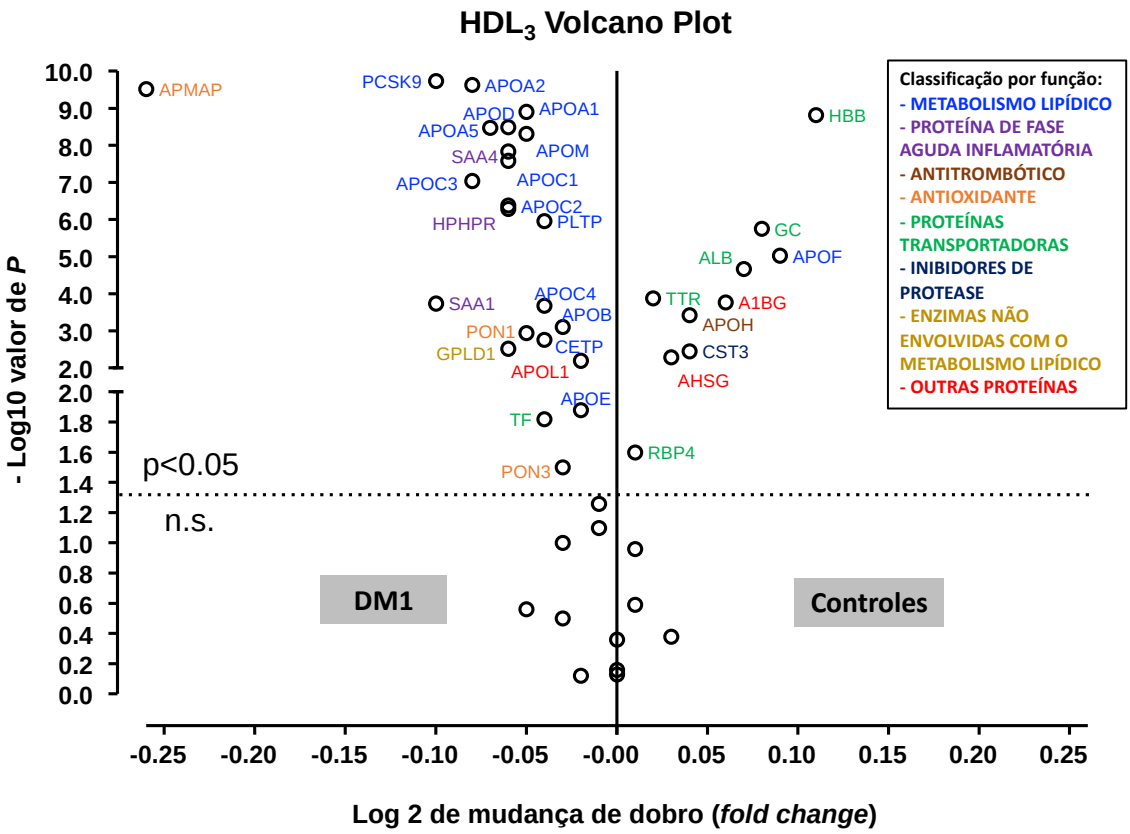


Figura 4: *Volcano Plot* indicando a diferença da abundância, em log_2, de proteínas detectadas na HDL_3 entre indivíduos com diabetes tipo 1 e controles e significância, em $-log_{10}$.

As proteínas estão representadas pelos nomes dos genes que as codificam.

Abreviaturas: AHSG, Glicoproteína alfa-2-Heremans-Schmid ou fetuína A; ALB, albumina; APMAP, proteína associada a membrana plasmática de adipócito; apoH, apolipoproteína H ou beta-2-glicoproteína 1; A1BG, Glicoproteína alfa-1B; CETP, Proteína de transferência de colesterol esterificado; CST3, cistatina C; DM1, diabetes *mellitus* tipo 1; GC, proteína ligadora da vitamina D ou componente grupo específico; GPLD1, fosfolipase D fosfatidilinositol-glicano-específica; HBB, subunidade beta da hemoglobina; HPHPR, haptoglobulina ou proteína relacionada a haptoglobina; PCSK9, pró-proteína convertase subtilisina-hexina tipo 9; PLTP, proteína de transferência de fosfolípides; PON1, paraoxonase-1; PON3, paraoxonase-3; RBP4, proteína ligante de retinol tipo 4; SAA1, Amiloide A sérico tipo 1; SAA4, Amiloide A sérico tipo 4; TF, transferrina; TTR, transtirretina.

A **Figura 5** mostra a razão de chances com intervalo de confiança de 95% para associação da maior abundância de proteínas da HDL_3 no grupo DM1 ou controles. O grupo DM1 estava mais associado com a maior abundância de 17 proteínas (apoM, apoC-I, apoC-III, SAA4, apoC-II, HPHPR, PLTP, PCSK9, GPLD1, SAA4, apoB, TF, CETP, apoA-I, apoC-IV, LCAT e APMAP). Já no

grupo controle, a associação foi com sete proteínas (HBB, Alb, apoF, GC, A1BG, apoH, CST3).

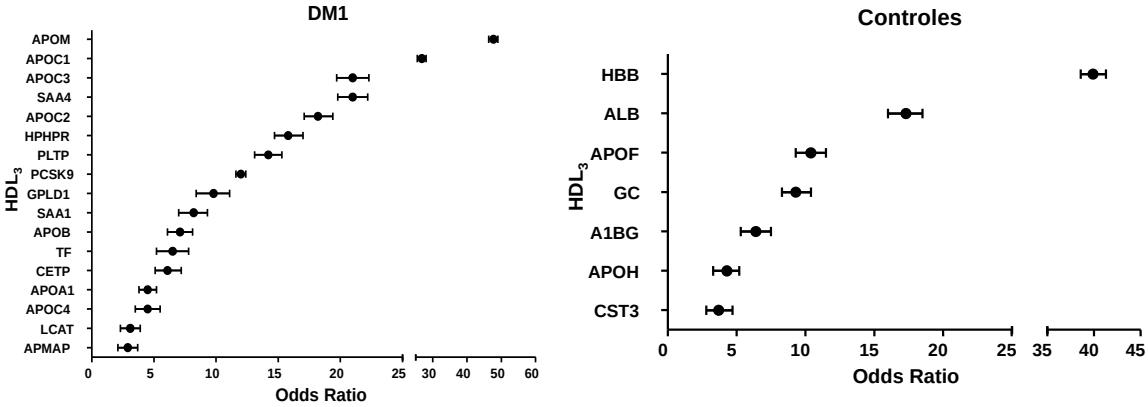


Figura 5: Razão de chances com intervalo de confiança de 95% para a associação de proteínas da HDL_3 com indivíduos com diabetes tipo 1 ou controles

As proteínas estão representadas pelos nomes dos genes que as codificam.

Abreviaturas: ALB, albumina; APMAP, proteína associada a membrana plasmática de adipócito; apoH, apolipoproteína H ou beta-2-glicoproteína 1; A1BG, glicoproteína alfa-1B; CETP, proteína de transferência de colesterol esterificado; CST3, cistatina C; GC, proteína ligadora da vitamina D ou componente grupo específico; GPLD1, fosfolipase D fosfatidilinositol-glicano-específica; HBB, subunidade beta da hemoglobina; HPHPR, haptoglobulina ou proteína relacionada a haptoglobina; LCAT, lecitina colesterol aciltransferase; PCSK9, pró-proteína convertase subtilisina-hexina tipo 9; PLTP, proteína de transferência de fosfolípides; SAA1, amiloide A sérico tipo 1; SAA4, amiloide A sérico tipo 4; TF, transferrina.

Os resultados da análise discriminante indicaram que apenas as proteínas apoA-I, HBB, APMAP, LCAT e PCSK9 tiveram capacidade discriminatória na proteômica da HDL_3 entre indivíduos com DM1 e os controles (**Anexo 9**).

4.3. HDL-colesterol e proteômica da HDL_2 e HDL_3

Testes de correlação foram realizados entre a concentração de HDL-c e as proteínas encontradas na proteômica da HDL_2 e HDL_3 (**Tabela 7)**. Para a HDL_2, houve correlação significante entre a abundância de cinco proteínas (negativas: apoB e Lp(a); positivas: PLTP, PON1 e A1AT) com a concentração de HDL-c em indivíduos com DM1 e de cinco proteínas (negativa: apoF; positivas: apoA-I, GPLD1, PLTP e PON1) no grupo controle. Somente duas proteínas tiveram correlação semelhante nos grupos DM1 e controle (PLTP, Pon1). Para a HDL_3, a abundância de três proteínas (C3, IGFALS e PON1,

todas positivas) se correlacionou significantemente com a concentração de HDL-c em indivíduos com DM1 e de oito proteínas (negativas: AMBP, apoF e apoH; positivas: C3, CLU, IGFALS, LCAT e PON1) no grupo controle. Somente duas proteínas tiveram correlação semelhante nos grupos DM1 e controle (C3 e IGFALS). A PON1 teve correlação boa no grupo controle, mas fraca no grupo DM1.

Tabela 7: Coeficientes de correlação de Pearson entre HDL-colesterol e proteínas encontradas nas HDL_2 e HDL_3 de indivíduos com diabetes tipo 1 e controles.

Proteínas	DM1 (n=50)	Controles (n=30)
Proteínas – HDL_2		
A1AT	0,280 (0,049)	
ApoA-I		0,409 (0,025)
ApoB	-0,323 (0,022)	
ApoF		-0,412 (0,024)
GPLD1		0,372 (0,043)
LPA	-0,310 (0,029)	
PLTP	0,336 (0,017)	0,483 (0,007)
PON1	0,375 (0,007)	0,390 (0,033)
Proteínas – HDL_3		
AMBP		-0,444 (0,014)
ApoF		-0,414 (0,023)
ApoH		-0,363 (0,049)
C3	0,408 (0,003)	0,441 (0,015)
CLU		0,426 (0,019)
IGFALS	0,452 (0,001)	0,401 (0,028)
LCAT		0,420 (0,021)
PON1	0,280 (0,049)	0,520 (0,003)

Teste de correlação de Pearson. Coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância (*P*).
Abreviaturas: A1AT, alfa-1-antitripsina; AMBP, precursor da alfa-1-microglobulina e da bicunina; C3, complemento C3; CLU, clusterina ou apolipoproteína J; GPLD1, fosfolipase D fosfatidilinositol-glicano-específica; IGFALS, subunidade ácido-lábil; LCAT, lecitina colesterol aciltransferase; LPA, apolipoproteína(a); PLTP, proteína de transferência de fosfolípides; PON1, paraoxonase-1; TTR, transtirretina.

4.4. Interferência de outras variáveis na proteômica da HDL em indivíduos com DM1

4.4.1. Hipertensão arterial

As diferenças da proteômica da HDL_2 e HDL_3 quanto à presença ou não de HAS estão resumidas na **Tabela 8**. Para a avaliação na HDL_2, quatro proteínas (A1BG, AMBP, Lp(a) e PCSK9) foram mais abundantes em indivíduos com HAS. Já na HDL_3, a AMBP, a apoH e a RBP4 foram mais abundantes em indivíduos com HAS e somente a ApoE mostrou-se menos abundante neste subgrupo.

Tabela 8: Comparação dos proteomas da HDL_2 e HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1 quanto à presença de hipertensão arterial.

Proteínas	HAS Ausente (n= 29)			HAS Presente (n=21)			Teste de Mann-Whitney
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	*P*
HDL_2							
A1BG	**6,47**	*6,18*	*6,75*	**6,78**	*6,54*	*7,00*	**0,008**
AMBP	**5,28**	*5,12*	*5,55*	**5,63**	*5,31*	*5,93*	**0,003**
Lp(a)	**8,33**	*8,06*	*8,60*	**8,70**	*8,40*	*8,83*	**0,013**
PCSK9	**6,70**	*6,31*	*6,81*	**6,99**	*6,68*	*7,15*	**0,013**
HDL_3							
AMBP	**7,78**	*7,44*	*8,06*	**8,08**	*7,89*	*8,30*	**0,016**
ApoE	**9,03**	*8,91*	*9,12*	**8,83**	*8,73*	*8,99*	**0,010**
ApoH	**8,34**	*8,11*	*8,53*	**8,51**	*8,33*	*8,69*	**0,036**
RBP4	**8,54**	*8,32*	*8,60*	**8,60**	*8,54*	*8,72*	**0,045**

Mediana e percentis 25 e 75 da abundância das proteínas, em log_{10}, Teste modificado de Wilcoxon.
Abreviaturas: AMBP, precursor da alfa-1-microglobulina e da bicunina; A1BG, glicoproteína alfa-1B; HAS, hipertensão arterial; Lp(a), apolipoproteína(a); PCSK9, pró-proteína convertase subtilisina-hexina tipo 9; RBP4, proteína ligante de retinol tipo 4.

4.4.2. Controle glicêmico

O controle glicêmico dos indivíduos com DM1 se associou com diferenças na abundância de várias proteínas na HDL_2 e HDL_3 (**Tabela 9**). A avaliação da proteômica da HDL_2 demonstrou que as proteínas APMAP, ApoB, ApoC-I, C3 e SAA4 foram mais abundantes em indivíduos com pior controle glicêmico (HbA1c $\geq$8,5%) e apenas a IGFALS foi menos abundante neste grupo. Na avaliação da proteômica da HDL_3, 12 proteínas (APMAP, apoA-I, apoA-II,

apoA-V, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoM, HPHPR, PCSK9 e SAA4) foram mais abundantes em indivíduos com pior controle glicêmico (HbA1c ≥8,5%) e oito proteínas (A1AT, A1BG, Alb, apoF, GC, HBB, RBP4, TTR) foram mais abundantes em indivíduos com melhor controle glicêmico (HbA1c <8,5%).

Tabela 9: Comparação dos proteomas da HDL_2 e HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1 quanto ao controle glicêmico.

	HbA1c		
Proteínas	**<8,5% (n=29)**	**≥8,5% (n=21)**	***P***
HbA1c (%)	5,7 (5,3-7,4)	9,5 (9,0-11,0)	0,000
HDL_2			
APMAP	7,62 (7,29-7,73)	7,93 (7,66-8,14)	0,002
ApoB	8,36 (8,04-8,54)	8,71 (8,42-8,97)	0,003
ApoC-I	9,96 (9,89-10,04)	10,07 (9,99-10,10)	0,044
C3	6,90 (6,69-7,14)	7,29 (6,90-7,53)	0,003
IGFALS	5,72 (5,16-6,62)	5,56 (4,73-5,96)	0,047
SAA4	9,23 (9,08-9,32)	9,34 (9,13-9,42)	0,041
HDL_3			
A1AT	10,12 (9,94-10,22)	9,97 (9,64-10,14)	0,007
A1BG	7,82 (7,61-8,02)	7,56 (7,37-7,86)	0,043
Alb	10,31 (10,05-10,63)	9,97 (9,73-10,28)	0,009
APMAP	7,21 (6,48-7,75)	7,79 (7,47-7,98)	0,000
ApoA-I	10,95 (10,64-11,06)	11,05 (10,96-11,12)	0,009
ApoA-II	9,81 (9,49-10,05)	10,10 (9,95-10,24)	0,000
ApoA-V	7,63 (7,40-7,80)	7,74 (7,62-7,88)	0,018
ApoC-I	9,55 (9,25-9,76)	9,64 (9,58-9,79)	0,035
ApoC-II	9,22 (8,86-9,35)	9,37 (9,22-9,45)	0,019
ApoC-III	9,51 (9,15-9,67)	9,68 (9,48-9,85)	0,008
ApoD	9,61 (9,40-9,85)	9,83 (9,65-9,91)	0,005
ApoF	9,33 (9,04-9,70)	9,07 (8,80-9,16)	0,016
ApoM	9,29 (9,15-9,49)	9,48 (9,41-9,54)	0,001
GC	8,17 (7,87-8,40)	7,66 (7,26-8,09)	0,007
HBB	7,61 (7,36-7,99)	7,36 (9,07-7,55)	0,002
HPHPR	7,80 (7,60-8,05)	8,02 (7,92-8,23)	0,019
PCSK9	7,31 (6,96-7,55)	7,46 (7,34-7,56)	0,015
RBP4	8,60 (8,50-8,74)	8,56 (8,26-8,60)	0,041
SAA4	8,97 (8,79-9,22)	9,22 (9,02-9,43)	0,001
TTR	9,05 (8,95-9,13)	8,86 (8,69-9,00)	0,001

Mediana e percentis 25 e 75 da abundância das proteínas, em log_{10}, Teste de Mann-Whitney. Abreviaturas: A1AT, alfa-1-antitripsina; A1BG, glicoproteína alfa-1B; Alb, albumina; APMAP, proteína associada à membrana plasmática de adipócito; C3, complemento C3; GC, proteína ligadora da vitamina D ou componente grupo específico; HBB, subunidade beta da hemoglobina; HPHPR, haptoglobulina ou proteína relacionada a haptoglobina; IGFALS, subunidade ácido-lábil; PCSK9, pró-proteína convertase subtilisina-hexina tipo 9; RBP4, proteína ligante de retinol tipo 4; SAA4, Amiloide A sérico tipo 4; TTR, transtirretina.

4.4.3. Uso de estatina

Em relação à categorização quanto ao uso de estatina, observou-se maior abundância de C3, HBB e LPA na HDL_2 e menor abundância da apoM, IGFALS e PON3 na HDL_3 (**Tabela 10**).

Tabela 10: Comparação dos proteomas da HDL_2 e HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1 quanto ao uso da estatina.

	Uso de estatina		
Proteínas	**Ausente (n=30)**	**Presente (n=20)**	***P***
HDL_2			
C3	6,93 (6,84-7,20)	7,29 (6,98-7,55)	0,022
HBB	6,09 (5,37-6,57)	6,65 (6,36-6,92)	0,004
Lp(a)	8,28 (7,97-8,49)	8,70 (8,53-8,91)	0,000
HDL_3			
ApoM	9,52 (9,44-9,60)	9,44 (9,36-9,48)	0,020
IGFALS	7,11 (6,80-7,29)	6,54 (6,19-7,08)	0,035
PON3	7,64 (7,40-7,82)	7,49 (7,28-7,56)	0,018

Mediana e percentis 25 e 75 da abundância das proteínas, em log_{10}, Teste de Mann-Whitney
Abreviaturas: C3, complemento C3; HBB, subunidade beta da hemoglobina; IGFALS, subunidade ácido-lábil ; Lp(a): apolipoproteína(a); PON3, paraoxonase-3.

4.4.4. Neuropatia autonômica cardiovascular

A presença da NAC esteve associada a maior abundância de AMBP, ApoB, Lp(a), Orm1 e TTR na HDL_2 e menor abundância da CLU, HBB e PON3 na HDL_3 de indivíduos com DM1 (**Tabela 11**).

Tabela 11: Comparação dos proteomas da HDL_2 e HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1 quanto à neuropatia autonômica cardiovascular.

	NAC		
Proteínas	**Ausente**	**Presente**	***P***
HDL_2			
AMBP	5,31 (5,16-5,62)	5,80 (5,43-6,10)	0,007
ApoB	8,42 (8,16-8,80)	8,69 (8,48-9,02)	0,048
Lp(a)	8,45 (7,98-8,68)	8,71 (8,36-8,91)	0,027
Orm1	5,57 (5,03-5,96)	5,94 (5,54-6,44)	0,034
TTR	7,67 (7,33-7,83)	7,82 (7,53-7,97)	0,044
HDL_3			
CLU	8,70 (8,47-8,78)	8,53 (8,44-8,64)	0,024
HBB	7,39 (7,29-7,50)	7,27 (7,09-7,47)	0,045
PON3	7,64 (7,51-7,80)	7,35 (7,28-7,49)	0,001

Mediana e percentis 25 e 75 da abundância das proteínas, em log_{10}, Teste de Mann-Whitney. Abreviaturas: AMBP, precursor da alfa-1-microglobulina e da bicunina; CLU - clusterina ou apolipoproteína J; HBB, subunidade beta da hemoglobina; LPA: apolipoproteína(a); NAC – neuropatia autonômica cardiovascular; Orm1 – alfa-1 glicoproteína ácida 1 ou orosomucoide; PON3, paraoxonase-3; TTR: transtirretina

4.5. Proteômica da HDL e risco cardiovascular estimado em indivíduos com DM1

Na avaliação de correlação entre os dados da proteômica da HDL_2 e o risco cardiovascular em dez anos, o A1BG teve correlação positiva fraca com o risco pelo QRISK3; o AMBP, correlação positiva fraca com ambos os riscos; e a apoE, correlação negativa fraca com ambos as calculadoras (**Tabela 12**).

Tabela 12: Correlação de risco cardiovascular em dez anos e dados da proteômica da HDL_2 em indivíduos com diabetes tipo 1.

Proteína	**Steno T1 Engine**	***P***	**QRISK3**	***P***
A1BG			r = 0,447	0,002
AMBP	r = 0,280	0,048	r = 0,365	0,012
ApoE	r = -0,357	0,011	r = -0,309	0,035

Teste de correlação de Pearson. Coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância (*P*). Abreviaturas: AMBP, precursor da alfa-1-microglobulina e da bicunina; A1BG, glicoproteína alfa-1B.

Com relação à proteômica da HDL_3, O risco cardiovascular em dez anos pelo *Steno T1 Engine* apresentou correlação positiva fraca com a AHSG, AMBP e apoH e negativa fraca com apoC-I, apoE, apoL-I e HPR. Já o risco

pelo QRISK teve correlação fraca e positiva com oito proteínas (A1BG, AHSG, ALB, AMBP, apoA-IV, apoH, RBP4 e TTR) e negativa fraca com quatro proteínas (apoC-I, apoE, apoL-I e apoM) (**Tabela 13**).

Tabela 13: Correlação de risco cardiovascular em dez anos e dados da proteômica da HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1.

Proteína	Steno T1 Engine	*P*	QRISK3	*P*
A1BG			0,341	0,019
AHSG	0,280	0,048	0,344	0,018
Alb			0,353	0,015
AMBP	0,430	0,002	0,483	0,001
ApoA-IV			0,338	0,02
ApoC-I	-0,408	0,003	-0,441	0,002
ApoE	-0,382	0,006	-0,462	0,001
ApoH	0,292	0,04	0,436	0,002
ApoL-I	-0,368	0,009	-0,446	0,002
ApoM			-0,342	0,019
HPR	-0,295	0,04		
RBP4			0,414	0,004
TTR			0,438	0,002

Teste de correlação de Pearson. Coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância (*P*).
Abreviaturas: AHSG, glicoproteína alfa-2-Heremans-Schmid ou fetuína A; Alb, albumina; AMBP, precursor da alfa-1-microglobulina e da bicunina; A1BG, glicoproteína alfa-1B; A2M, alfa-2-macroglobulina; HPR, proteína relacionada a haptoglobina; RBP4, proteína ligante de retinol tipo 4; TTR, transtirretina.

4.6. Avaliação da rigidez arterial - velocidade de onda de pulso carotídeo-femoral (VOP) e da função endotelial – dilatação mediada por fluxo (VMF)

4.6.1. Testes de função vascular em indivíduos com DM1 e controles

Um total de 30 indivíduos com DM1 e 30 controles realizaram testes de VOP e de VMF após hiperemia reativa. Somente o grupo DM1 foi submetido à etapa de uso do nitrato no teste de VMF.

Os indivíduos com DM1 apresentaram VOP carotídeo-femoral maior do que os controles ($P<0,01$). Na avaliação da função endotelial, não havia diferença de diâmetro basal da artéria braquial, mas a VMF após hiperemia reativa foi menor no grupo DM1 em comparação aos controles ($P = 0,047$) (**Tabela 14**).

Tabela 14: Função endotelial e rigidez arterial em indivíduos com diabetes tipo 1 e controles.

Teste de função vascular	DM1 (n=30)	Controles (n=30)	*P*
VOP (m/s)	7,7 (6,9 – 8,4)	6,7 (6,1 – 7,3)	0,008
Diâmetro da artéria braquial basal (mm)	3,77 (3,2-4,3)	3,72 (3,26 – 4,48)	0,781
VMF após hiperemia reativa (%)	2.69 (-0,07 – 8,59)	7,38 (2,68 – 9,69)	0,047
VMF após uso do nitrato (%)	18,42 (14,08-24,61)	-	

Mediana (percentil 25- percentil 75), Teste de Mann-Whitney.
Abreviaturas: DM1: diabetes tipo 1; VOP: velocidade de onda de pulso; VMF: vasodilatação mediada por fluxo

4.6.2. Testes de função vascular e fatores que interferem no risco cardiovascular em indivíduos com DM1

O controle glicêmico avaliado por meio da HbA1c, a HAS, o uso de estatina e a NAC foram avaliados quanto à sua interferência nos resultados dos testes vasculares. Não houve diferença dos resultados dos testes vasculares entre indivíduos com DM1 com melhor ou pior controle glicêmico, com base nos valores de HbA1c abaixo ou acima de 8,5% (**Tabela 15**).

Tabela 15: Efeito do controle glicêmico sobre os testes de função vascular dos indivíduos com diabetes tipo 1.

	HbA1c		
Variável	**<8,5%**	**≥8,5%**	***P***
HbA1c (%)	5,7 (5,3-7,4)	9,5 (9,0-11,0)	0,000
Teste de função vascular			
VOP (m/s)	7,0 (6,4-7,9)	7,8 (6,9-8,1)	0,307
VMF após hiperemia reativa (%)	5,0 (1,6-9,4)	1,8 (-0,3-10,5)	0,161
VMF após uso do nitrato (%)	19,9 (14,1-25,0)	17,6 (14,3-218,4)	0,207

Mediana (percentil 25- percentil 75), Teste de Mann-Whitney.
Abreviaturas: HbA1c – hemoglobina glicada, VOP - velocidade de onda de pulso; VMF - vasodilatação mediada por fluxo

Os indíviduos com DM1 e HAS apresentaram VOP maior do que aqueles sem HAS, mas não houve diferença quanto à VMF após hiperemia reativa e após uso do nitrato (**Tabela 16**). O mesmo padrão ocorreu com o uso de estatina (**Tabela 17**). Quanto à presença ou não de NAC, não foi encontrada diferença nos resultados dos testes vasculares (**Tabela 18**). A concentração de

HDL-c não teve associação com os testes de função vascular. Regressão linear multivariada foi realizada e demonstrou que nem a HAS e nem a dislipidemia, representada pelo uso da estatina, não foram variáveis independentes para rigidez arterial nesta casuística.

Tabela 16: Efeito da hipertensão arterial sobre os testes de função vascular dos indivíduos com diabetes tipo 1.

	Hipertensão arterial		
Teste de função vascular	**Ausente**	**Presente**	***P***
VOP (m/s)	7,2 (6,4-8,1)	8,6 (7,8-9,7)	0,002
VMF após hiperemia reativa (%)	2,0 (-0,3-7,4)	3,0 (0,9-11,7)	0,300
VMF após uso do nitrato (%)	19,4 (13,6-26,6)	18,0 (15,1-23,9)	0,788

Mediana (percentil 25- percentil 75), Teste de Mann-Whitney.
Abreviaturas: VOP - velocidade de onda de pulso; VMF - vasodilatação mediada por fluxo

Tabela 17: Uso de estatina e testes de função vascular dos indivíduos com diabetes tipo 1.

	Uso de estatina		
Teste de função vascular	**Ausente**	**Presente**	***P***
VOP (m/s)	7,0 (646-7,8)	8,4 (7,5-9,1)	0,004
VMF após hiperemia reativa (%)	2,8 (0,0-7,4)	1,5 (-0,3-10,0)	0,849
VMF após uso do nitrato (%)	19,4 (17,6-21,8)	16,0 (12,2-25,0)	0,542

Mediana (percentil 25- percentil 75), Teste de Mann-Whitney.
Abreviaturas: VOP - velocidade de onda de pulso; VMF - vasodilatação mediada por fluxo

Tabela 18: Neuropatia autonômica cardiovascular e testes de função vascular dos indivíduos com diabetes tipo 1.

	Neuropatia autonômica cardiovascular		
Teste de função vascular	**Ausente**	**Presente**	***P***
VOP (m/s)	7,4 (6,6-8,1)	8,2 (7,6-8,5)	0,196
VMF após hiperemia reativa (%)	2,6 (0,6-5,5)	8,6 (0,0-11,5)	0,428
VMF após uso do nitrato (%)	18,0 (12,6-21,8)	21,3 (16,8-25,0)	0,276

Mediana (percentil 25- percentil 75), Teste de Mann-Whitney.
Abreviaturas: VOP - velocidade de onda de pulso; VMF - vasodilatação mediada por fluxo

4.6.3. Testes de função vascular e risco cardiovascular estimado em indivíduos com DM1

Os testes de correlação entre os testes vasculares e o risco cardiovascular em dez anos estimado por duas ferramentas disponíveis (*Steno T1 Engine Risk* e QRISK3) evidenciaram correlação positiva entre a VOP e os riscos de ambas as ferramentas. Houve correlação moderada da VOP com a avaliação de risco cardiovascular pelo QRISK3 e fraca com o *Steno T1 Engine*. Não houve correlação da VMF com os riscos de ambas as calculadoras (**Tabela 19**).

Tabela 19: Correlação de risco cardiovascular em dez anos e testes de função vascular em indivíduos com diabetes tipo 1.

Teste de função vascular	Steno T1 Engine	*P*	QRISK3	*P*
VOP (m/s)	0,434	0,019	0,557	0,002
VMF após hiperemia reativa (%)	-0,204	0,279	-0,238	0,223

Teste de correlação de Pearson. Coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância (*P*).
Abreviaturas: VOP - velocidade de onda de pulso; VMF - vasodilatação mediada por fluxo

4.7. Testes de Função vascular e proteômica da HDL_2 e HDL_3 no grupo controle e DM1

Foi realizado teste de correlação entre os dados da proteômica da HDL_2 e HDL_3 e os testes vasculares de indivíduos com DM1 e controles (**Tabelas 20 e 21**).

Na avaliação da VOP e da proteômica da HDL_2 em DM1, a PCSK9 e a apoL-I tiveram correlação boa, sendo a primeira positiva e a segunda negativa. Cinco proteínas (A1BG, apoA-II, apoB, apo(a) e SAA4) tiveram correlação positiva fraca com o VOP, e apenas a CLU apresentou correlação negativa fraca. Quanto à variação da VMF após hiperemia reativa, a apoA-I e a PCYOX tiveram correlação positiva fraca. Após o uso do nitrato, a A1AT, apoA-IV, apoF, clusterina (CLU), PCSK9 e VTN tiveram correlação negativa fraca com a VMF, e somente a IGFALS apresentou correlação fraca e positiva (**Tabela 20**). No grupo controle, a HBB e Orm1 tiveram correlação negativa fraca com a VOP. Nenhuma proteína se correlacionou com os dados da VMF (**Tabela 21**).

Tabela 20: Correlação entre função vascular e proteômica da HDL_2 em indivíduos com diabetes tipo 1.

DM1 HDL_2		VOP	VMF após hiperemia reativa	VMF após uso do nitrato
A1AT	**r**			r = -0,47
	P			0,013
A1BG	**r**	r = 0,49		
	P	0,007		
ApoA-I	**r**		r = 0,41	
	P		0,023	
ApoA-II	**r**	r = 0,49		
	P	0,007		
ApoA-IV	**r**			r = -0,40
	P			0,038
ApoB	**r**	r = 0,41		
	P	0,027		
ApoF	**r**			r = -0,44
	P			0,023
ApoL-I	**r**	r = -0,60		
	P	0,001		
CLU	**r**	r = -0,39		r = -0,39
	P	0,038		0,042
IGFALS	**r**			r = 0,43
	p			0,026
Lp(a)	**r**	r = 0,46		
	P	0,013		
PCSK9	**r**	r = 0,51		r = -0,43
	P	0,005		0,027
PCYOX	**r**		r = 0,36	
	P		0,049	
SAA4	**r**	r = 0,43		
	P	0,020		
VTN	**r**			r = -0,39
	P			0,042

Correlação de Spearman, expressa em coeficiente de correlação (r). A significância da correlação é expressa em valor de *P*.

Abreviaturas: A1AT, alfa-1-antitripsina; A1BG, Glicoproteína alfa-1B; CLU, clusterina ou apolipoproteína J; DM1, diabetes tipo 1; IGFALS, subunidade ácido-lábil; LPA, apolipoproteína(a); PCSK9, pró-proteína convertase subtilisina-hexina tipo 9; PCYOX, prenilcisteína oxidase 1; SAA4, Amiloide A sérico tipo 4; VOP, velocidade de onda de pulso; VMF, vasodilatação mediada por fluxo

Tabela 21: Correlação entre função vascular e proteômica da HDL_2 em controles.

CONTROLES - HDL_2		VOP	VMF após hiperemia reativa	VMF após uso do nitrato
HBB	**r**	r = -0,378		
	P	0,039		
Orm1	**r**	r = -0,388		
	P	0,034		

Correlação de Spearman, expressa em coeficiente de correlação (r). A significância da correlação é expressa em valor de *P*.

Abreviaturas: HBB, subunidade beta da hemoglobina; ORM1, alfa-1 glicoproteína ácida; VOP, velocidade de onda de pulso; VMF, vasodilatação mediada por fluxo

Para a avaliação de correlação da VOP e dos dados da proteômica da HDL_3 nos indivíduos com DM1, a CLU teve correlação negativa boa. Um total de nove proteínas (A1AT, apoA-I, apoE, apoL-1, complemento C3, HBB, IGFALS, LCAT e PON1) teve correlação negativa fraca com o VOP. Quanto à variação da VMF após hiperemia reativa e após uso de nitrato, a GPLD1 teve correlação negativa fraca (**Tabela 22**).

No grupo controle, a apoC-IV, CETP, RBP4 tiveram correlação fraca com o VOP, sendo que a apoC-IV teve correlação negativa e as demais, positiva. A CETP também se correlacionou com VMF após a hiperemia reativa, com correlação negativa (**Tabela 23**). A avaliação de VMF após uso do nitrato não foi realizada em controles por ocasionar hipotensão arterial em indivíduos com a produção supostamente íntegra de NO.

Tabelas 22: Correlação entre função vascular e proteômica da HDL_3 em indivíduos com diabetes tipo 1.

DM1 - HDL_3		VOP	VMF após hiperemia reativa	VMF após uso do nitrato
A1AT	**r**	r = -0,38		
	P	0,044		
ApoA-I	**r**	r = -0,38		
	P	0,042		
ApoE	**r**	r = -0,40		
	P	0,032		
ApoL-I	**r**	r = -0,44		
	P	0,018		
C3	**r**	r = -0,48		
	P	0,009		
CLU	**r**	r = -0,51		
	P	0,005		
GPLD1	**r**		r = -0,42	
	P		0,021	
HBB	**r**	r = -0,38		
	P	0,044		
IGFALS	**r**	r = -0,47		
	P	0,011		
LCAT	**r**	r = -0,49		
	P	0,008		
PON1	**r**	r = -0,47		
	P	0,010		

Correlação de Spearman, expressa em coeficiente de correlação (r). A significância da correlação é expressa em valor de *p*.

Abreviaturas: A1AT, alfa-1-antitripsina; C3, complemento C3; CLU, clusterina ou apolipoproteína J; DM1, diabetes tipo 1; GPLD1, fosfolipase D fosfatidilinositol-glicano-específica; HBB, subunidade beta da hemoglobina; IGFALS, subunidade ácido-lábil; LCAT, lecitina colesterol aciltransferase; NR, não realizado; PON1, paraoxonase-1; VMF, vasodilatação mediada por fluxo; VOP, velocidade de onda de pulso.

Tabela 23: Correlação entre função vascular e proteômica da HDL_3 em controles.

CONTROLES - HDL_3		VOP	VMF após hiperemia reativa	VMF após uso do nitrato
ApoC-IV	r	r = -0,364		NR
	P	0,048		
CETP	r	r = 0,384	-0,374	NR
	P	0,036	0,046	
RBP4	r	r = 0,380		NR
	P	0,038		

Correlação de Spearman, expressa em coeficiente de correlação (r). A significância da correlação é expressa em valor de *p*.

Abreviaturas: CETP, Proteína de transferência de colesterol esterificado; RBP4, proteína ligante de retinol tipo 4; VMF, vasodilatação mediada por fluxo; VOP, velocidade de onda de pulso.

4.8. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos mediado pelas subfrações da HDL

Na avaliação caso-controle, foram avaliadas amostras de 44 indivíduos com DM1 e 28 controles não houve diferença de efluxo de ^{14}C-colesterol por 24 horas entre os indivíduos com DM1 e os controles, após a incubação tanto com a HDL_2 quanto com a HDL_3 (**Tabela 24**).

Tabela 24: Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos em indivíduos com diabetes tipo 1 e controles.

Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos	Diabetes tipo 1 n = 44	Controles n = 28	*P*
HDL_2	24,1 (18,0 – 30,2)	22,1 (18,5 – 25,7)	0,36
HDL_3	18,8 (14,8-24,4)	18,5 (16,1 – 22,6)	0,62

Mediana (percentil 25 – percentil 75), Teste de Mann Whitney.

Não houve correlação das variáveis clínicas, laboratoriais e dos resultados dos testes vasculares com a %EC tanto em indivíduos com DM1 quanto em controles, com exceção da albuminúria que teve correlação fraca e negativa (r = -0,339; *P* = 0,02) com a %EC pela HDL_2 em indivíduos com DM1 (**Anexos 10 e 11**).

Testes de correlação dos dados da proteômica da HDL_2 e HDL_3 com a %EC em indivíduos com DM1 e em controles foram realizados. Para os indivíduos com DM1, nenhuma proteína da HDL_2 teve correlação com a %EC. Quanto à HDL_3, três proteínas se correlacionaram negativamente com a %EC: A1AT (r = -0,332; *P* = 0,026), GC (r = -0,321; *P* = 0,031) e TF (r = -0,311; *P* = 0,037). No grupo controle, somente a proteína RBP4 na HDL_2 teve correlação com a %EC (r = 0,46; *P* = 0,015). Quanto às proteínas da HDL_3, oito se correlacionaram negativamente com a %EC: A1BG (r = -0,414; *P* = 0,026), AHSG (r = -0,481; *P* = 0,008), apoF (r = -0,461; *P* = 0,012), apoH (r = -0,458; *P* = 0,012), CST3 (r = -0,378; *P* = 0,043), GC (r = -0,46; *P* = 0,012), RBP4 (r = -0,434; *P* = 0,019) e TTR (r = -0,596; P = 0,001).

5. DISCUSSÃO

As HDL são inversamente associadas ao risco cardiovascular, embora as métricas clássicas utilizadas na prática clínica, como determinação da concentração de HDL-c e apoA-I, possam não refletir sua ampla gama de ações que protegem contra a aterosclerose. Modificações químicas da HDL e no conteúdo de proteínas e subespécies lipídicas transportadas por estas lipoproteínas podem modular sua funcionalidade. No presente estudo avaliou-se a proteômica das subfrações da HDL_2 e HDL_3 em indivíduos portadores de DM1 e controles não portadores de DM e sua associação com marcadores de risco cardiovascular e capacidade de remover colesterol de macrófagos.

Os resultados evidenciaram concentração de HDL-c semelhante e menores concentrações de TG, LDL-c e de colesterol total em DM1, comparados aos controles. Apesar de o perfil lipídico do grupo DM1 parecer mais favorável para risco de DCV, os marcadores de aterosclerose subclínica, como maior rigidez arterial e menor vasodilatação mediada por NO, foram mais proeminentes nestes indivíduos.

A casuística do presente estudo foi, predominantemente, de adultos jovens com mediana de idade de 34 anos. A maioria dos estudos que avaliou rigidez arterial em DM foi conduzida em indivíduos com DM2. Os estudos que avaliaram a rigidez arterial em indivíduos com DM1 foram realizados principalmente em crianças, com resultados e métodos distintos de avaliação (42,44,143). Os resultados relativos à rigidez arterial obtidos neste estudo corroboram os outros estudos realizados com indivíduos com idades semelhantes a da presente casuística, o qual evidenciou associação de maior VOP com biomarcadores inflamatórios em DM1 (56).

Os achados de VOP e VMF após hiperemia reativa estão de acordo com os resultados de uma meta-análise (144), indicando maior risco cardiovascular dos indivíduos com DM1. A concomitância de outros fatores de risco cardiovascular, como a HAS e a dislipidemia, associou-se a maior rigidez arterial, mas não à disfunção endotelial. O pior controle glicêmico, representado pela HbA1c $\geq$8,5%, foi associado a maior prevalência de retinopatia e maior

albuminúria, mas com mediana dentro do valor de normalidade. No entanto, não se associou a piores resultados nos testes vasculares. Cabe aqui reforçar que o atual estudo é transversal e a HbA1c representa a média glicêmica dos últimos três meses.

As ferramentas mais utilizadas de estimativa de risco cardiovascular na prática clínica, como o escore de risco global de Framingham e a calculadora de risco do *American College of Cardiology/ American Heart Association*, foram desenvolvidas para a população geral. Foram utilizadas duas ferrramentas que possibilitam, de forma mais específica, a avaliação de risco cardiovascular em indivíduos com DM1 e estas indicaram correlação significativa de maior risco cardiovascular em dez anos com maior rigidez arterial e com menor VMF. Um estudo havia indicado correlação entre a VOP com o risco cardiovascular calculado pela *Steno T1 Engine* (145). Estudos longitudinais são necessários para avaliar a relação entre o VOP e eventos cardiovasculares em indivíduos com DM1.

No estudo de Liatis e cols (2011), demonstrou-se associação da função autonômica cardiovascular, especialmente a atividade parassimpática, com a rigidez arterial de indivíduos com DM1 (146). Na presente casuística, não se evidenciou associação de NAC com os resultados dos testes vasculares.

A dislipidemia é um importante e bem conhecido fator de risco cardiovascular, mas, na maioria dos casos, o perfil lipídico (HDL-c, LDL-c e trigliceridemia) dos indivíduos com DM1 não apresenta grandes alterações quantitativas. A insulina é o principal modulador fisiológico do metabolismo lipídico nos compartimentos plasmático e tecidual, pois modula a expressão de vários genes e a atividade de enzimas que metabolizam TG e ácidos graxos. A insulinoterapia é o principal tratamento em DM1 e, ao estimular a síntese e a atividade da LPL, favorece a redução da trigliceridemia e a elevação do HDL-c. Sabe-se que o aumento do HDL-c é um fator protetor contra a aterosclerose. No entanto, há evidências que os indivíduos com DM1 apresentam maior risco de eventos cardiovasculares mesmo com a concentração de HDL-c dentro ou acima dos valores de referência (29,147). Neste estudo, a concentração de HDL-c não se associou às variáveis dos testes vasculares. Isto reforça a hipótese de que nos indivíduos com DM1, a menor proteção conferida pela

HDL contra eventos cardiovasculares seja mais relacionada a uma HDL disfuncional do que à quantidade de colesterol na HDL.

O presente estudo é inovador pela análise individualizada da proteômica das subfrações HDL_2 e HDL_3, incluindo a maior casuística de proteômica da HDL em um estudo caso-controle envolvendo DM1. Os dados brutos da proteômica, advindos da MS, foram armazenados no *Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment* (MassIVE), que é um banco de dados unificado, desenvolvido pelo *Center for Computational Mass Spectrometry* (Universidade da Califórnia – San Diego, EUA) para promover o intercâmbio livre e global de dados de espectrometria de massa (148). A **Tabela 25** compara os resultados obtidos de proteômica da HDL com outros dois estudos. Foram selecionados peptídeos que representam 45 proteínas na HDL_2 e HDL_3 para quantificação por espectometria de massa. Destes, 13 mostraram diferença da abundância na HDL_2 e 33 na HDL_3 entre o grupo DM1 e o controle.

Tabela 25: Comparação de dados de abundância das proteínas na proteômica da HDL_2 e HDL_3 do presente estudo com outros estudos caso-controle em diabetes tipo 1.

Estudo	Presente Estudo	Gourgari e cols (149)	Oliveira e cols (150)
Ano de publicação		2019	2018
N (DM1 vs C)	50 vs 30	26 vs 12	30 vs 30
Idade (anos) – Grupo DM1	36,9±10,0	16,9±1,9	33,3±9,8
Duração do DM (anos)	23,7±10,7	2,9±1,1	15,6±10,5
Método quantitativo de proteômica	PRM	SWATH/MS	SWATH/MS
Alb	HDL_3: Maior em controles	Maior em controles	
AMBP	HDL_3: Maior em DM1		Maior em DM1
ApoA-II	HDL_3: Maior em DM1		Maior em DM1
ApoA-IV	HDL_2 e HDL_3: NS	Maior em DM1	
ApoH	HDL_3: Maior em controles		Maior em DM1
A1BG	HDL_2 e HDL_3: Maior em controles	Maior em DM1	
C3	HDL_2: Maior em DM1	Maior em controles	

Estudo	Presente Estudo	Gourgari e cols (149)	Oliveira e cols (150)
Outras proteínas mais abundantes em DM1	HDL_2: APMAP, apoB, apoC-I, apoC-II, apoE, apoF, apoM, GPLD1 e SAA4 HDL_3: APMAP, apoA-I, apoA-V, apoB, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoC-IV, apoD, apoE, apoL-I, apoM, CETP, GPLD1, HPHPR, PCSK9, PLTP, PON1, PON3, SAA1, SAA4, TF	CFAH, FHR2, PGRP2, ITIH4	A2M, IGHA2, THRB*
Outras proteínas mais abundantes em controles	HDL_2: apoC-III e HBB HDL_3: AHSG, apoF, CST3, GC, HBB, RBP4 e TTR		C4, PZP

Abreviaturas: A1BG, Glicoproteína alfa-1B; A2M, alfa-2-macroglobulina; AHSG, Glicoproteína alfa-2-Heremans-Schmid ou fetuína A; Alb, albumina; AMBP, precursor da alfa1-microglobulina e da bicunina; APMAP, proteína associada a membrana plasmática de adipócito; apoH, apolipoproteína H ou beta-2-glicoproteína 1;C, controles; CETP, Proteína de transferência de colesterol esterificado ; CFAH: fator H do complemento; C3, complemento C3; C4, complemento C4; DM1, diabetes *mellitus* tipo 1; FHR2, proteína 2 relacionada ao fator H do complemento; GPLD1, fosfolipase D fosfatidilinositol-glicano-específica; HBB, subunidade beta da hemoglobina; HPHPR, haptoglobulina ou proteína relacionada a haptoglobina; IGHA2, cadeia pesada da imunoglobulina alfa-2; ITIH4, cadeia pesada H4 do inibidor inter-alfa-tripsina; LCAT, lecitina colesterol aciltransferase; ND, não disponível; NS, não significativo; PCSK9, pró-proteína convertase subtilisina-hexina tipo 9; PGRP2, peptídeo-2 de reconhecimento de peptideoglicano; PLTP, proteína de transferência de fosfolípides; PON1, paraoxonase-1; PON3, paraoxonase-3; PRM, monitoramento de reações em paralelo; PZP, proteína zona de gravidez; RBP4, proteína ligante de retinol tipo 4; SAA1, amiloide A sérico tipo 1; SAA4, amiloide A sérico tipo 4; SWATH/MS, *sequential window acquisition of all theoretical mass spectra*; TF, transferrina; THRB, protrombina*; TTR, transtirretina; VTN, vitronectina.
* No estudo de Oliveira e cols, a sigla THRB foi caracterizada como sendo a protrombina, mas esta abreviatura normalmente é utilizada para o gene da subunidade beta do receptor do hormônio tireoidiano.

Os outros dois estudos caso-controle mostrados na **Tabela 25** não realizaram separadamente a proteômica da HDL_2 e HDL_3. Nove proteínas na HDL_2 e 22 proteínas na HDL_3 foram encontradas, cuja diferença em abundância entre os dois grupos não foi encontrada nos dois estudos. As proteínas AMBP, Alb e apoA-II tiveram dados concordantes com, pelo menos, um outro estudo. As proteínas apoA-IV, apoH, A1BG e C3 também foram encontradas em pelo menos um dos dois estudos e tiveram diferença significante entre os grupos, mas o resultado não foi concordante quanto ao grupo com maior abundância.

Um estudo de Manjunatha e cols (2016) avaliou a proteômica da HDL e modificações pós-traducionais em indivíduos com DM1 bem controlados (HbA1c ≤ 7,0%) e mal controlados (HbA1c ≥8,5%), em comparação a

indivíduos controles sem DM, pareados por idade, sexo e IMC. O HDL-c foi semelhante em todos os grupos. Um total de 21 proteínas apresentou expressão significantemente diferente em DM1 mal controlados e 25 proteínas, em DM1 bem controlados, em comparação aos controles. O grupo DM1 mal controlado teve maior expressão de dez proteínas (cininogênio-1, KNG1; alfa2-antiplasmina, SERF2; apoM; calicreína; complemento C2, C2; zinco-alfa-2-glicoproteína, ZAG; apoA-IV; ITIH3; A2M; receptor da toxina do antrax, ATR) e menor, de 11 proteínas (fator ativador de crescimento de hepatócito, HGF; globulina ligadora de hormônio sexual, SHBG; TTR; GPLD1; monofosfatase 3 de inositol; proteína 1 relacionada ao fator H do complemento, FHR1; RBP4; AHSG; fator derivado de epitélio pigmentado, PEDF; polipeptídeo da imunoglobulina lambda-símile; SAA2). O grupo DM1 bem controlado apresentou dez proteínas (cadeias beta e gama do componente C8 do complemento; fibulina-1; ATR; APMAP; ITIH3; *BPI fold-containing family*; proteína relacionada a angiopoetina; integrina alfa M; proteína 2B do domínio de dedo de zinco) com maior expressão e 15 proteínas (molécula de adesão celular-1 da adressina da mucosa; angiotensinogênio, AGT; N-carboxipeptidase; GPLD1; haptoglobina, HP; apoC1; RBP4; afamina; proteína ligadora de vitamina D, GC; proteína relacionada ao fator H do complemento; HPX; fator H do complemento; ITH2; KNG1 e anquirina), com menor expressão (98). No presente estudo, a comparação não foi realizada desta forma; além da análise do estudo caso-controle, foram comparados os indivíduos com DM1 com HbA1c <8,5% e ≥8,5%. Apesar de não ser a melhor comparação daquele estudo com o presente estudo, utilizando-se a análise do grupo DM1 vs controles, somente cinco proteínas tiveram uma maior semelhança no comportamento da abundância: AHSG, APMAP, apoM, GC e RBP4. No estudo de Manjunatha e cols (2016), quanto às modificações pós-traducionais das proteínas, o grupo com DM1 mal controlado apresentou maior abundância de proteínas com modificação de Amadori. Algumas proteínas específicas apresentavam alteração de oxidação ou deaminação (98), o que não foi avaliado na presente investigação.

Na **Tabela 6**, para fins didáticos, as proteínas foram apresentadas simplificadamente, de acordo com suas principais funções. A grande maioria

das proteínas encontradas nas HDL estava relacionada ao metabolismo lipídico, especialmente ao TRC.

As apoA-I e apoA-II são as principais apolipoproteínas estruturais da HDL. A apoA-I participa da formação da HDL, com a captação de colesterol e fosfolípides na formação da pré-beta-HDL; na ativação da LCAT; e no efluxo do colesterol (151). A apoA-II modula a atividade de LCAT, CETP e lipase hepática. Ambas as proteínas foram mais abundantes em DM1 do que controles e em indivíduos com DM1 com pior controle glicêmico. As quantidades de apoA-I na HDL_2 e HDL_3 se correlacionaram com melhores resultados nos testes vasculares no grupo DM1, sugerindo que o aumento da quantidade de apoA-I possa ser um fator protetor compensatório ao processo de aterosclerose.

A PLTP é responsável pelo remodelamento da HDL, transferindo fosfolípides de lipoproteínas ricas em TG para a HDL e mediando a interconversão da HDL_2 e HDL_3. Elevada atividade da PLTP foi relatada em portadores de DM1, e parece que essa atividade contribui para concentrações mais altas de apoA-I (152). Isto pode explicar ambas as proteínas (PLTP e apoA-I) serem mais abundantes na HDL_3 em DM1. Além disso, a análise discriminante demonstrou que a PLTP na HDL_2 e a apo-A-I na HDL_3 foram capazes de diferenciar os indivíduos com DM1 e os controles.

A apoA-V tem papel no metabolismo de lípides, especialmente relacionada a lipoproteínas ricas em TG, por intermédio da ativação da LPL (153). Em DM2, a apoA-V vem sendo correlacionada positivamente com as concentrações de TG (153,154), mas não há dados em DM1. Evidenciou-se no presente estudo maior abundância da apoA-V em DM1 em comparação aos controles, com maior quantidade em indivíduos com DM1 e pior controle glicêmico.

A apoB foi mais abundante tanto na HDL_2 quanto na HDL_3 do grupo DM1. A apoB não está habitualmente presente na HDL. As presenças de apoB e também da apo(a) na HDL provavelmente resultam da contaminação durante o processo de isolamento, uma vez que há sobreposição de parte das densidades da lipoproteína A e da HDL (155).

A apoC-I está envolvida no metabolismo de TG, afetando o metabolismo de VLDL, por inibir a ligação da VLDL aos receptores de VLDL, LDL, além de reduzir a atividade da LPL e estimular a produção de VLDL (156). Tanto em indivíduos com DM1 quanto DM2, a trigliceridemia está associada com a concentração sérica de apoC-I (156,157). A apoC-I também ativa a LCAT, mas apresenta 25% da capacidade da apoA-I para esta função (158). Evidenciou-se que a apoC-I foi mais abundante na HDL_2 e na HDL_3 de indivíduos com DM1 e também em indivíduos com DM1 e pior controle glicêmico; no entanto, houve correlação negativa com os riscos cardiovasculares da *Steno T1 Engine* e QRISK3.

A apoC-II é cofator para a ativação da LPL, responsável pela hidrólise de TG de quilomícrons e da VLDL (159). No entanto, alguns fatores como idade, sexo, dieta e DM2 podem aumentar consideravelmente as concentrações desta apolipoproteína (160). De fato, hipoalfalipoproteinemia (baixas concentrações de HDL-c e apoA-I) em portadores de DM2 tratados com fenofibrato e rosiglitazona cursaram com aumento de apoC-II na HDL. Parece que a lipólise intravascular de TG em indivíduos com DM se torna disfuncional, causando hipertrigliceridemia (161). Isto pode prejudicar a formação das partículas de HDL (nascente e madura), uma vez que parte significante de sua superfície é derivada desse processo de hidrólise das lipoproteínas ricas em TG (162). Concentrações séricas normais ou pouco aumentadas de apoC-II ativam a LPL. No entanto, concentrações muito aumentadas inibem a LPL (163). A associação de apoC-II e DCV ainda carece de estudos, especialmente prospectivos (163). Os estudos em DM concentram-se em DM2, em DM1, os estudos com apoC-II são inexistentes.

A apoC-III inibe a LPL (161) e está sendo estudada como uma proteína que possa modular a função da HDL. Está associada a fatores de risco metabólicos, como DM e obesidade (88) e ao maior risco cardiovascular (88), inclusive em DM1 (164). Normalmente, a proporção de apoC-III:apoC-II é de 2:1 no plasma (160). Altas doses de insulina suprimem a expressão do gene *APOC3* em camundongos com DM induzido por estreptozotocina e a deficiência de insulina eleva a concentração sérica de apoC-III (164). No presente estudo, evidenciou-se maior abundância de apoC-II e apoC-III na

HDL_3 do grupo DM1, em comparação aos controles. Na HDL_2 do grupo DM1, a apoC-II foi mais abundante e a apoC-III, menos do que nos controles. Além disso, os indivíduos com DM1 e pior controle glicêmico tiveram maior quantidade de apoC-III na HDL_3.

A apoC-IV está associada principalmente com as partículas de VLDL e, em menor quantidade, com a HDL (165). A função da apoC-IV ainda não é bem conhecida, mas provavelmente está envolvida no metabolismo de TG (165). O estudo de Xu e cols (2015) avaliou indivíduos de uma região da China e demonstrou que polimorfismos do gene *APOC4* estão associados com doença coronariana precoce (166). Outro estudo está sendo realizado na Universidade de Washington (EUA) sobre o papel da apoC-IV em complicações cardiovasculares em DM1 (167). Von Toerne e cols (2017) evidenciaram que a apoC-IV foi suficiente para discriminar crianças com DM1 com autoanticorpos anti-ilhota positivo e negativo. Este estudo demonstrou menor abundância de apoC-IV em crianças com DM1 e autoanticorpos positivos (168). Maior abundância da apoC-IV na HDL_3 de DM1 e correlação negativa com rigidez arterial foram observados na presente investigação.

A apoD está envolvida com o TRC, estabilizando a atividade da LCAT; também desempenha atividade antioxidante da HDL, e se encontra associada à apoA-II em humanos (98,169,170). A apoD também está relacionada à aterogênese; estudo com imuno-histoquímica demonstrou deposição de apoD em placas ateromatosas. Uma possível explicação é uma resposta compensatória da apoD para facilitar a remoção de colesterol dos tecidos periféricos e, portanto, redução da aterosclerose (170). Altas concentrações plasmáticas também foram encontradas em indivíduos com insuficiência cardíaca (171). A apoD foi mais abundante na HDL_3 do grupo DM1 do que na dos controles e apresentou abundância naqueles com pior controle glicêmico.

A apoE está envolvida na homeostase das lipoproteínas e dos lípides no cérebro, parede arterial, tecido adiposo e macrófagos. A apoE, assim como a apoA-I, interage com o ABCA1 para gerar as partículas nascentes de HDL. Também está envolvida com outras funções não relacionadas ao metabolismo lipídico, tais como função anti-inflamatória e antioxidante. A apoE está associada a uma atividade ateroprotetora por promover o efluxo de colesterol

dos macrófagos ricos em lípides na parede arterial (172). Em geral, partículas de HDL contendo apoE são maiores e a diminuição do conteúdo de apoE na HDL pode ter um efeito pró-aterogênico, devido ao fato de a HDL rica em apoE prevenir a ligação da LDL aos proteoglicanos da parede vascular (29). Um estudo em camundongos *knockout* para o gene *APOE* evidenciou que a VOP e a VMF mediada por NO estão alteradas, em comparação aos controles (173). Na presente investigação, evidenciou-se correlação negativa entre apoE na HDL_3 e a VOP, corroborando a ação ateroprotetora desta apolipoproteína. Um estudo de proteômica de HDL evidenciou maior abundância de apoE na HDL_3 de indivíduos com DCV instalada do que em controles saudáveis. Os autores sugeriram a possibilidade de redistribuição de apoE da HDL_2 para HDL_3 levando ao prejuízo do efluxo de colesterol e maior formação de células espumosas (101). No presente estudo, a apoE foi mais abundante tanto nas HDL_2 quanto nas HDL_3 de indivíduos com DM1, em comparação as dos controles.

A apoF ou proteína inibidora da transferência de lípides interfere na capacidade da CETP em remodelar as lipoproteínas (174,175), inibindo especialmente as transferências envolvendo a LDL (175). A maioria da apoF está ligada à HDL, mas em hipercolesterolemia, a presença na LDL aumenta. A apoF pode ter funções ainda não conhecidas e não relacionadas à CETP, pois em animais que não expressam CETP, a apoF está presente no plasma (175). Na presente casuística, observou-se que a apoF foi mais abundante na HDL_2 e HDL_3 do grupo DM1 em comparação aos controles. Sendo assim, mais estudos são necessários para explicar estes achados.

A apoM é uma apolipoproteína encontrada principalmente na HDL e mais especificamente nas HDL menos densas (108). A apoM tem papel na formação e no tamanho da pré-beta HDL (176). Isto é evidenciado quando se faz o silenciamento do gene *APOM*, que cursa com diminuição do HDL-c em 25% e menor quantidade de apoA-I, resultando em menor síntese de pré-beta HDL (177). Credita-se à apoM também um papel na maturação da HDL, na mediação do TRC e nas atividades antioxidante e anti-inflamatória (108,178,179). A apoM é carreadora da esfingosina 1-fosfato (S1P), que está relacionada à atividade vasodilatadora da HDL. A S1P promove vasodilatação

arterial por estimular a formação de NO endotelial (29). Não foi observada correlação entre a apoM e a VMF dependente de endotélio no presente estudo. O estudo de Frej e cols (2017) demonstrou que embora as concentrações plasmáticas de apoM e S1P sejam semelhantes entre indivíduos com DM1 e controles e a presença destas proteínas ocorra mais na HDL_2 do que na HDL_3, o complexo apoM/ S1P na HDL_2 é mais ineficiente em sua capacidade anti-inflamatória (108). Os achados da investigação atual evidenciaram maior abundância de apoM na HDL_2 e menor na HDL_3 no grupo DM1, em comparação aos controles. Além disso, observou-se que a apoM foi mais abundante na HDL_3 de indivíduos com DM1 com pior controle glicêmico. Um estudo de Zhang e cols (2007) com camundongos evidenciou que a hiperglicemia causava redução da expressão de apoM *in vivo* e *in vitro* (180), embora o modelo animal utilizado tenha sido o de DM2. Outro estudo com camundongos com DM induzido por estreptozotocina observou aumento das concentrações plasmáticas de apoM e da S1P (181). A concentração sérica da apoM em indivíduos com DM MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) tipo 3 é semelhante à daqueles com DM2, mas é menor do que em DM1 (182). Todas as evidências de que a concentração sérica de apoM difere entre os tipos de DM tornaram a apoM um potencial marcador de diferenciação entre DM MODY 3, que é uma forma de DM monogênico em que há mutação do gene *HNF-1-alfa* (fator nuclear do hepatócito tipo 1-alfa), e DM1 (179,182). Um estudo de von Toerne e cols (2017) demonstrou que a apoM, assim como a apoC-IV (descrita anteriormente), foram suficientes para discriminar crianças com DM1 com autoanticorpo anti-ilhota positivo e negativo. Naquele estudo, houve maior abundância de apoM com a positividade dos autoanticorpos (168). O gene *APOM* está localizado dentro da região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) III e, assim, adventa-se um papel da apoM na patogênese do DM1 (183). Os achados do presente estudo demonstraram que o uso de estatina foi associado a menor abundância de apoM na HDL_3 do grupo DM1. Outro estudo da equipe de Zhang (2011) evidenciou que a sinvastatina em ratos hiperlipidêmicos não teve efeito sobre a concentração sérica de apoM (184). No entanto, o modelo animal não era o de DM1.

A CETP é uma glicoproteína associada principalmente à HDL, intermediando a troca de colesterol esterificado por TG entre as lipoproteínas que contêm apoB e as HDL, principalmente (30,94). Desta forma, VLDL e LDL enriquecidas em colesterol esterificado podem ser removidas pelo fígado, na via indireta do TRC. Além disso, a CETP, juntamente com a lipase hepática, é responsável pela troca de TG e ésteres de colesterol entre a LDL e outras lipoproteínas contendo apoB, tais como o quilomícron e a VLDL, resultando em partículas de LDL pequenas e densas, que são mais aterogênicas. Assim, a CETP é considerada, em algumas condições metabólicas, como uma proteína que favorece a aterogênese (94). Os inibidores de CETP constituem uma classe de medicamentos capaz de aumentar o HDL-c e reduzir o LDL-c, porém, os resultados até o momento falharam em evidenciar redução de eventos cardiovasculares (185). Há controvérsia na literatura quanto à atividade da CETP em DM1, podendo estar aumentada, normal ou reduzida (30). No presente estudo, a atividade da CETP não foi avaliada, mas houve maior abundância dela na HDL_3 de DM1 do que em controles. A CETP também apresentou correlação positiva com maior rigidez arterial e com disfunção endotelial, marcadores de aterosclerose subclínica.

A LCAT é uma enzima presente, principalmente, na HDL e participa do TRC, especificamente no processo de maturação da HDL por meio da esterificação do colesterol livre, possibilitando sua entrada no núcleo hidrofóbico desta lipoproteína (89). A LCAT na HDL_3 apresentou-se como discriminativa entre o grupo DM1 e controles (**Anexo 9**), mas a abundância da LCAT na HDL_3 apenas apresentou tendência de aumento em indivíduos com DM1 (**Anexo 6**). Um estudo de Feitosa e cols (2013) evidenciou que a atividade da LCAT foi semelhante em indivíduos com DM1 e controles (186). Chang e cols (2001) compararam crianças com DM1 em normoglicemia e em hiperglicemia e observaram maior atividade da LCAT em crianças com hiperglicemia (187). O papel da atividade da LCAT na aterosclerose ainda é controverso. Em indivíduos com doença coronariana estabelecida, alguns estudos indicaram associação de eventos cardiovasculares com o aumento da atividade da LCAT, mas em outros, com a redução (89). Em DM1, a LCAT se associou negativamente com o escore de cálcio coronariano em indivíduos

com DM1 (188), que está de acordo com o achado de correlação negativa da LCAT na HDL_3 com o VOP na presente análise.

A PCSK9 é responsável pela degradação lisossomal do receptor de LDL, o que favorece a elevação da concentração de LDL na circulação (189). A associação da PCSK9 com a HDL ainda é pouco compreendida (190). É interessante que na presente investigação, a PCSK9 na HDL_3 teve poder de discriminação entre os dois grupos. Este foi o primeiro estudo a evidenciar a presença de PCSK9 na HDL_3, sendo mais abundante nas HDL_3 de indivíduos com DM1 do que controles. Um estudo demonstrou que a concentração sérica de PCSK9 é maior em DM1 do que em controles e está correlacionada significantemente com a HbA1c (191). Os dados do presente estudo demonstraram que indivíduos com HbA1c ≥8,5% mostraram PCSK9 mais abundante na HDL_3 do que aqueles com HbA1c <8,5%. Um outro estudo investigou a associação entre concentração sérica de PCSK9 e tamanho das lipoproteínas em crianças com DM1 e evidenciou que a PCSK9 está associada a HDL_3 menores nos indivíduos com pior controle glicêmico (190). Além disso, os resultados da investigação atual indicaram que a abundância da PCSK9 na HDL_2 se correlacionou com dados dos testes vasculares, demonstrando maior disfunção endotelial. Estas evidências podem despertar o interesse para futuras indicações clínicas para o uso dos inibidores de PCSK9.

Além das proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico, resultados interessantes foram encontrados para proteínas de fase aguda inflamatória ligadas à HDL, como SAA1, SAA4, Orm1, HP e HPR. O SAA1 é uma proteína inflamatória que está relacionada ao maior risco de DCV (101). O SAA4 é uma proteína constitucional que não é considerada uma proteína de fase aguda, mas pode aumentar em alguns processos inflamatórios (192). As proteínas amiloides estão presentes na partícula de HDL e tornam-se mais abundantes em processos inflamatórios. A consequência disto é o prejuízo na habilidade desta lipoproteína em remover colesterol celular, independentemente de variação no HDL-c (193). Além disso, há redução da atividade anti-inflamatória da HDL (194). Observou-se maior abundância de SAA1 e SAA4 na HDL_3 de indivíduos com DM1, com capacidade discriminatória no estudo caso-controle.

Houve também maior abundância de SAA4 em indivíduos com DM1 com HbA1c ≥8,5%.

A Orm1, codificada pelo gene *ORM1*, é uma proteína de fase aguda, envolvida em várias doenças inflamatórias (195). Além disso, é uma proteína transportadora de ligantes exógenos (por exemplo, capsaicina, dipiridamol, clorpromazina, vinblastina, imatinibe, tamoxifeno e propranolol) ou endógenos (por exemplo, histamina, melatonina, serotonina, heparina, imunoglobulina G3, esteroides e PAF), tem efeitos imunomoduladores e regula a homeostase de esfingolípides (196,197). A 1-deoxi-esfingolípide, um subproduto de esfingolípides, mostrou-se neurotóxica em modelo animal com ratos submetidos à estreptozotocina (198) e sua concentração plasmática é elevada em DM2. Estas evidências sugerem a participação de esfingolípides na patogênese da neuropatia diabética (199,200). Na presente casuística, houve associação da Orm1 com a NAC em DM1.

Estudos observacionais têm associado vários marcadores inflamatórios, como proteína C reativa, Orm1, ácido siálico e interleucina-6, e também os complementos C3 e C4, ao maior risco de desenvolver DM. Assim, tem sido proposto que o DM seja uma doença do sistema imune inato. Um estudo prospectivo evidenciou que o C3 está associado a aumento da resistência insulínica e risco de desenvolvimento de DM (201). Outro estudo de coorte prospectiva demonstrou associação do C3 e risco aumentado de complicações microvasculares do DM (202). É relatado que o C3 tem papel na regulação da síntese de TG e apoB, mas sua importância no metabolismo lipídico é controversa (203). O C3 é a proteína do sistema do complemento mais abundante no plasma e está envolvido na patogênese da lesão aterosclerótica. Vários estudos observacionais demonstraram associação de maior concentração sérica de C3 e doenças macrovasculares (204–207). Nesta investigação, a quantidade de C3 na HDL_3 se correlacionou negativamente com o VOP. No estudo de Vaisar (2007), C3 na HDL_3 foi mais abundante em indivíduos com DCV estabelecida do que controles saudáveis (101). Estudos prospectivos seriam interessantes para explicar esta discrepância e avaliar se o C3 na HDL_3 teria padrões diferentes em estágios iniciais de aterosclerose e na doença aterosclerótica estabelecida. No estudo de Gourgari (2019) que avaliou

a proteômica da HDL em indivíduos com DM1 e controles, o complemento C3 se mostrou menos abundante em DM1 (149). Na presente casuística, os resultados foram divergentes, sendo detectada maior abundância apenas na HDL_2. Maior abundância de C3 na HDL_2 de indivíduos com DM1 e pior controle glicêmico, ou em uso de estatina, também foi observada. No entanto, no estudo supracitado, não houve isolamento das subfrações da HDL.

A HP e a HPR compartilham mais de 90% da sequência de aminoácidos (208). Isto justifica o porquê não é possível definir qual das duas proteínas está sendo representadas pelos peptídeos encontrados na proteômica. A função mais conhecida da HP é a sua ligação com a hemoglobina (Hb), facilitando a remoção da Hb nos hepatócitos. Além disso, possui atividade antioxidante e imunorregulatória. O genótipo Hp2-2 do gene *HP* tem sido consistentemente associado como fator de risco cardiovascular (209). Tanto a HP quanto a HPR estão presentes no proteoma da HDL. Uma função peculiar da HPR é a ação antiparasitária contra o *Trypanosoma brucei brucei*, por meio do complexo que forma com o fator lítico de tripanossoma 1 (TLF1) na HDL_3 (208). Maior abundância da HP nas HDL_3 de indivíduos com DM1 e em indivíduos com pior control glicêmico foi encontrada neste estudo.

A HP e a hemopexina (HPX) são proteínas plasmáticas com alta afinidade pela Hb (210,211). Normalmente a Hb encontra-se no interior das hemácias, cumprindo a função de transporte de oxigênio e de ligação com o ferro. No entanto, em situações de hemólise, a Hb fica livre no plasma e se torna bastante tóxica, devido a propriedade oxidante do grupo heme. A HP e a HPX se ligam à Hb, impedindo os efeitos maléficos do excesso de Hb livre. A Hb também pode se ligar à HDL. Em condições basais, a HDL tem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, mas durante a inflamação aguda pode passar a ter ação pró-inflamatória, dependendo das proteínas ligadas a ela. Estudos evidenciam que em indivíduos submetidos à dieta aterogênica, há aumento do complexo Hb/HP/HPX associados à HDL, que passa a ter propriedades pró-inflamatórias (210). A presente análise de proteômica em DM1 evidenciou um padrão diferente. A subunidade beta da Hb (HBB) tanto na HDL_2 quanto na HDL_3 teve capacidade discriminativa entre o grupo DM e

controles, mas houve menor HBB nas HDL_2 e HDL_3 no grupo DM1 e correlação negativa com a VOP.

A HDL também tem ação antioxidante ao metabolizar hidroperóxidos lipídicos e evitar que estes se acumulem na LDL (212). Algumas proteínas relacionadas a esta ação são a APMAP, paraoxonases 1 e 3 (PON1 e PON3) e a CLU (212–214). A apoA-I, além da função no metabolismo de lípides, também está associada à ação antioxidante (212).

A APMAP é uma proteína com função ainda não bem estabelecida, mas possivelmente está envolvida na maturação dos adipócitos, que adquirem a capacidade de armazenar lípides (215). Além disso, assim como a paraoxonase, a APMAP está associada à ação antioxidante pela sua atividade arilesterase (213,214). No presente estudo, a APMAP foi mais abundante nas HDL_2 e HDL_3 do grupo DM1, além disso, também foi capaz de discriminar o grupo DM1 e controle quanto a sua presença na HDL_2 e na HDL_3. Em DM1, estava mais abundante em indivíduos com pior controle glicêmico, embora não haja respaldo na literatura para discussão deste achado.

A PON é uma enzima presente na HDL que participa do efluxo de colesterol da HDL, em especial a PON1. Também apresenta funções antioxidante e anti-inflamatória. Mais relacionado ao metabolismo de glicose, a PON1 parece ter efeito citoprotetor sobre as células beta pancreáticas e aumenta a expressão do transportador 4 de glicose (GLUT4) nas células musculares, independentemente da ação da insulina. Alguns estudos demonstraram prejuízo da ação da PON1 no DM1 (36,216,217). Maior abundância de PON1 e PON3 nas HDL_3 de indivíduos com DM1 foi encontrada, sem diferença nas HDL_2. Há estudos que demonstram que a atividade da PON1 ocorre principalmente na HDL_3, o que explica, em parte, o motivo desta subfração da HDL ter maior atividade antioxidante (218). Observou-se que quanto maior a expressão de PON1 na HDL_3, menor foi a rigidez arterial, fortalecendo a ação antiaterogênica desta proteína. Um estudo com indivíduos que participaram do DCCT/ EDIC, também evidenciou a ação ateroprotetora da PON. Neste estudo, as quantidades de PON1 e PON3 na HDL se correlacionaram negativamente com o escore de cálcio coronariano, indicativo de aterosclerose subclínica (188).

A CLU, também conhecida como apoJ ou glicoproteína-2 sulfatada (219), é uma apolipoproteína encontrada na HDL que tem a função de chaperonas, que são capazes de reparar proteínas danificadas ou direcioná-las à degradação (220–222). Acredita-se que possa ter um papel protetor contra a aterosclerose pelo possível envolvimento no metabolismo lipídico (220,222). No entanto, também se atribui a CLU um papel de biossensor do estresse oxidativo e da inflamação (220,222). Um estudo demonstrou que a CLU inibe a migração, adesão e proliferação de células musculares lisas frente à lesão vascular (223). Correlação positiva da CLU presente na HDL_2 e na HDL_3 com o VOP, e negativa da CLU na HDL_3 com a VMF independente do endotélio, encontrados nesta investigação, reforçam que a CLU possa estar relacionada à disfunção muscular lisa vascular na aterosclerose. A CLU também tem uma ação neuroprotetora, especialmente na eliminação de proteínas extracelulares malformadas. Pode ter um possível papel protetor na polineuropatia amiloidótica familiar (224), que será comentada adiante. Correlação negativa entre CLU e a presença de NAC foi observada em DM.

Outras proteínas associadas à HDL relacionadas a sistemas de transporte, como albumina (Alb), TF, TTR e RBP4, foram encontradas. A Alb se mostrou menos abundante em DM1 do que em controles, o que concorda com o estudo de Gourgari e cols. (2019) (149). Além disso, houve menor abundância em indivíduos com DM1 e com HbA1c <8,5% do que naqueles com HbA1c ≥8,5%. A Alb é uma proteína abundante no plasma e, portanto, pode ter sido detectada por contaminação das amostras. No entanto, há evidências de que a Alb pode se associar à apo-A-I (101), mas o seu papel na HDL não está estabelecido (98,149). Estudos recentes indicam que a Alb glicada prejudica a atividade anti-inflamatória e o TRC mediado pela HDL, por reduzir o conteúdo do ABCA-1 em macrófagos (98,149).

A serotransferrina (TF) ou transferrina sérica é uma glicoproteína transportadora de ferro no sangue (225). O ferro participa na formação de espécies reativas de oxigênio e a TF é uma proteína que ao se ligar ao ferro, contribui com a defesa antioxidante (226). A hemocromatose é uma doença genética na qual há prejuízo do metabolismo de ferro, caracterizada por concentrações séricas elevadas de ferro e ferritina, e saturação de transferrina

elevada, levando à deposição de ferro nos tecidos. Esta condição é umas das causas secundárias de DM, em que ocorre a destruição de células beta-pancreáticas e maior resistência insulínica (226,227). A saturação de transferrina sérica também é considerada um marcador de risco tanto para DM1 quanto para DM2 (227). Um estudo de Metz e cols (2008) utilizou a proteômica no sangue para avaliar biomarcadores para DM1. Embora tenha havido grande variação interindividual na detecção dos peptídeos, a TF foi maior em controles do que no grupo DM1 (228). Na presente investigação, a abundância de TF na HDL_3 foi maior em DM1 do que em controles.

A proteína ligante do retinol tipo 4 (RBP4) é uma adipocina transportadora de retinol (vitamina A) e que está associada à síndrome metabólica, obesidade, resistência insulínica, adiposidade visceral e gravidade do DM2 (229,230). Além disso, observou-se aumento de RBP4 em indivíduos com DM e DCV (231). O presente estudo demonstrou concordância com esta informação, indicando correlações positivas do RBP4 na HDL_3 com o VOP e com o escore de risco cardiovascular QRISK3. O estudo caso-controle evidenciou maior abundância na HDL_3 de controles, que mostraram perfil lipídico mais aterogênico. Os resultados confirmaram aqueles de um estudo com indivíduos com DM1 em insulinoterapia, comparados ao grupo controle, em que foi observada uma menor síntese de RBP4 no grupo DM1. Como a concentração de glucagon foi menor no DM1 durante a hiperglicemia por deficiência de insulina em relação aos controles, os autores tentaram explicar a diferença do padrão de RBP4 entre DM1 e DM2 por meio de um possível papel do glucagon na síntese de RBP4 (232). No entanto, são necessários outros estudos para comprovar isto. Por fim, foi observado que o RBP4 na HDL_3 de DM1 foi maior naqueles com controle glicêmico melhor.

A transtirretina (TTR) é uma proteína sérica de transporte que carreia os hormônios tireoidianos e a RBP4. Existe principalmente como um tetrâmetro e em menor quantidade, como monômeros (233,234). A TTR é uma proteína presente na HDL e sua interação com a apoA-I leva à redução no efluxo de colesterol celular (235). A TTR também desempenha um papel na secreção de insulina e na preservação das células beta. A redução da forma tetramérica e o aumento da forma monomérica observada em DM1 podem estar relacionados

à patogênese do DM1 (234,236). Além disso, a TTR possui atividade proteolítica que é neuroprotetora, tendo papel na neurogênese, regeneração nervosa e crescimento axonal (234,237). Mutações no gene *TTR* causam a forma mais comum de amiloidose genética. Trata-se de uma doença degenerativa progressiva em que há acúmulo de amiloide nos capilares endoneurais, com lesão das fibras nervosas. O quadro clínico envolve polineuropatia periférica motora e sensorial, dor neuropática, disfunção autonômica e miocardiopatia. O tafamidis meglumina é um estabilizador cinético seletivo de TTR, utilizado como um medicamento que inibe a cascata do amiloide. Está sendo indicado para o tratamento da neuropatia periférica e da miocardiopatia da amiloidose familiar por mutações no *TTR* (238–240). Os dados demonstraram resultados inéditos de correlação entre a abundância da TTR na HDL_2 e a presença de NAC nos indivíduos com DM1. A quantidade de TTR também se correlacionou positivamente com o escore de risco cardiovascular QRISK3. Outros estudos são necessários para a confirmação dos resultados e avaliação de causa-efeito. Confirmando-se os resultados, será possível compreender melhor a etiopatogenia da neuropatia diabética e o uso do tafamidis meglumina pode ser uma perspectiva para tratamento da NAC em DM.

A proteína ligadora da vitamina D ou componente grupo específico (GC) é uma proteína multifuncional codificada pelo gene *GC* (241). A função mais conhecida da proteína GC é a de transporte de metabólitos de vitamina D. A GC também é transportadora de ácidos graxos. O papel da proteína GC na inflamação é ainda incerto. É considerada uma proteína de fase aguda inflamatória por seu papel na ativação de macrófagos, além da ação indireta por meio de seu ligante, a 1,25-di-hidroxi-vitamina D (ou calcitriol), que tem papel na imunidade e na inflamação (241–243). A concentração sérica de GC é pouco reduzida em indivíduos com DM1 e mais reduzida em indivíduos com DM1 com pior controle glicêmico e em camundongos com DM induzido por estreptozotocina (241,244,245). Um estudo mostrou correlação negativa entre as concentrações de insulina e GC em indivíduos adultos obesos, sugerindo que a insulina possa ter papel de inibição da secreção de GC (243). Os dados do presente estudo corroboram estes estudos ao mostrar que a proteína GC foi

menos abundante na HDL_3 do grupo DM1 do que no grupo controle, e também que houve maior abundância de GC em indivíduos com DM1 e melhor controle glicêmico do que aqueles com pior HbA1c. No estudo de Manjunatha e cols (2016), a proteína GC foi menos abundante em indivíduos com DM1 bem controlados do que em controles sem DM (98).

No presente estudo, GC foi a única proteína que mostrou correlação entre sua abundância e o efluxo de colesterol pela HDL_3 nos grupos DM1 e controle. Em ambos os grupos, as correlações foram negativas. Acredita-se que a vitamina D possa ter papel protetor contra DCV por ativar receptores nucleares em cardiomiócitos e em células endoteliais e por regular o sistema renina-angiotensina-aldosterona. Além disso, a deficiência de vitamina D está associada a disfunção endotelial, maior rigidez arterial e hipertrofia de ventrículo esquerdo (242). O presente estudo não avaliou a concentração sérica de vitamina D. No entanto, a deficiência ou o excesso de vitamina D não tem influência na concentração sérica de GC (241). Há evidências de que a proteína GC possa ter influência na DCV de forma independente da vitamina D. Há relato de que a concentração de GC é significantemente menor na presença de DCV (246). Um estudo mostrou associação da concentração de GC e NAC em pacientes com pré-diabetes, independentemente da concentração de vitamina D (247). O presente estudo não mostrou correlação entre a abundância de GC e NAC. No entanto, as populações e a fisiopatologia do DM são diferentes entre os estudos.

Alguns inibidores de protease se mostraram presentes na HDL dos indivíduos do presente estudo: a alfa-1-antitripsina (A1AT), a AMBP e a AHSG. A A1AT é uma proteína codificada pelo gene *SERPINA1*, cuja ação é inibir várias enzimas, incluindo a tripsina. A A1AT tem propriedades imunomoduladoras que não decorrem do fato dela inibir proteases durante o processo inflamatório agudo (248), mas por serem capazes de modificar a maturação de células dendríticas, regular a diferenciação de células T, aumentar as liberações de interleucina-10 e do antagonista do receptor de interleucina-1, e evitar apoptose celular (249,250). Diante dessas propriedades, um estudo clínico de fase 2 com A1AT está em andamento com indivíduos com DM1 em estágio inicial, como forma de preservar as células beta-pancreáticas

por tempo maior (248). Concentrados de A1AT do plasma humano já têm sido utilizados no tratamento da deficiência da A1AT, que é uma condição genética grave que se manifesta, principalmente, por enfisema pulmonar e cirrose hepática. Evidenciou-se correlação de A1AT na HDL_3 e menor rigidez arterial; além disso, os indivíduos com DM1 e pior controle glicêmico apresentaram menos A1AT na HDL_3. No entanto, o efluxo de colesterol na HDL_3 apresentou correlação negativa com a abundância da A1AT na HDL_3. Um estudo observacional sobre a deficiência de A1AT evidenciou menor prevalência de DCV nestes indivíduos (251). Estes dados conflitantes sugerem a necessidade de estudos de segurança cardiovascular em longo prazo com a A1AT para uso clínico, especialmente em indivíduos com DM1, que têm maior risco cardiovascular.

O gene *AMBP* codifica as proteínas alfa-1microglobulina (A1M) e bicunina que são clivadas por proteínas citoplasmáticas, especialmente no complexo de Golgi, e são secretadas livremente no sangue. A bicunina está relacionada a processos inflamatórios, agindo na inibição de proteases (252,253). A aprotinina é um equivalente farmacológico à bicunina, que tem função hemostática por inativar a calicreína e a plasmina (254). Alguns estudos avaliaram o uso da aprotinina como agente anti-inflamatório, mas em uma meta-análise realizada, não houve evidência que justifique o uso para este fim (255). A bicunina pode se ligar a outras proteínas mais pesadas no plasma, formando a inter-alfa-tripsina (ITH) e passa a ter atividade de inibição da tripsina (252,253). O presente estudo demonstrou correlação positiva da AMBP na HDL_2 e na HDL_3 com o risco cardiovascular estimado pelo *Steno T1 Engine* e QRISK3. A abundância da AMBP foi maior em indivíduos com DM1 e HAS do que naqueles sem HAS. O estudo de Gourgari e cols (2019) detectou mais a cadeia pesada da ITH na HDL de indivíduos com DM1 do que na de controles (**Tabela 25**) (149). O ITIH4 e a A1M urinários são considerados potenciais marcadores para doença renal diabética (149,256). A presente investigação evidenciou que a AMBP foi mais abundante em indivíduos com DM1 e NAC, mas não foram encontrados outros estudos relacionando a AMBP com neuropatia. Estudos são necessários para comprovar que a AMBP na HDL pode ser um potencial marcador de NAC. Uma hipótese para este achado é

que a ação da bicunina possa ajudar a conter o processo inflamatório na neuropatia.

A glicoproteína alfa2-Heremans-Schmid ou fetuína (AHSG) é uma proteína que faz parte da superfamília de inibidores de protease e vem sendo relacionada à síndrome metabólica, obesidade e resistência insulínica (257). Esta glicoproteína causa resistência insulínica por reduzir a autofosforilação e a atividade tirosinocinase do receptor de insulina (258). No presente estudo, houve menor abundância de AHSG na HDL_3 do grupo DM1 do que nos controles. Convém reforçar que a resistência insulínica não faz parte da patogênese do DM1, e sim do DM2, e que os indivíduos com DM1 do estudo apresentaram o IMC e a circunferência abdominal normais e semelhantes aos controles, mas perfil lipídico menos relacionado à síndrome metabólica (menor LDL-c e trigliceridemia). O uso de estatina ocorreu em 40% dos indivíduos no grupo DM1 e não houve diferença da AHSG em quem usou ou não, mas o presente estudo não foi delineado para esta diferenciação.

A GPLD1 é uma proteína relativamente abundante no plasma e se associa com a HDL, especialmente com a apoA-I e apoA-IV (259). A interação da GPLD1 com estas apolipoproteínas ainda não é bem compreendida. O estudo de Shofield e cols (2002) observou que a concentração sérica de GPLD1 foi menor em indivíduos com DM1 do que em controles e menor quantidade e a atividade da GPLD1 sérica em ratos submetidos à estreptozotocina. Nestes ratos, a concentração de GPLD1 aumentou com o uso da insulina, mas a síntese de GPLD1 no fígado diminuiu (260). Os resultados da presente investigação evidenciaram maior abundância da GPLD1 nas HDL_2 e HDL_3 do grupo DM1 em comparação aos controles. Além disso, houve correlação da GPLD1 com a disfunção endotelial em DM1.

A A1BG faz parte da família das imunoglobulinas e sua função é pouco conhecida. Os dados do presente estudo demonstraram que a A1BG foi mais abundante nas HDL_2 e HDL_3 de controles. No grupo DM1, foi mais abundante nos indivíduos com HAS concomitante e naqueles com HbA1c <8,5%. O estudo de Gourgari e cols (2019) obteve resultado discordante da atual investigação, em que a A1BG foi mais abundante em indivíduos com DM1 (149).

Por fim, a apoL-I é uma proteína encontrada na HDL que, assim como a TLF1 ligada à HPR, também age contra o *Trypanosoma brucei brucei* em seres humanos (261). Além disto, está envolvida no processo de autofagia celular (262). Na HDL, liga-se à apoA-I (262), mas o papel ainda não está bem estabelecido. A insulina parece estar envolvida com a expressão de apoL-I. Um estudo demonstrou que em indivíduos com síndrome metabólica sem DM, houve associação do aumento sérico da apoL-I com a hipertrigliceridemia, o HDL-c baixo e o IMC elevado. No entanto, em indivíduos com síndrome metabólica e DM2 com deficiência relativa de insulina, não houve aumento significativo da apoL-I. Nos casos de DM2 e deficiência absoluta de insulina, observou-se redução da apoL-I (261). Observou-se que os indivíduos com DM1 apresentaram maior abundância de apoL-I na HDL_3 do grupo DM1 e correlação negativa entre a apoL-I na HDL_2 e HDL_3 com o VOP. Há controvérsia quanto a relação de algumas variantes gênicas da apoL-I e risco cardiovascular (263). Em DM2, a expressão de apoL-I não se correlacionou com VOP e com o estresse oxidativo (261).

No presente estudo não houve diferença de %EC entre os indivíduos com DM1 e os controles, tanto para HDL_2 quanto para HDL_3, diferindo dos resultados do estudo de Gourgari e cols (2019) e de Manjunatha e cols (2016), em que a %EC foi menor nos indivíduos com DM1, comparados aos controles (98,149). Um estudo analisou duas coortes de indivíduos com DM1 de longa data e complicações vasculares. Neste estudo, a %EC não foi diferente entre indivíduos com e sem complicações, sugerindo que a %EC pela HDL provavelmente não explica o porquê da proteção de complicações vasculares no grupo sem complicações (264). Na presente investigação, não houve correlação entre a %EC e os testes vasculares; no entanto, é digno de nota que a habilidade intrínseca das subfrações de HDL em remover colesterol foi semelhante entre DM e controles, embora a proteômica possa interferir na primeira etapa do TRC.

Este estudo teve algumas limitações. A principal delas foi o seu delineamento transversal, o que dificulta tirar conclusões quanto à relação causa-efeito entre as diversas variáveis. Outra limitação foi que a HAS e o uso de estatina estavam presentes apenas no grupo DM1, podendo interferir no

estudo caso-controle. No entanto, o estudo aumentou a compreensão acerca dos efeitos do DM1 sobre a proteômica da HDL e sobre os testes de função vascular. Por fim, grande parte das proteínas associadas às HDL é sintetizada no fígado. Apesar de, aparentemente, não haver indivíduos com insuficiência hepática grave na casuística, conforme dados levantados a partir da análise de prontuários, este critério não foi levado em conta como exclusão para a seleção dos participantes no estudo.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou diferenças na proteômica da HDL entre indivíduos com DM1 e controles que não haviam sido encontradas em estudos prévios. Os testes vasculares corroboraram estudos anteriores em indivíduos com DM1 que indicavam piores marcadores de aterosclerose subclínica e maior risco cardiovascular estimado do que indivíduos sem DM, mesmo com perfil lipídico sérico aparentemente melhor em indivíduos com DM1. A associação das variáveis clínicas e laboratoriais, dados da proteômica da HDL e resultados dos testes de função vascular e da funcionalidade da HDL possibilitou a exploração das várias funções ateroprotetoras da HDL. Além das proteínas envolvidas com o metabolismo de lípides, a HDL carreia proteínas de fase aguda inflamatória, do sistema do complemento, antitrombóticas, antioxidantes, inibidoras de protease e transportadoras, com diferenças significativas entre indivíduos com DM1 e controles. Algumas proteínas na HDL, especialmente aquelas relacionadas ao metabolismo lipídico, correlacionaram-se com a função vascular, principalmente com a VOP, NAC, efluxo de ^{14}C-colesterol, controle glicêmico, HDL-c, HAS e uso de estatinas. O estudo revelou proteínas com importância funcional já conhecida, associadas à HDL, e que discriminaram indivíduos com DM1 e controles. Tanto para a HDL_2 quanto para a HDL_3, chamou atenção a associação da abundância de proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico com o grupo DM1 e proteínas transportadoras com o grupo controle.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Proteínas e peptídeos determinados pelo método PRM.

Proteína*	Gene*	Peptídeo detectado	Carga	Peptídeo escolhido
A1AG1_HUMAN Alpha-1-acid glycoprotein 1	*ORM1*	NWGLSVYADKPETTK	3	
		SDVVYTDWK	2	X
A1AT_HUMAN Alpha-1-antitrypsin	*SERPINA1*	LSITGTYDLK	2	
		SVLGQLGITK	2	X
A1BG_HUMAN Alpha-1B-glycoprotein	*A1BG*	SGLSTGWTQLSK	2	
		LLELTGPK	2	X
ALBU_HUMAN Albumin	*ALB*	LVNEVTEFAK	2	X
		FQNALLVR	2	
ALS_HUMAN Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	*IGFALS*	LEALPNSLLAPLGR	2	
		DFALQNPSAVPR	2	X
AMBP_HUMAN Protein AMBP	*AMBP*	ETLLQDFR	2	
		GECVPGEQEPEPILIPR	2	X
APMAP_HUMAN Adipocyte plasma membrane-associated protein	*APMAP*	LLLSSETPIEGK	2	X
		LLEYDTVTR	2	
		YSLVLELSDSGAFR	2	
APOA_HUMAN Apolipoprotein(a)	*LPA*	TPAYYPNAGLIK	2	X
		GTLSTTITGR	2	
APOA1_HUMAN Apolipoprotein A-I	*APOA1*	DLATVYVDVLK	2	
		DYVSQFEGSALGK	2	
		VQPYLDDFQK	2	X
APOA2_HUMAN Apolipoprotein A-II	*APOA2*	SPELQAEAK	2	
		EQLTPLIK	2	X
APOA4_HUMAN Apolipoprotein A-IV	*APOA4*	SELTQQLNALFQDK	2	
		LGEVNTYAGDLQK	2	X
		SLAPYAQDTQEK	2	
APOA5_HUMAN Apolipoprotein A-V	*APOA5*	GFWDYFSQTSGDK	3	
		LRPLSGSEAPR	2	
		QDTYLQIAAFTR	3	X
APOB_HUMAN Apolipoprotein B-100	*APOB*	SVSLPSLDPASAK	2	
		IEIPLPFGGK	2	X
		IDDIWNLEVK	2	
APOC1_HUMAN Apolipoprotein C-I	*APOC1*	LKEFGNTLEDK	2	
		LKEFGNTLEDK	3	
		EFGNTLEDK	2	X
		EWFSETFQK	2	
APOC2_HUMAN Apolipoprotein C-II	*APOC2*	ESLSSYWESAK	2	X
		TAAQNLYEK	2	
		TYLPAVDEK	2	
APOC3_HUMAN Apolipoprotein C-III	*APOC3*	DALSSVQESQVAQQAR	2	
		GWVTDGFSSLK	2	X
		DYWSTVK	2	
APOC4_HUMAN Apolipoprotein C-IV	*APOC4*	ELLETVVNR	2	
		AWFLESK	2	X
APOD_HUMAN Apolipoprotein D	*APOD*	VLNQELR	2	X
		NILTSNNIDVK	2	

Proteína*	Gene*	Peptídeo detectado	Carga	Peptídeo escolhido
APOE_HUMAN Apolipoprotein E	*APOE*	SELEEQLTPVAEETR	2	
		LAVYQAGAR	2	X
		AATVGSLAGQPLQER	2	
APOF_HUMAN Apolipoprotein E	*APOF*	SGVQQLIQYYQDQK	2	
		SGVQQLIQYYQDQK	3	
		SYDLDPGAGSLEI	2	X
APOH_HUMAN Beta-2-glycoprotein 1	*APOH*	TCPKPDDLPFSTVVPLK	3	X
		TFYEPGEEITYSCKPGYVSR	3	
		ATVVYQGER	2	
APOL1_HUMAN Apolipoprotein L1	*APOL1*	VTEPISAESGEQVER	2	
		VAQELEEK	2	
		LNILNNNYK	2	X
APOM_HUMAN Apolipoprotein M	*APOM*	DGLCVPR	2	
		SLTSCLDSK	2	
		AFLLTPR	2	X
CETP_HUMAN Cholesteryl ester transfer protein	*CETP*	VIQTAFQR	2	
		ASYPDITGEK	2	X
		LFLSLLDFQITPK	2	
CLUS_HUMAN Clusterin or Apolipoprotein J	*CLU*	IDSLLENDR	2	
		VTTVASHTSDSDVPSGVTEVVVK	3	X
		LFDSDPITVTVPVEVSR	2	
CO3_HUMAN Complement 3	*C3*	TIYTPGSTVLYR	2	
		TGLQEVEVK	2	X
CYTC_HUMAN Cystatin C	*CST3*	ALDFAVGEYNK	2	X
		ASNDMYHSR	2	
		TQPNLDNCPFHDQPHLK	3	
FETUA_HUMAN Alpha-2-HS-glycoprotein	*AHSG*	HTLNQIDEVK	2	X
		EHAVEGDCDFQLLK	2	
		EHAVEGDCDFQLLK	3	
HBB_HUMAN Hemoglobin subunit beta	*HBB*	SAVTALWGK	2	X
		LLVVYPWTQR	2	
HPT_HUMAN Haptoglobin	*HP*	LPECEAVCGKPK	3	X
		GSFPWQAK	2	
HPTR_HUMAN Haptoglobin-related protein	*HPR*	LPECEAVCGKPK	3	
		VTSIQHWVQK	2	X
LCAT_HUMAN Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	*LCAT*	SSGLVSNAPGVQIR	2	X
		TYSVEYLDSSK	2	
		LEPGQQEEYYR	2	
PCSK9_HUMAN Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	*PCSK9*	LPGTYVVVLK	2	
		ILHVFHGLLPGFLVK	4	
		MSGDLLELALK	2	X
PCYOX_HUMAN Prenylcysteine oxidase 1	*PCYOX1*	SDFYDIVLVATPLNR	2	X
		FGLNTVLTTDNSDLFINSIGIVPSVR	3	
PHLD_HUMAN Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	*GPLD1*	QVLLVGAPTYDDVSK	2	
		IADVTSGLIGGEDGR	2	X
PLTP_HUMAN Phospholipid transfer protein	*PLTP*	FLEQELETITIPDLR	2	
		AVEPQLQEEER	2	X
		ATYFGSIVLLSPAVIDSPLK	2	

Proteína*	Gene*	Peptídeo detectado	Carga	Peptídeo escolhido
PON1_HUMAN Serum paraoxonase/ arylesterase 1	*PON1*	STVELFK	2	
		IFFYDSENPPASEVLR	2	
		IQNILTEEPK	2	X
PON3_HUMAN Serum paraoxonase/ arylesterase 3	*PON3*	AQALEISGGFDK	2	X
		SVNDIVVLGPEQFYATR	2	
		LLNYNPEDPPGSEVLR	2	
RET4_HUMAN Retinol-binding protein 4	*RBP4*	GNDDHWIVDTDYDTYAVQYSCR	3	X
		LLNLDGTCADSYSFVFSR	2	
SAA1_HUMAN Serum amyloid A-1 protein	*SAA1*	SFFSFLGEAFDGAR	2	
		FFGHGAEDSLADQAANEWGR	3	X
SAA4_HUMAN Serum amyloid A-4 protein	*SAA4*	GPGGVWAAK	2	
		FRPDGLPK	2	X
TRFE_HUMAN Serotransferrin	*TF*	EFQLFSSPHGK	3	X
		EGTCPEAPTDECKPVK	3	
TTHY_HUMAN Transthyretin	*TTR*	GSPAINVAVHVFR	3	
		AADDTWEPFASGK	2	X
VTDB_HUMAN Vitamin D-binding protein	*GC*	EVVSLTEACCAEGADPDCYDTR	3	X
		VPTADLEDVLPLAEDITNILSK	3	
VTNC_HUMAN Vitronectin	*VTN*	GQYCYELDEK	2	
		DVWGIEGPIDAAFTR	2	
		FEDGVLDPDYPR	2	X

Obs: Os genes e as respectivas proteínas foram nomeados de acordo com o banco de dados UniProt (www.uniprot.org).

Anexo 2: Dados da proteômica da HDL_2 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1 (DM1).

Proteínas	Controle			DM1			Mann-Whitney
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	*P*
A1AT	8,78	8,55	8,91	8,81	8,55	8,97	0,665
A1BG	6,98	6,78	7,23	6,61	6,29	6,93	0,001
AHSG	7,80	7,64	7,99	7,90	7,65	8,02	0,739
ALB	9,34	9,16	9,47	9,29	9,09	9,43	0,480
AMBP	5,36	5,16	5,64	5,46	5,24	5,78	0,666
APMAP	7,36	7,10	7,62	7,78	7,61	8,13	<0,001
ApoA-I	11,00	10,94	11,07	11,03	10,95	11,08	0,750
ApoA-II	10,18	10,03	10,30	10,13	10,02	10,23	0,297
ApoA-IV	8,06	7,90	8,21	8,14	7,94	8,28	0,149
ApoA-V	7,75	7,66	7,84	7,77	7,69	7,83	0,398
ApoB	8,15	7,88	8,50	8,50	8,31	8,85	<0,001
ApoC-I	9,95	9,86	10,02	10,03	9,91	10,09	0,022
ApoC-II	9,64	9,53	9,78	9,78	9,70	9,88	<0,001
ApoC-III	10,21	10,08	10,33	10,08	9,97	10,26	0,037
ApoC-IV	8,34	8,18	8,46	8,31	8,22	8,43	0,717
ApoD	9,42	9,26	9,50	9,44	9,33	9,57	0,274
ApoE	9,09	8,86	9,20	9,27	9,11	9,39	<0,001
ApoF	8,29	8,15	8,41	8,39	8,32	8,47	0,009
ApoH	7,21	7,02	7,52	7,26	7,13	7,44	0,531
ApoL1	8,39	8,20	8,63	8,38	8,23	8,51	0,429
ApoM	9,26	9,19	9,36	9,36	9,24	9,39	0,035
C3	6,79	6,62	6,95	7,14	6,88	7,48	<0,001
CETP	7,11	6,80	7,36	7,19	6,97	7,35	0,548
CLU	7,69	7,44	7,88	7,65	7,43	7,82	0,750
CST3	6,85	6,43	7,05	6,84	6,45	7,01	0,724
GC	5,44	5,06	6,17	5,31	5,01	5,71	0,147
GPLD1	4,93	4,69	5,27	5,44	4,99	5,98	0,004
HBB	6,85	6,43	7,15	6,44	5,98	6,77	0,001
HPHPR	6,69	6,32	7,16	6,95	6,49	7,22	0,361
HPR	5,96	4,75	6,82	5,97	5,01	6,25	0,660
IGFALS	5,59	5,03	6,82	5,58	4,94	6,26	0,265
LCAT	6,84	6,45	7,37	6,83	6,08	7,21	0,633
Apo(a)	8,56	8,36	8,77	8,47	8,19	8,76	0,185
ORM1	5,83	5,44	6,22	5,71	5,23	6,04	0,239
PCSK9	6,79	6,63	6,95	6,74	6,49	7,03	0,976
PCYOX	7,19	6,99	7,29	7,12	6,94	7,28	0,465
PLTP	7,71	7,57	7,86	7,84	7,63	8,02	0,051
PON1	8,39	8,29	8,52	8,38	8,17	8,54	0,588
PON3	6,38	6,23	6,75	6,41	6,03	6,63	0,521
RBP4	6,30	5,58	6,68	6,03	5,32	6,49	0,250
SAA1	8,70	8,55	8,93	8,95	8,42	9,26	0,348
SAA4	9,22	9,08	9,28	9,26	9,11	9,39	0,045
TF	8,09	7,96	8,17	8,17	8,05	8,24	0,074
TTR	7,79	7,66	7,94	7,70	7,45	7,87	0,065
VTN	6,60	6,20	6,90	6,39	6,00	6,96	0,404

Dados expressos em medianas e percentis, Teste modificado de Wilcoxon.

Anexo 3: Acurácia da proteômica da HDL_2 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1 por meio da curva ROC.

Proteínas	Discriminação (AUC)	Erro Padrão	Sig. Assint.	ICI 95%	ICS 95%	Referência
APMAP	**81%**	0,05	<0,001	0,71	0,91	DM1 >
GPLD1	**76%**	0,06	<0,001	0,64	0,87	DM1 >
C3	**76%**	0,06	<0,001	0,64	0,87	DM1 >
ApoC-II	**75%**	0,06	0,001	0,63	0,87	DM1 >
ApoC-III	**74%**	0,06	0,037	0,62	0,86	DM1 >
ApoB	**74%**	0,06	0,001	0,62	0,86	DM1 >
ApoE	**74%**	0,06	0,001	0,62	0,86	DM1 >
HBB	**76%**	0,06	<0,001	0,64	0,88	Controle >
A1BG	**75%**	0,06	0,001	0,63	0,87	Controle >
PLTP	**73%**	0,06	0,051	0,61	0,85	DM1>

Dados expressos em Área ± Erro Padrão (Acurácia) e Intervalo de Confiança Superior e Inferior de 95%; Teste de Significância Assintótica (Afastamento da Linha de Nulidade).

Abreviaturas: AUC: área sob a curva, ICI: intervalo de confiança inferior, ICS: intervalo de confiança superior.

Obs:

(1) Valores com AUC $\geq$ 0,8 tem valor discriminante isoladamente; Valores com AUC $\geq$ 0,7 e $\leq$ 0,8 tem valor discriminante somente com duas ou mais variáveis associadas entre si.
(2) O sinal de “>” leia “mais abundante”.

Anexo 4: Validação interna da nota de corte da curva ROC da proteômica da HDL_2 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1.

Proteoma HDL_2 Categorizado		Controle		DM1		X2 de Pearson
		n	%	n	%	*P*
A1BG	6,79+	22	73,3%	15	30,0%	<0,001
	≤ 6,78	8	26,7%	35	70,0%	
APMAP	≤ 7,64	23	76,7%	15	30,0%	<0,001
	7,65+	7	23,3%	35	70,0%	
APOB	≤ 8,40	22	73,3%	15	30,0%	<0,001
	8,41+	8	26,7%	35	70,0%	
ApoC-II	≤ 9,69	20	66,7%	11	22,0%	<0,001
	9,70+	10	33,3%	39	78,0%	
ApoC-III	>10,15	20	66,7%	18	36,0%	0,008
	≤10,15	10	33,3%	22	64,0%	
ApoE	≤ 9,27	27	90,0%	26	52,0%	0,001
	9,28+	3	10,0%	24	48,0%	
C3	≤ 7,09	28	93,3%	22	44,0%	<0,001
	7,10+	2	6,7%	28	56,0%	
GPLD1	≤ 5,40	24	80,0%	23	46,0%	0,003
	5,41+	6	20,0%	27	54,0%	
HBB	6,67+	18	60,0%	13	26,0%	0,003
	≤ 6,66	12	40,0%	37	74,0%	
PLTP	<7,88	24	80,0%	26	52,0%	0,012
	≥7,88	6	20,0%	24	48,0%	
TTR	7,58+	27	90,0%	31	62,0%	0,007
	≤ 7,57	3	10,0%	19	38,0%	

Dados expressos em frequência absoluta (n) e relativa (%), Teste de Qui-quadrado de Pearson.

Anexo 5: Análise discriminante da proteômica da HDL_2 de indivíduos com diabetes tipo 1 e controles.

					Classificação do Coeficiente da Função	
Proteômica HDL_2	**Força de discriminação**	**GL1 (Número de variáveis)**	**GL2 (Número de indivíduos)**	***P***	**Controle**	**DM1**
APMAP	28,28	1	78	0,000	35,5	39,7
PLTP	23,26	2	77	0,000	67,6	73,6
ApoC-III	27,23	3	76	0,000	148,1	132,7
HBB	29,75	4	75	0,000	8,5	12,1
ApoC-II	26,90	5	74	0,000	17,1	14,4
C3	25,19	6	73	0,000	68,5	78,4

Obs: As proteínas estão representadas pela abreviatura dos genes que as codificam. Os proteomas presentes maximizam a menor razão F entre os grupos Controle e DM1.

Anexo 6: Proteômica da HDL_3 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1.

Proteínas	Controle			DM1			Mann-Whitney
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	*P*
A1AT	10,13	9,94	10,20	10,08	9,82	10,19	0,257
A1BG	7,96	7,76	8,21	7,65	7,39	7,87	<0,001
AHSG	9,18	8,94	9,27	9,01	8,59	9,17	0,005
ALB	10,61	10,20	10,79	10,09	9,73	10,37	<0,001
AMBP	7,82	7,54	8,05	7,96	7,72	8,24	0,099
APMAP	6,49	6,12	7,08	7,76	7,45	7,96	<0,001
ApoA-I	10,67	10,54	10,84	11,05	10,96	11,12	<0,001
ApoA-II	9,50	9,30	9,71	10,05	9,94	10,17	<0,001
ApoA-IV	9,16	9,08	9,26	9,08	8,83	9,28	0,109
ApoA-V	7,41	7,14	7,51	7,75	7,70	7,87	<0,001
ApoB	7,21	6,85	7,51	7,49	7,37	7,63	0,001
ApoC-I	9,30	9,12	9,50	9,69	9,59	9,81	<0,001
ApoC-II	8,96	8,69	9,18	9,35	9,23	9,48	<0,001
ApoC-III	9,17	8,97	9,50	9,68	9,51	9,85	<0,001
ApoC-IV	7,89	7,78	8,06	8,11	7,94	8,21	<0,001
ApoD	9,41	9,26	9,61	9,83	9,65	9,92	<0,001
ApoE	8,80	8,70	8,94	8,94	8,79	9,07	0,013
ApoF	9,66	9,33	9,82	9,10	8,83	9,28	<0,001
ApoH	8,69	8,46	8,90	8,43	8,19	8,62	<0,001
ApoL-I	8,59	8,41	8,65	8,73	8,56	8,91	0,006
ApoM	9,17	9,06	9,25	9,48	9,38	9,54	<0,001
C3	7,09	6,84	7,45	7,16	6,96	7,30	0,766
CETP	7,94	7,78	8,16	8,15	8,03	8,28	0,002
CLU	8,57	8,42	8,62	8,63	8,46	8,74	0,079
CST3	8,13	8,00	8,32	7,93	7,62	8,10	0,004
GC	8,39	8,15	8,57	7,94	7,26	8,16	<0,001
GPLD1	6,94	6,71	7,10	7,21	6,90	7,43	0,003
HBB	7,97	7,70	8,02	7,36	7,22	7,49	<0,001
HPHPR	7,70	7,51	7,80	8,05	7,87	8,27	<0,001
HPR	7,57	7,12	7,89	7,41	6,91	7,77	0,418
IGFALS	7,03	6,51	7,37	7,02	6,40	7,24	0,437
LCAT	8,47	8,31	8,56	8,54	8,43	8,67	0,054
Apo(a)	7,55	6,20	8,08	7,82	6,43	8,28	0,274
ORM1	7,18	6,78	7,60	7,32	7,10	7,59	0,315
PCSK9	6,98	6,59	7,12	7,49	7,38	7,62	<0,001
PCYOX	7,45	7,30	7,69	7,47	7,19	7,67	0,747
PLTP	8,12	8,05	8,23	8,36	8,28	8,42	<0,001
PON1	9,17	8,99	9,32	9,34	9,22	9,45	0,001
PON3	7,41	7,16	7,58	7,54	7,35	7,73	0,031
RBP4	8,65	8,57	8,74	8,57	8,39	8,62	0,025
SAA1	8,41	8,22	8,63	9,02	8,53	9,35	<0,001
SAA4	8,80	8,61	8,94	9,20	9,04	9,35	<0,001
TF	8,11	7,96	8,33	8,34	8,13	8,48	0,015
TTR	9,09	8,99	9,20	8,97	8,77	9,05	<0,001
VTN	7,90	7,69	7,98	7,90	7,75	8,03	0,698

Dados expressos em medianas e percentis, Teste modificado de Wilcoxon.

Anexo 7: Acurácia da proteômica da HDL_3 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1 por meio da curva ROC.

Proteínas	Discriminação (AUC)	Erro Padrão	Sig. Assint.	ICI 95%	ICS 95%	Maior abundância
APMAP	**93%**	0,03	<0,001	0,87	0,98	DM1 >
PCSK9	**93%**	0,03	<0,001	0,86	0,99	DM1 >
ApoA-II	**92%**	0,04	<0,001	0,85	0,99	DM1 >
ApoA-I	**91%**	0,04	<0,001	0,84	0,98	DM1 >
ApoA-V	**90%**	0,04	<0,001	0,81	0,98	DM1 >
ApoD	**89%**	0,04	<0,001	0,81	0,97	DM1 >
ApoM	**89%**	0,04	<0,001	0,80	0,97	DM1 >
SAA4	**88%**	0,04	<0,001	0,80	0,96	DM1 >
ApoC-I	**87%**	0,05	<0,001	0,78	0,96	DM1 >
ApoC-III	**85%**	0,05	<0,001	0,76	0,94	DM1 >
PLTP	**84%**	0,05	<0,001	0,74	0,94	DM1 >
ApoC-II	**83%**	0,05	<0,001	0,73	0,93	DM1 >
HPHPR	**83%**	0,05	<0,001	0,73	0,92	DM1 >
PON1	**75%**	0,06	<0,001	0,64	0,87	DM1 >
ApoC-IV	**75%**	0,06	<0,001	0,64	0,86	DM1 >
LCAT	**73%**	0,06	0,054	0,61	0,85	DM1 >
SAA1	**73%**	0,06	0,001	0,62	0,85	DM1 >
GPLD1	**72%**	0,06	0,001	0,60	0,83	DM1 >
ApoB	**71%**	0,07	0,002	0,59	0,84	DM1 >
TF	**71%**	0,06	0,002	0,59	0,82	DM1 >
CETP	**70%**	0,06	0,003	0,58	0,83	DM1 >
HBB	**90%**	0,04	<0,001	0,83	0,97	Controle >
GC	**81%**	0,05	<0,001	0,71	0,91	Controle >
ApoF	**79%**	0,06	<0,001	0,67	0,91	Controle >
Alb	**77%**	0,06	<0,001	0,66	0,89	Controle >
A1BG	**74%**	0,06	<0,001	0,62	0,85	Controle >
TTR	**74%**	0,06	<0,001	0,62	0,85	Controle >
ApoH	**73%**	0,06	0,001	0,61	0,84	Controle >
CST3	**71%**	0,06	0,002	0,59	0,83	Controle >

Dados expressos em Área ± Erro Padrão (Acurácia) e Intervalo de Confiança Superior e Inferior de 95%; Teste de Significância Assintótica (Afastamento da Linha de Nulidade).

Abreviaturas: AUC: área sob a curva, ICI: intervalo de confiança inferior, ICS: intervalo de confiança superior.

Obs:

(1) Valores com AUC $\geq$ 0,8 tem valor discriminante isoladamente; Valores com AUC $\geq$ 0,7 e $\leq$ 0,8 tem valor discriminante somente com duas ou mais variáveis associadas entre si.
(2) O sinal de “>” leia “mais abundante”.

Anexo 8: Validação interna da nota de corte da curva ROC da proteômica da HDL_3 em indivíduos controles e com diabetes tipo 1 (DM1).

Proteínas		Controle		DM1		X2 de Pearson
		n	%	n	%	*P*
A1BG	**7,99+**	14	46,7%	6	12,0%	0,001
	≤7,98	16	53,3%	44	88,0%	
ALB	**10,51+**	18	60,0%	4	8,0%	<0,001
	≤10,50	12	40,0%	46	92,0%	
APMAP	**<7,33**	26	86,7%	9	18,0%	<0,001
	≥7,33	4	13,3%	41	82,0%	
ApoA-I	**<10,91**	25	83,3%	5	10,0%	<0,001
	≥10,91	5	16,7%	45	90,0%	
ApoB	**≤ 7,35**	20	66,7%	11	22,0%	<0,001
	7,36+	10	33,3%	39	78,0%	
ApoC-I	**≤9,45**	21	70,0%	4	8,0%	<0,001
	9,46+	9	30,0%	46	92,0%	
ApoC-II	**≤9,21**	24	80,0%	9	18,0%	<0,001
	9,22+	6	20,0%	41	82,0%	
ApoC-III	**≤9,55**	27	90,0%	15	30,0%	<0,001
	9,56+	3	10,0%	35	70,0%	
ApoC-IV	**≤8,04**	22	73,3%	19	38,0%	0,002
	8,05+	8	26,7%	31	62,0%	
ApoF	**9,30+**	23	76,7%	12	24,0%	<0,001
	≤9,29	7	23,3%	38	76,0%	
ApoH	**8,61+**	18	60,0%	13	26,0%	0,003
	≤8,60	12	40,0%	37	74,0%	
ApoM	**≤9,33**	26	86,7%	6	12,0%	<0,001
	9,34+	4	13,3%	44	88,0%	
CETP	**≤7,92**	15	50,0%	7	14,0%	<0,001
	7,93+	15	50,0%	43	86,0%	
CST3	**8,10+**	17	56,7%	13	26,0%	0,006
	≤8,09	13	43,3%	37	74,0%	
GC	**8,12 +**	24	80,0%	15	30,0%	<0,001
	≤ 8,12	6	20,0%	35	70,0%	
GPLD1	**≤7,19**	27	90,0%	24	48,0%	<0,001
	7,20+	3	10,0%	26	52,0%	
HBB	**7,61+**	26	86,7%	7	14,0%	<0,001
	≤7,60	4	13,3%	43	86,0%	
HPHPR	**≤7,86**	25	83,3%	12	24,0%	<0,001
	7,87+	5	16,7%	38	76,0%	
LCAT	**<8,51**	19	63,3%	18	36,0%	0,018
	≥8,51	11	36,7%	32	64,0%	
PLTP	**≤ 8,27**	24	80,0%	11	22,0%	<0,001
	8,28+	6	20,0%	39	78,0%	
PCSK9	**<7,21**	25	83,3%	2	4,0%	<0,001
	≥7,21	5	16,7%	48	96,0%	
SAA1	**≤8,76**	25	83,3%	19	38,0%	<0,001
	8,77+	5	16,7%	31	62,0%	
SAA4	**≤8,96**	24	80,0%	8	16,0%	<0,001
	8,97+	6	20,0%	42	84,0%	
TF	**≤8,41**	27	90,0%	29	58,0%	0,002
	8,42+	3	10,0%	21	42,0%	

Dados expressos em frequência absoluta (n) e relativa (%), Teste de Qui-quadrado de Pearson.

Anexo 9: Análise discriminante da proteômica da HDL_3 para capacidade de discriminação entre indivíduos controles e com diabetes tipo 1.

					Classificação do Coeficiente da Função	
Proteômica HDL_3	**Força de discriminação**	**GL1 (Número de variáveis)**	**GL2 (Número de indivíduos)**	***P***	**Controle**	**Controle**
ApoA-I	87,74	1	78	0,000	-120,2	-116,5
HBB	63,23	2	77	0,000	737,6	745,0
APMAP	47,93	3	76	0,000	43,4	40,4
LCAT	41,52	4	75	0,000	12,9	7,5
PCSK9	35,57	5	74	0,000	-65,7	-62,6

Os proteomas presentes maximizam a menor razão F entre os grupos Controle e DM1.

Abreviatura: GL – grau de liberdade

Anexo 10: Correlação entre variáveis clínicas e laboratoriais e o efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos mediado por HDL em indivíduos com diabetes tipo 1.

Variável	Efluxo de 14C-colesterol de macrófagos mediado pela HDL_2	Efluxo de 14C-colesterol de macrófagos mediado pela HDL_3
Dados clínicos		
Idade	r = -0,28 (*P* = 0,06)	r = -0,26 (*P* = 0,08)
Idade ao diagnóstico de DM1	r = -0,03 (*P* = 0,83)	r = -0,16 (*P* = 0,31)
Tempo de diagnóstico de DM1	r = -0,26 (*P* = 0,17)	r = -0,07 (*P* = 0,65)
IMC	r = -0,16 (*P* = 0,30)	r = -0,03 (*P* = 0,85)
Circunferência abdominal	r = -0,16 (*P* = 0,30)	r = -0,16 (*P* = 0,30)
Exames laboratoriais		
HbA1c	r = -0,08 (*P* = 0,61)	r = 0,08 (*P* = 0,59)
Frutosamina	r = 0,05 (*P* = 0,75)	r = 0,20 (*P* = 0,22)
CT	r = -0,16 (*P* = 0,30)	r = -0,04 (*P* = 0,81)
HDL-c	r = -0,29 (*P* = 0,06)	r = -0,03 (*P* = 0,83)
LDL-c	r = 0,06 (*P* = 0,72)	r = 0,09 (*P* = 0,55)
TG	r = 0,12 (*P* = 0,43)	r = -0,04 (*P* = 0,79)
Albuminúria	r = -0,34 (*P* = 0,02)	r = 0,21 (*P* = 0,16)
eTFG	r = -0,03 (*P* = 0,02)	r = -0,07 (*P* = 0,64)
Testes vasculares		
VOP	r = -0,15 (*P* = 0,45)	r = 0,01 (*P* = 0,97)
VMF dependente de endotélio	r = -0,12 (*P* = 0,54)	r = 0,17 (*P* = 0,41)
VMF independente de endotélio	r = -0,14 (*P* = 0,50)	r = 0,19 (*P* = 0,39)

Teste de correlação de Pearson. Coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância (*P*).
Abreviaturas: CT – colesterol total, eTFG – taxa de filtração glomerular estimada, HDL-c – HDL-colesterol, IMC – índice de massa corpórea, LDL-c – LDL-colesterol, VMF - vasodilatação mediada por fluxo, VOP - velocidade de onda de pulso.

Anexo 11: Correlação entre variáveis clínicas e laboratoriais e o efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos mediado por HDL em controles.

Variável	Efluxo de 14C-colesterol de macrófagos mediado pela HDL_2	Efluxo de 14C-colesterol de macrófagos mediado pela HDL_3
Dados clínicos		
Idade	r = -0,08 (*P* = 0,69)	r = 0,31 (*P* = 0,10)
IMC	r = -0,07 (*P* = 0,75)	r = 0,17 (*P* = 0,39)
Circunferência abdominal	r = -0,02 (*P* = 0,94)	r = -0,01 (*P* = 0,96)
Exames laboratoriais		
HbA1c	r = 0,00 (*P* = 0,99)	r = -0,04 (*P* = 0,84)
Frutosamina	r = 0,17 (*P* = 0,41)	r = 0,21 (*P* = 0,27)
CT	r = 0,19 (*P* = 0,35)	r = 0,30 (*P* = 0,11)
HDL-c	r = 0,06 (*P* = 0,78)	r = 0,31 (*P* = 0,10)
LDL-c	r = 0,20 (*P* = 0,32)	r = 0,29 (*P* = 0,12)
TG	r = 0,19 (*P* = 0,35)	r = 0,02 (*P* = 0,92)
eTFG	r = -0,08 (*P* = 0,69)	r = -0,36 (*P* = 0,06)
Testes vasculares		
VOP	r = 0,01 (*P* = 0,97)	r = -0,03 (*P* = 0,89)
VMF dependente de endotélio	r = 0,20 (*P* = 0,32)	r = -0,21 (*P* = 0,28)

Teste de correlação de Pearson. Coeficiente de correlação de Pearson (r) e significância (*P*). Abreviaturas: CT – colesterol total, eTFG – taxa de filtração glomerular estimada, HDL-c – HDL-colesterol, IMC – índice de massa corpórea, LDL-c – LDL-colesterol, VMF - vasodilatação mediada por fluxo, VOP - velocidade de onda de pulso.

8. REFERÊNCIAS

1. De Ferranti SD, De Boer IH, Fonseca V, Fox CS, Golden SH, Lavie CJ, et al. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: A scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. Vol. 37, Diabetes Care. 2014. 2843–2863 p.
2. Klein BEK, Klein R, McBride PE, Cruickshanks KJ, Palta M, Knudtson MD, et al. Cardiovascular Disease, Mortality, and Retinal Microvascular Characteristics in Type 1 Diabetes: Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. Arch Intern Med. 2004;164:1917–24.
3. Gerstein HC, Werstuck GH. Dysglycaemia, vasculopenia, and the chronic consequences of diabetes. Vol. 1, The Lancet Diabetes and Endocrinology. 2013. p. 71–8.
4. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. Diabetes Care [Internet]. 2018;41(Suppl 1):S13–27. Available from: http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc18-S002%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29222373
5. Lee SI, Patel M, Jones CM, Narendran P. Cardiovascular disease and type 1 diabetes: Prevalence, prediction and management in an ageing population. Ther Adv Chronic Dis [Internet]. 2015;6(6):347–74. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4622313/pdf/10.1177_2040622315598502.pdf
6. Nathan DM, Bayless M, Cleary P, Genuth S, Gubitosi-Klug R, Lachin JM, et al. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Advances and Contributions. Diabetes. 2013;62(12):3976–86.
7. Secrest AM, Becker DJ, Kelsey SF, LaPorte RE, Orchard TJ. Cause-specific mortality trends in a large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes. Diabetes. 2010;59(12):3216–22.

8. Libby P, Nathan DM, Abraham K, Brunzell JD, Fradkin JE, Haffher SM, et al. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on cardiovascular complications of type 1 diabetes mellitus. Circulation. 2005;111(25):3489–93.
9. Morrish NJ, Wang S-LL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. Diabetologia [Internet]. 2001;44(S2):S14–21. Available from: http://link.springer.com/10.1007/PL00002934
10. Orchard TJ, Costacou T, Kretowski A, Nesto RW. Type 1 diabetes and coronary artery disease. Diabetes Care. 2006;29(11):2528–38.
11. Guy J, Ogden L, Wadwa RP, Hamman RF, Mayer-Davis EJ, LIese AD, et al. Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: The SEARCH for diabetes in youth case-control study. Diabetes Care. 2009;32(3):416–20.
12. Vergès B. Cardiovascular disease in type 1 diabetes: A review of epidemiological data and underlying mechanisms. Diabetes Metab. 2020;46(6):442–9.
13. Soedamah-Muthu SS, Fuller JH, Mulnier HE, Raleigh VS, Lawrenson RA, Colhoun HM. All-cause mortality rates in patients with type 1 diabetes mellitus compared with a non-diabetic population from the UK general practice research database, 1992-1999. Diabetologia. 2006;49(4):660–6.
14. Lee SI, Patel M, Jones CM, Narendran P. Cardiovascular disease and type 1 diabetes: prevalence, prediction and management in an ageing population. Ther Adv Chronic Dis [Internet]. 2015;6(6):347–74. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4622313/pdf/10.1177_2040622315598502.pdf
15. Schofield J, Ho J, Soran H. Cardiovascular Risk in Type 1 Diabetes Mellitus. Diabetes Ther. 2019;10(3):773–89.
16. Lind M, Svensson A-M, Kosiborod M, Gudbjörnsdottir S, Pivodic A, Wedel H, et al. Glycemic Control and Excess Mortality in Type 1 Diabetes. N Engl J Med. 2014;371(21):1972–82.

17. Koivisto VA, Stevens LK, Mattock M, Ebeling P, Muggeo M, Stephenson J, et al. Cardiovascular disease and its risk factors in IDDM in Europe. EURODIAB IDDM Complications Study Group. Diabetes Care. 1996;19(7):689–97.
18. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. N Engl J Med [Internet]. 1993;329(14):977–86. Available from: http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199309303291401
19. Nathan DM, Cleary PA, Backlund J-YC, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. N Engl J Med [Internet]. 2005;353(25):2643–53. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2637991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract
20. Sharma H, Lencionia M, Narendranb P. Cardiovascular disease in type 1 diabetes. Cardiovasc Endocrinol Metab. 2019;8(1):28–34.
21. Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic neuropathy: A position statement by the American diabetes association. Diabetes Care. 2017;40(1):136–54.
22. Martin CL, Albers JW, Pop-Busui R. Neuropathy and related findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. Diabetes Care. 2014;37(1):31–8.
23. Pop-Busui R, Low PA, Waberski BH, Martin CL, Albers JW, Feldman EL, et al. Effects of Prior Intensive Insulin Therapy on Cardiac Autonomic Nervous System Function in Type 1 Diabetes Mellitus. Circulation. 2009;119(22):2886–93.
24. Moţăţaianu A, Maier S, Bajko Z, Voidazan S, Bălaşa R, Stoian A. Cardiac autonomic neuropathy in type 1 and type 2 diabetes patients. BMC Neurol. 2018;18(1):126.
25. Admoni SN, Santos-Bezerra DP, Perez RV, Patente TA, Monteiro MB, Cavaleiro AM, et al. Glutathione peroxidase 4 functional variant rs713041 modulates the risk for cardiovascular autonomic neuropathy in individuals

with type 1 diabetes. Diabetes Vasc Dis Res. 2019;16(3):297–9.
26. Faludi A, Izar M, Saraiva J, Chacra A, Bianco H, Afiune Neto A, et al. Atualização Da Diretriz Brasileira De Dislipidemias E Prevenção Da Aterosclerose – 2017. Arq Bras Cardiol. 2017;109(2 Suppl. 1):1–76.
27. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(2):168–75.
28. Toth PP. Subclinical atherosclerosis: What it is, what it means and what we can do about it. Int J Clin Pract. 2008;62(8):1246–54.
29. Femlak M, Gluba-Brzózka A, Ciałkowska-Rysz A, Rysz J. The role and function of HDL in patients with diabetes mellitus and the related cardiovascular risk. Lipids Health Dis. 2017;16(1):207.
30. Feitosa ACR, Maranhão RC, Feitosa Filho GS, Wajchenberg BL. Transferência de lípides para a lipoproteína de alta densidade (HDL) em mulheres com diabetes melito tipo 1. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009;53(1):95–101.
31. Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. Clin Biochem Rev. 2005;26(2):19–39.
32. Vergès B. Lipid disorders in type 1 diabetes. Diabetes Metab [Internet]. 2009;35(5):353–60. Available from: http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes-complications-pathogenesis-and-alternative-treatments/lipid-disorders-in-type-1-diabetes%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733492
33. Nikkilä EA. High Density Lipoproteins in Diabetes. Diabetes. 1981;30(Suppl 2):82–7.
34. Eckel RH, Albers JJ, Cheung MC, Wahl PW, Lindgren FT, Bierman EL. High density lipoprotein composition in insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes. 1981;30(2):132–8.
35. Maahs D, Maniatis A, Nadeau K, Wadwa R, McFann K, Klingensmith G. Total cholesterol and high-density lipoprotein levels in pediatric subjects with type 1 diabetes mellitus. J Pediatr. 2005;147:544–6.
36. Perségol L, Foissac M, Lagrost L, Athias A, Gambert P, Vergès B, et al. HDL particles from type 1 diabetic patients are unable to reverse the inhibitory effect of oxidised LDL on endothelium-dependent

vasorelaxation. Diabetologia. 2007;50(11):2384–7.

37. Howard B V. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. J Lipid Res. 1987;28(6):613–28.

38. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol. Circulation. 2019;139:e1082–e1143.

39. American Diabetes Association. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes - 2020. Diabetes Care. 2020;43(Suppl. 1):S111–34.

40. Vistisen D, Andersen GS, Hansen CS, Hulman A, Henriksen JE, Bech-Nielsen H, et al. Prediction of first cardiovascular disease event in type 1 diabetes mellitus the steno type 1 risk engine. Circulation. 2016;133(11):1058–66.

41. Hippisley-Cox J, Coupland C, Brindle P. Development and validation of QRISK3 risk prediction algorithms to estimate future risk of cardiovascular disease: Prospective cohort study. BMJ. 2017;357(May):j2099.

42. Gourgari E, Dabelea D, Rother K. Modifiable Risk Factors for Cardiovascular Disease in Children with Type 1 Diabetes: Can Early Intervention Prevent Future Cardiovascular Events? Curr Diab Rep. 2017;17(12):134.

43. Jenkins A, Januszewski A, O'Neal D. The early detection of atherosclerosis in type 1 diabetes: Why, how and what to do about it. Cardiovasc Endocrinol Metab. 2019;8:14–27.

44. Prenner SB, Chirinos JA. Arterial stiffness in diabetes mellitus. Atherosclerosis [Internet]. 2015;238(2):370–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558032

45. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, et al. Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. Eur Heart J [Internet]. 2006;27(21):2588–605. Available from: papers://490fc991-209f-415a-8b63-00fbb1df9aa5/Paper/p5706

46. Wu C-F. Therapeutic modification of arterial stiffness: An update and comprehensive review. World J Cardiol [Internet]. 2015;7(11):742. Available from: http://www.wjgnet.com/1949-8462/full/v7/i11/742.htm
47. Shirwany NA, Zou M. Arterial stiffness: a brief review. Acta Pharmacol Sin [Internet]. 2010;31(10):1267–76. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/aps.2010.123
48. Semba RD, Sun K, Schwartz A V, Varadhan R, Harris TB, Satterfield S, et al. Serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, is associated with arterial stiffness in older adults. J Hypertens [Internet]. 2015;33(4):797–803; discussion 803. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25915884%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4458067
49. Sims TJ, Rasmussen LM, Oxlund H, Bailey AJ. The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening. Diabetologia. 1996;39(8):946–51.
50. Van Bortel LM, Laurent S, Boutouyrie P, Chowienczyk P, Cruickshank JK, De Backer T, et al. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. In: Journal of Hypertension. 2012. p. 445–8.
51. Mitchell GF, Hwang S-J, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, et al. Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. Circulation [Internet]. 2010;121(4):505–11. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083680%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2836717
52. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM. Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. In: Hypertension. 2001. p. 938–42.
53. Townsend RR, Wilkinson IB, Schiffrin EL, Avolio AP, Chirinos JA, Cockcroft JR, et al. Recommendations for Improving and Standardizing Vascular Research on Arterial Stiffness: A Scientific Statement from the American Heart Association. Hypertension. 2015;66(3):698–722.
54. Brooks B, Molyneaux L, Yue DK. Augmentation of Central Arterial Pressure in Type 1 Diabetes. Diabetes Care. 1999;22:1722–1727.

55. Urbina EM, Wadwa RP, Davis C, Snively BM, Dolan LM, Daniels SR, et al. Prevalence of Increased Arterial Stiffness in Children with Type 1 Diabetes Mellitus Differs by Measurement Site and Sex: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. J Pediatr. 2010;156(5).
56. Llauradó G, Ceperuelo-Mallafré V, Vilardell C, Simó R, Freixenet N, Vendrell J, et al. Arterial stiffness is increased in patients with type 1 diabetes without cardiovascular disease: A potential role of low-grade inflammation. Diabetes Care. 2012;35(5):1083–9.
57. George B, Bantwal G, Ayyar V, Mathew V. Occurrence of increased arterial stiffness in a cohort of adult patients with type 1 diabetes mellitus when compared to Normoglycemic controls. J Diabetes Sci Technol. 2015;9(1):138–44.
58. Berry KL, Skyrme-Jones R a, Cameron JD, O'Brien RC, Meredith IT. Systemic arterial compliance is reduced in young patients with IDDM. Am J Physiol [Internet]. 1999;276(6 Pt 2):H1839-45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10362661
59. Giannattasio C, Failla M, Piperno A, Grappiolo A, Gamba P, Paleari F, et al. Early impairment of large artery structure and function in Type I diabetes mellitus. Diabetologia. 1999;42(8):987–94.
60. Romney JS, Lewanczuk RZ. Vascular compliance is reduced in the early stages of type 1 diabetes. Diabetes Care. 2001;24(12):2102–6.
61. Rönnback M, Fagerudd J, Forsblom C, Pettersson-Fernholm K, Reunanen A, Groop PH. Altered age-related blood pressure pattern in type 1 diabetes. Circulation. 2004;110(9):1076–82.
62. da Silva KS, Pinto PR, Fabre NT, Gomes DJ, Thieme K, Okuda LS, et al. N-acetylcysteine counteracts adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance elicited by advanced glycated albumin in healthy rats. Front Physiol. 2017;8(SEP).
63. Schram MT, Chaturvedi N, Fuller JH, Stehouwer CD, EURODIAB Prospective Complications Study Group. Pulse pressure is associated with age and cardiovascular disease in type 1 diabetes: the Eurodiab Prospective Complications Study. J Hypertens [Internet]. 2003;21(11):2035–44. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597846

64. Gordin D, Wadén J, Forsblom C, Thorn L, Rosengård-Bärlund M, Tolonen N, et al. Pulse pressure predicts incident cardiovascular disease but not diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes (The FinnDiane Study). Diabetes Care. 2011;34(4):886–91.

65. Prince CT, Secrest AM, Mackey RH, Arena VC, Kingsley LA, Orchard TJ. Pulse wave analysis and prevalent cardiovascular disease in type 1 diabetes. Atherosclerosis. 2010;213(2):469–74.

66. Schnell O, Cappuccio F, Genovese S, Standl E, Valensi P, Ceriello A. Type 1 diabetes and cardiovascular disease. Cardiovasc Diabetol. 2013;12(1):156.

67. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001;414(6865):813–20.

68. Chiesa ST, Charakida M, McLoughlin E, Nguyen HC, Georgiopoulos G, Motran L, et al. Elevated high-density lipoprotein in adolescents with Type 1 diabetes is associated with endothelial dysfunction in the presence of systemic inflammation. Eur Heart J. 2019;40(43):3559–66.

69. Llauradó G, Ceperuelo-Mallafré V, Vilardell C, Simó R, Albert L, Berlanga E, et al. Impaired endothelial function is not associated with arterial stiffness in adults with type 1 diabetes. Diabetes Metab [Internet]. 2013;39(4):355–62. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23643350

70. Charakida M, Masi S, Lüscher TF, Kastelein JJP, Deanfield JE. Assessment of atherosclerosis: The role of flow-mediated dilatation. Eur Heart J. 2010;31(23):2854–61.

71. Zhang L, Gong DX, Li SH, Zhou XL. Meta-analysis of the effects of statin therapy on endothelial function in patients with diabetes mellitus. Atherosclerosis. 2012;223:78–85.

72. Bertoluci M, Ce G, DaSilva A, Wainstein M, Boff W, Punales M. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. World J Diabetes2015 [Internet]. 2015;6(5):679–92. Available from: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medl&NE

WS=N&AN=21073045%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=21073045

73. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Circulation [Internet]. 1993;88(6):2510–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8080489

74. Cé GV, Rohde LE, Da Silva AMV, Puñales MK, De Castro AC, Bertoluci MC. Endothelial dysfunction is related to poor glycemic control in adolescents with type 1 diabetes under 5 years of disease: Evidence of metabolic memory (Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (2011) 95, (1493-1499)). J Clin Endocrinol Metab. 2011;96:1493–9.

75. Zenere BM, Arcaro G, Saggiani F, Rossi L, Muggeo M, Lechi A. Noninvasive detection of functional alterations of the arterial wall in IDDM patients with and without microalbuminuria. Diabetes Care. 1995;18(7):975–82.

76. Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, et al. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. J Am Coll Cardiol [Internet]. 1996;28(3):573–9. Available from: http://www.biomednet.com/db/medline/96368733

77. Lockhart CJ, Agnew CE, McCann A, Hamilton PK, Quinn CE, McCall DO, et al. Impaired flow-mediated dilatation response in uncomplicated Type 1 diabetes mellitus: influence of shear stress and microvascular reactivity. Clin Sci (Lond) [Internet]. 2011;121(3):129–39. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345174

78. Babar GS, Zidan H, Widlansky ME, Das E, Hoffmann RG, Daoud M, et al. Impaired endothelial function in preadolescent children with type 1 diabetes. Diabetes Care. 2011;34(3):681–5.

79. Singh TP, Groehn H, Kazmers A. Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus. J Am Coll Cardiol [Internet]. 2003;41(4):661–5. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(02)02894-2

80. do Nascimento AMM de A, Sequeira IJ, Vasconcelos DF, Gandolfi L,

Pratesi R, Nóbrega YK de M. Endothelial dysfunction in children with type 1 diabetes mellitus. Arch Endocrinol Metab. 2017;61(5):476–83.

81. Mahmud FH, Earing MG, Lee RA, Lteif AN, Driscoll DJ, Lerman A. Altered endothelial function in asymptomatic male adolescents with type 1 diabetes. Congenit Heart Dis. 2006;1(3):98–103.

82. Rostampour N, Fekri K, Hashemi-Dehkordi E, Obodiat M. Association between vascular endothelial markers and carotid intima-media thickness in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. J Clin Diagnostic Res. 2017;11(9):SC01–5.

83. Tacito LHB, Pires AC, Yugar-Toledo JC. Impaired flow-mediated dilation response and carotid intima-media thickness in patients with type 1 diabetes mellitus with a mean disease duration of 4.1 years. Arch Endocrinol Metab. 2017;61(6):542–9.

84. Rohatgi A, Westerterp M, von Eckardstein A, Remaley A, Rye K-A. HDL in the 21st Century: A Multifunctional Roadmap for Future HDL Research. Circulation [Internet]. 2021 Jun 8;143(23):2293–309. Available from: https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.044221

85. Wong NKP, Nicholls SJ, Tan JTM, Bursill CA. The role of high-density lipoproteins in diabetes and its vascular complications. Int J Mol Sci. 2018;19(6):1680.

86. Gordon SM, Hofmann S, Askew DS, Davidson WS. High density lipoprotein: It’s not just about lipid transport anymore. Trends Endocrinol Metab. 2011;22(1):9–15.

87. Massey JB, Pownall HJ, Macha S, Morris J, Tubb MR, Silva RAGD. Mass spectrometric determination of apolipoprotein molecular stoichiometry in reconstituted high density lipoprotein particles. J Lipid Res. 2009;50(6):1229–36.

88. Sacks FM., Jensen MK. From high-density lipoprotein cholesterol to measurements of function: Prospects for the development of tests for high-density lipoprotein functionality in cardiovascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018;38(3):487–99.

89. Ossoli A, Simonelli S, Vitali C, Franceschini G, Calabresi L. Role of LCAT in Atherosclerosis. J Atheroscler Thromb [Internet]. 2015;23(2):119–27.

Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607351
90. Gälman C, Arvidsson I, Angelin B, Rudling M. Monitoring hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase activity by assay of the stable bile acid intermediate 7alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in peripheral blood. J Lipid Res. 2003;44:859–66.
91. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki I V., Billheimer JT, Rothblat GH, et al. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. J Clin Invest. 2007;117(8):2216–24.
92. Superko HR, Pendyala L, Williams PT, Momary KM, King SB, Garrett BC. High-density lipoprotein subclasses and their relationship to cardiovascular disease. J Clin Lipidol. 2012;6(6):496–523.
93. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. Vol. 17, Trends in Molecular Medicine. 2011. p. 594–603.
94. Dullaart RPF, Dallinga-Thie GM, Wolffenbuttel BHR, Van Tol A. CETP inhibition in cardiovascular risk management: A critical appraisal. Eur J Clin Invest. 2007;37:90–8.
95. Forti N, Diament J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica. Atualização para os clínicos. Arq Bras Cardiol. 2006;87(5):671–9.
96. Furtado JD, Yamamoto R, Melchior JT, Andraski AB, Gamez-Guerrero M, Mulcahy P, et al. Distinct Proteomic Signatures in 16 HDL (High-Density Lipoprotein) Subspecies. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018;38(12):2827–42.
97. Han R, Lai R, Ding Q, Wang Z, Luo X, Zhang Y, et al. Apolipoprotein A-I stimulates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism. Diabetologia. 2007;50(9):1960–8.
98. Manjunatha S, Distelmaier K, Dasari S, Carter RE, Kudva YC, Nair KS. Functional and proteomic alterations of plasma high density lipoproteins in type 1 diabetes mellitus. Metabolism. 2016;65(9):1421–31.
99. Chang CT, Yang CY, Tsai FJ, Lin SY, Chen CJ. Mass spectrometry-based proteomic study makes high-density lipoprotein a biomarker for

atherosclerotic vascular disease. Biomed Res Int. 2015;2015:164846.
100. Shao B, Heinecke JW. Quantifying HDL proteins by mass spectrometry: how many proteins are there and what are their functions? Vol. 15, Expert Review of Proteomics. 2018. p. 31–40.
101. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. J Clin Invest. 2007;117(3):746–56.
102. Ronsein GE, Vaisar T. Deepening our understanding of HDL proteome. Expert Rev Proteomics. 2019;16(9):749–60.
103. The Davidson/ Shah Lab: HDL Proteome Watch [Internet]. [cited 2021 Jun 11]. Available from: https://homepages.uc.edu/~davidswm/HDLproteome.html
104. Birner-Gruenberger R, Schittmayer M, Holzer M, Marsche G. Understanding high-density lipoprotein function in disease: Recent advances in proteomics unravel the complexity of its composition and biology. Prog Lipid Res. 2014;56:36–46.
105. Lee CJ, Choi S, Cheon DH, Kim KY, Cheon EJ, Ann S jin, et al. Effect of two lipid-lowering strategies on high-density lipoprotein function and some HDL-related proteins: a randomized clinical trial. Lipids Health Dis. 2017;16:49.
106. Gordon SM, McKenzie B, Kemeh G, Sampson M, Perl S, Young NS, et al. Rosuvastatin alters the proteome of high density lipoproteins: Generation of alpha-1-antitrypsin enriched particles with anti-inflammatory properties. Mol Cell Proteomics. 2015;14(12):3247–57.
107. Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998;18(9):1450–5.
108. Frej C, Mendez AJ, Ruiz M, Castillo M, Hughes TA, Dahlbäck B, et al. A Shift in ApoM/S1P between HDL-Particles in Women with Type 1 Diabetes Mellitus Is Associated with Impaired Anti-Inflammatory Effects of the ApoM/S1P Complex. Arterioscler Thromb Vasc Biol.

2017;37(6):1194–205.
109. Costacou T, Evans RW, Orchard TJ. High-density lipoprotein cholesterol in diabetes: Is higher always better? J Clin Lipidol. 2011;5(5):387–94.
110. Orchard TJ, Olson JC, Erbey JR, Williams K, Forrest KYZZ, Kinder LS, et al. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the Pittsburgh epidemiology of diabetes complications study. Diabetes Care. 2003;26(5):1374–9.
111. Groop P-HH, Thomas MC, Rosengård-Bärlund M, Mills V, Rönnback M, Thomas S, et al. HDL composition predicts new-onset cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. Diabetes Care. 2007;30(10):2706–7.
112. Steno Diabetes Center. Steno T1 Risk Engine [Internet]. [cited 2020 Aug 20]. Available from: https://steno.shinyapps.io/T1RiskEngine/
113. ClinRisk. QRISK3 [Internet]. 2018 [cited 2020 Aug 3]. Available from: https://qrisk.org/three/index.php
114. Bezerra DP dos S. Identificação associados às epigenéticos crônicas em portadores de diabetes mellitus tipo 1 [Tese de doutorado]. Universidade de São Paulo; 2018.
115. Admoni S. O polimorfismo de um único nucleotídeo rs713041 no gene GPX4 modula a susceptibilidade à neuropatia autonômica cardiovascular em portadores de diabetes mellitus tipo 1 [Tese de doutorado]. Universidade de São Paulo; 2017.
116. Ewing DJ, Martyn CN, Young RJ, Clarke BF. The value of cardiovascular autonomic function tests: 10 years experience in diabetes. Diabetes Care. 1985;8(5):491–8.
117. Vinik A, Erbas T. Diabetic autonomic neuropathy. Handb Clin Neurol. 2013;117:279–94.
118. Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, et al. Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. Diabetes Care. 2010;33(10):2285–2293.
119. Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of

low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18(6):499–502.

120. Martin SS, J BM, Elshazly MB, Toth PP, Kwiterovich PO, Blumenthal RS, et al. Comparison of a Novel Method vs the Friedewald Equation for Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels From the Standard Lipid Profile. JAMA J Am Med Assoc. 2013;310(19):2061–8.
121. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med. 2009;150(9):604–12.
122. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: A report of the international brachial artery reactivity task force. J Am Coll Cardiol. 2002;39(2):257–65.
123. O'Rourke MF, Mancia G. Arterial stiffness. J Hypertens. 1999;17(1).
124. Martinez LRC, Miname MH, Bortolotto LA, Chacra APM, Rochitte CE, Sposito AC, et al. No correlation and low agreement of imaging and inflammatory atherosclerosis' markers in familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 2008;200(1):83–8.
125. Villacorta H, Bortolotto LA, Arteaga E, Mady C. Aortic distensibility measured by pulse-wave velocity is not modified in patients with Chagas' disease. J Negat Results Biomed. 2006;5.
126. Drager LF, Bortolotto LA, Lorenzi MC, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. Am J Respir Crit Care Med. 2005;172(5):613–8.
127. Hanon O, Luong V, Mourad JJ, Bortolotto LA, Jeunemaitre X, Girerd X. Aging, carotid artery distensibility, and the Ser422Gly elastin gene polymorphism in humans. In: Hypertension. 2001. p. 1185–9.
128. Drager LF, Bortolotto LA, Figueiredo AC, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Effects of continuous positive airway pressure on early signs of atherosclerosis in obstructive sleep apnea. Am J Respir Crit Care Med. 2007;176(7):706–12.
129. Rhee MY, Lee HY, Bae Park J. Measurements of arterial stiffness:

Methodological aspects. Vol. 38, Korean Circulation Journal. 2008. p. 343–50.
130. Redgrave TG, Roberts DCK, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. Anal Biochem. 1975;65(1–2):42–9.
131. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1):248–54.
132. Ronsein GE, Pamir N, von Haller PD, Kim DS, Oda MN, Jarvik GP, et al. Parallel reaction monitoring (PRM) and selected reaction monitoring (SRM) exhibit comparable linearity, dynamic range and precision for targeted quantitative HDL proteomics. J Proteomics. 2015;113:388–99.
133. Hoofnagle AN, Becker JO, Oda MN, Cavigiolio G, Mayer P, Vaisar T. Multiple-reaction monitoring-mass spectrometric assays can accurately measure the relative protein abundance in complex mixtures. Clin Chem. 2012;58(4):777–81.
134. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. Nat Protoc. 2007;2(8):1896–906.
135. UniProt Consortium. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D506–15.
136. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. Nat Biotechnol. 2008;26(12):1367.
137. Silva ARM, Toyoshima MTK, Passarelli M, Di Mascio P, Ronsein GE. Comparing Data-Independent Acquisition and Parallel Reaction Monitoring in Their Abilities to Differentiate High-Density Lipoprotein Subclasses. J Proteome Res. 2020;19(1):248–59.
138. MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, et al. Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. Bioinformatics. 2010;26(7):966–8.
139. Machado AP, Pinto RS, Moysés ZP, Nakandakare ER, Quintão ECRR, Passarelli M. Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of

HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(3):392–403.

140. Simes RJ. An improved bonferroni procedure for multiple tests of significance. Biometrika. 1986;73(3):751–4.
141. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J R Stat Soc Ser B. 1995;57(1):289–300.
142. Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. Ann Stat. 2001;29(4):1165–88.
143. Terlemez S, Bulut Y, Ünüvar T, Tokgöz Y, Eryilmaz U, Çelik B. Evaluation of arterial stiffness in children with type 1 diabetes using the oscillometric method. J Diabetes Complications. 2016;84(2):168–73.
144. Wang P, Xu YY, Lv TT, Guan SY, Li XMXP, Li XMXP, et al. Subclinical Atherosclerosis in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. Angiology. 2019;70(2):141–59.
145. Llauradó G, Cano A, Albert L, Ballesta S, Mazarico I, Luchtenberg MF, et al. Arterial stiffness is highly correlated with the scores obtained from the Steno Type 1 Risk Engine in subjects with T1DM. PLoS One. 2019;14(9):e0220206.
146. Liatis S, Alexiadou K, Tsiakou A, Makrilakis K, Katsilambros N, Tentolouris N. Cardiac autonomic function correlates with arterial stiffness in the early stage of type 1 diabetes. Exp Diabetes Res. 2011;2011.
147. Ganjali S, Dallinga-Thie GM, Simental-Mendía LE, Banach M, Pirro M, Sahebkar A. HDL functionality in type 1 diabetes. Atherosclerosis [Internet]. 2017;267:99–109. Available from: https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.018
148. Center for Computational Mass Spectrometry. Mass Spectometry Interactive Virtual Environment (MassIVE) [Internet]. [cited 2021 Aug 14]. Available from: https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/massive.jsp
149. Gourgari E, Ma J, Playford MP, Mehta NN, Goldman R, Remaley AT, et al. Proteomic alterations of HDL in youth with type 1 diabetes and their associations with glycemic control: A case-control study. Cardiovasc Diabetol. 2019;18(1):43.

150. De Oliveira V do N, Lima-Neto ABM, van Tilburg MF, Monteiro-Moreira AC de O, Lobo MDP, Rondina D, et al. Proteomic analysis to identify candidate biomarkers associated with type 1 diabetes. Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther. 2018;11:289–301.
151. Zhou L, Li C, Gao L, Wang A. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). Mol Med Rep. 2015;12(3):4015–21.
152. Colhoun HM, Taskinen MR, Otvos JD, Van Den Berg P, O'Connor J, Van Tol A. Relationship of phospholipid transfer protein activity to HDL and apolipoprotein B-containing lipoproteins in subjects with and without type 1 diabetes. Diabetes. 2002;51(11):3300–5.
153. Tai ES, Ordovas JM. Clinical significance of apolipoprotein A5. Curr Opin Lipidol. 2008;19(4):349–354.
154. Dallinga-Thie GM, Van Tol A, Hattori H, Van Vark-Van Der Zee LC, Jansen H, Sijbrands EJG. Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes. Diabetologia. 2006;49(7):1505–11.
155. Davidson WS, Silva RAGD, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined hdl subpopulations reveals particle-specific protein clusters: Relevance to antioxidative function. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(6):870–6.
156. Bouillet B, Gautier T, Aho LS, Duvillard L, Petit JM, Lagrost L, et al. Plasma apolipoprotein C1 concentration is associated with plasma triglyceride concentration, but not visceral fat, in patients with type 2 diabetes. Diabetes Metab [Internet]. 2016;42(4):263–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2016.01.003
157. Bouillet B, Gautier T, Rouland A, Duvillard L, Petit J-M, Lagrost L, et al. Plasma apolipoprotein C1 concentration is associated with plasma triglyceride concentration but not with visceral fat and liver fat content in people with type 1 diabetes. Acta Diabetol. 2019;56(10):1155–7.
158. Novak EM, Bydlowski SP. Biologia Molecular das Dislipidemias. Variação Genética das Apolipoproteínas. Arq Bras Cardiol. 1996;67(6):411–7.
159. Wang Z, Li S, Sun L, Fan J, Liu Z. Comparative Analyses of Lipoprotein Lipase, Hepatic Lipase, and Endothelial Lipase, and Their Binding Properties with Known Inhibitors. PLoS One. 2013;8(8):e72146.

160. Wolska A, Dunbar RL, Freeman LA, Ueda M, Amar MJ, Sviridov DO, et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. Atherosclerosis. 2017;267:49–60.
161. Panarotto D, Rémillard P, Bouffard L, Maheux P. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. Eur J Clin Invest. 2002;32(2):84–92.
162. Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: An overview. Clin Chim Acta. 1999;286(1–2):145–61.
163. Kei AA, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Elisaf MS. A review of the role of apolipoprotein C-II in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease. Metabolism [Internet]. 2012;61(7):906–21. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2011.12.002
164. Kanter JE, Shao B, Kramer F, Barnhart S, Shimizu-Albergine M, Vaisar T, et al. Increased apolipoprotein C3 drives cardiovascular risk in type 1 diabetes. J Clin Invest. 2019;129(10):4165–79.
165. Kotite L, Zhang LH, Yu Z, Burlingame AL, Havel RJ. Human apoC-IV: Isolation, characterization, and immunochemical quantification in plasma and plasma lipoproteins. J Lipid Res. 2003;44(7):1387–94.
166. Xu S, Cheng J, Li NH, Chen YN, Cai MY, Tang SS, et al. The association of APOC4 polymorphisms with premature coronary artery disease in a Chinese Han population. Lipids Health Dis. 2015;14:63.
167. Kothari V. HDL associated apolipoprotein C4 in cardiovascular complications of type 1 diabetes [Internet]. Diabetes Pro - American Diabetes Association. 2018 [cited 2020 Sep 18]. Available from: https://professional.diabetes.org/rdb/hdl-associated-apolipoprotein-c4-cardiovascular-complications-type-1-diabetes
168. von Toerne C, Laimighofer M, Achenbach P, Beyerlein A, Gala T de las H, Krumsiek J, et al. Peptide serum markers in islet autoantibody-positive children. Diabetologia. 2017;60(2):287–95.
169. Provost PR, Villeneuve L, Weech PK, Milne RW, Marcel YL, Rassart E. Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. J Lipid Res. 1991;32:1959–70.

170. Perdomo G, Henry Dong H. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. Aging (Albany NY). 2009;1(1):17–27.
171. Wei YJ, Huang YX, Zhang XL, Li J, Huang J, Zhang H, et al. Apolipoprotein D as a novel marker in human end-stage heart failure: A preliminary study. Biomarkers. 2008;13(5):535–48.
172. Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. J Lipid Res. 2009;50:S156–S161.
173. Wang YX, Halks-Miller M, Vergona R, Sullivan ME, Fitch R, Mallari C, et al. Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2000;278(2):H428-34.
174. Burt MG, Roberts GW, Aguilar-Loza NR, Frith P, Stranks SN. Continuous monitoring of circadian glycemic patterns in patients receiving prednisolone for COPD. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(6):1789–96.
175. Liu Y, Morton RE. Apolipoprotein F: a natural inhibitor of cholesteryl ester transfer protein and a key regulator of lipoprotein metabolism. Curr Opin Lipidol. 2020;31(4):194–199.
176. Mulya A, Seo J, Brown AL, Gebre AK, Boudyguina E, Shelness GS, et al. Apolipoprotein M expression increases the size of nascent pre β HDL formed by ATP binding cassette transporter A1. J Lipid Res. 2010;51:514–24.
177. Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M. Apolipoprotein M is required for preβ-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. Nat Med. 2005;11:418–22.
178. Luo G, Zhang X, Nilsson-Ehle P, Xu N. Apolipoprotein M. Lipids Health Dis. 2004;3(Ldl):21.
179. Borup A, Christensen PM, Nielsen LB, Christoffersen C. Apolipoprotein M in lipid metabolism and cardiometabolic diseases. Curr Opin Lipidol. 2015;26(1):48–55.
180. Zhang X, Jiang B, Luo G, Nilsson-Ehle P, Xu N. Hyperglycemia down-regulates apolipoprotein M expression in vivo and in vitro. Biochim

Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids. 2007;1771(7):879–82.
181. Nojiri T, Kurano M, Tokuhara Y, Ohkubo S, Hara M, Ikeda H, et al. Modulation of sphingosine-1-phosphate and apolipoprotein M levels in the plasma, liver and kidneys in streptozotocin-induced diabetic mice. J Diabetes Investig. 2014;5(6):639–48.
182. Mughal SA, Park R, Nowak N, Gloyn AL, Karpe F, Matile H, et al. Apolipoprotein M can discriminate HNF1A-MODY from Type 1 diabetes. Diabet Med. 2013;30(2):246–50.
183. Brorsson C, Hansen NT, Lage K, Bergholdt R, Brunak S, Pociot F. Identification of T1D susceptibility genes within the MHC region by combining protein interaction networks and SNP genotyping data. Diabetes, Obes Metab. 2009;11(SUPPL. 1):60–6.
184. Zhang X, Mao S, Luo G, Wei J, Berggren-Söderlund M, Nilsson-Ehle P, et al. Effects of simvastatin on apolipoprotein M in vivo and in vitro. Lipids Health Dis. 2011;10:112.
185. Armitage J, Holmes M V., Preiss D. Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition for Preventing Cardiovascular Events: JACC Review Topic of the Week. J Am Coll Cardiol. 2019;73(4):477–87.
186. Feitosa ACR, Feitosa-Filho GS, Freitas FR, Wajchenberg BL, Maranhão RC. Lipoprotein metabolism in patients with type 1 diabetes under intensive insulin treatment. Lipids Health Dis. 2013;12:15.
187. Chang CK, Tso TK, Snook JT, Huang YS, Lozano RA, Zipf WB. Cholesteryl ester transfer and cholesterol esterification in type 1 diabetes: Relationships with plasma glucose. Acta Diabetol. 2001;38:37–42.
188. Shao B, Zelnick LR, Wimberger J, Himmelfarb J, Brunzell J, Davidson WS, et al. Albuminuria, the HDL Proteome, and Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes: the DCCT/EDIC Study. Arter Thromb Vasc Biol. 2019;39(7):1483–1491.
189. Schulz R, Schluter K, Laufs U. Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). Basic Res Cardiol. 2015;110(2):4.
190. Bojanin D, Vekic J, Milenkovic T, Vukovic R, Zeljkovic A, Stefanovic A, et al. Association between proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9)

and lipoprotein subclasses in children with type 1 diabetes mellitus: Effects of glycemic control. Atherosclerosis. 2019;280:14–20.

191. Levenson AE, Wadwa RP, Shah AS, Khoury PR, Kimball TR, Urbina EM, et al. PCSK9 is increased in youth with type 1 diabetes. Diabetes Care. 2017;40(7):e85–7.
192. Buck M, Gouwy M, Wang J, Snick J, Opdenakker G, Struyf S, et al. Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. Curr Med Chem. 2016;23(17):1725–55.
193. Vaisar T, Tang C, Babenko I, Hutchins P, Wimberger J, Suffredini AF, et al. Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. J Lipid Res [Internet]. 2015;56(8):1519–30. Available from: http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M059089
194. Yassine HN, Trenchevska O, He H, Borges CR, Nedelkov D, Mack W, et al. Serum amyloid A truncations in type 2 diabetes mellitus. PLoS One. 2015;10(1):e0115320.
195. Picheth G, Bresolin PL, Pereira Jr. O, Jaworski MCG, Santos CM, Pinto AP, et al. Mucoproteína versus alfa-1-glicoproteína ácida: o que quantificar? J Bras Patol e Med Lab. 2002;38(2):87–91.
196. Han S, Lone MA, Schneiter R, Chang A. Orm1 and Orm2 are conserved endoplasmic reticulum membrane proteins regulating lipid homeostasis and protein quality control. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(13):5851–6.
197. Luo Z, Lei H, Sun Y, Liu X, Su DF. Orosomucoid, an acute response protein with multiple modulating activities. J Physiol Biochem. 2015;71(2):329–40.
198. Othman A, Bianchi R, Alecu I, Wei Y, Porretta-Serapiglia C, Lombardi R, et al. Lowering plasma 1-deoxysphingolipids improves neuropathy in diabetic rats. Diabetes. 2015;64(3):1035–45.
199. Klein CJ. Solving the riddle of the sphinx may provide new insights into diabetes and polyneuropathy. Diabetes. 2015;64:706–8.
200. Dohrn MF, Othman A, Hirshman SK, Bode H, Alecu I, Fähndrich E, et al. Elevation of plasma 1-deoxy-sphingolipids in type 2 diabetes mellitus: A

susceptibility to neuropathy? Eur J Neurol. 2015;0:1–9.
201. Engström G, Hedblad B, Eriksson KF, Janzon L, Lindgärde F. Complement C3 is a risk factor for the development of diabetes: A population-based cohort study. Diabetes. 2005;54:570–575.
202. Rasmussen KL, Nordestgaard BG, Nielsen SF. Complement C3 and risk of diabetic microvascular disease: A cohort study of 95202 individuals from the general population. Clin Chem. 2018;64(7):1113–24.
203. Buono C, Come CE, Witztum JL, Maguire GF, Connelly PW, Carroll M, et al. Influence of C3 deficiency on atherosclerosis. Circulation. 2002;105(25):3025–31.
204. Carter AM. Complement Activation: An Emerging Player in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. Scientifica (Cairo). 2012;402783.
205. Ma Y, Liu Y, Zhang Z, Yang GY. Significance of complement system in ischemic stroke: A comprehensive review. Aging Dis. 2019;10(2):429–62.
206. Fehérvári M, Krepuska M, Széplaki G, Apor A, Sótonyi P, Prohászka Z, et al. The level of complement C3 is associated with the severity of atherosclerosis but not with arterial calcification in peripheral artery disease. Int Angiol. 2014;33(1):35–41.
207. Széplaki G, Prohászka Z, Duba J, Rugonfalvi-Kiss S, Karádi I, Kókai M, et al. Association of high serum concentration of the third component of complement (C3) with pre-existing severe coronary artery disease and new vascular events in women. Atherosclerosis. 2004;177(2):383–9.
208. Nielsen MJ, Moestrup SK. Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: Roles beyond heme scavenging. Blood. 2009;114(4):764–71.
209. MacKellar M, Vigerust DJ. Role of haptoglobin in health and disease: A focus on diabetes. Clin Diabetes. 2016;34(3):148–57.
210. Watanabe J, Grijalva V, Hama S, Barbour K, Berger FG, Navab M, et al. Hemoglobin and its scavenger protein haptoglobin associate with ApoA-1-containing particles and influence the inflammatory properties and function of high density lipoprotein. J Biol Chem. 2009;284:18292–18301.
211. Mehta NU, Reddy ST. Role Of Hemoglobin/Heme Scavenger Protein

Hemopexin In Atherosclerosis And Inflammatory Diseases. Curr Opin Lipidol. 2015;26(5):384–7.
212. Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. Front Pharmacol. 2015;6:222.
213. Ilhan A, Gartner W, Nabokikh A, Daneva T, Majdic O, Cohen G, et al. Localization and characterization of the novel protein encoded by C20orf3. Biochem J. 2008;414(3):485–95.
214. Hicks MA, Barber AE, Giddings LA, Caldwell J, O'Connor SE, Babbitt PC. The evolution of function in strictosidine synthase-like proteins. Proteins Struct Funct Bioinforma. 2011;79(11):3082–98.
215. Albrektsen T, Richter HE, Clausen JT, Fleckner J. Identification of a novel integral plasma membrane protein induced during adipocyte differentiation. Biochem J. 2001;359(Pt 2):393–402.
216. Ferretti G, Bacchetti T, Busni D, Rabini RA, Curatola G. Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: A comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(6):2957–62.
217. Meneses MJ, Silvestre R, Sousa-Lima I, Macedo MP. Paraoxonase-1 as a regulator of glucose and lipid homeostasis: Impact on the onset and progression of metabolic disorders. Int J Mol Sci. 2019;20(16):4049.
218. Gugliucci A, Menini T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. Clin Chim Acta [Internet]. 2015;439:5–13. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.09.016
219. Vrablik M, Hubacek JA. Genetic determination of triglyceridemia with special focus on apolipoprotein gene variants. Clin Lipidol. 2010;5(4):543–54.
220. Yang N, Qin Q. Apolipoprotein J: A new predictor and therapeutic target in cardiovascular disease? Chin Med J (Engl). 2015;128(18):2530–4.
221. Sato N. The Emerging Role of the Apolipoproteins APOE and APOJ in the Interaction Between Diabetes and Alzheimer Disease. J Clin Endocrinol Metab. 2020;105(11):e4181–e4182.
222. Park S, Mathis KW, Lee IK. The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases. Rev Endocr Metab

Disord. 2014;15:45–53.
223. Sivamurthy N, Stone DH, LoGerfo FW, Quist WC. Apolipoprotein J inhibits the migration, adhesion, and proliferation of vascular smooth muscle cells. J Vasc Surg. 2001;34:716–23.
224. Magalhães J, Saraiva MJ. Clusterin overexpression and its possible protective role in transthyretin deposition in familial amyloidotic polyneuropathy. J Neuropathol Exp Neurol. 2011;70(12):1097–106.
225. Golizeh M, Lee K, Ilchenko S, Ösme A, Bena J, Sadygov RG, et al. Increased serotransferrin and ceruloplasmin turnover in diet-controlled patients with type 2 diabetes. Free Radic Biol Med [Internet]. 2017;113:461–9. Available from: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.373
226. Swaminathan S, Fonseca VA, Alam MG, Shah S V. The role of iron in diabetes and its complications. Diabetes Care. 2007;30(7):1926–33.
227. Ellervik C, Mandrup-Poulsen T, Andersen HU, Tybjærg-Hansen A, Frandsen M, Birgens H, et al. Elevated Transferrin Saturation and Risk of Diabetes - Three population-based studies. Diabetes Care. 2011;34(10):2256–8.
228. Metz TO, Qian WJ, Jacobs JM, Gritsenko MA, Moore RJ, Polpitiya AD, et al. Application of proteomics in the discovery of candidate protein biomarkers in a diabetes autoantibody standardization program sample subset. J Proteome Res. 2008;7(2):698–707.
229. Comucci EB, Vasques ACJ, Geloneze B, Calixto AR, Pareja JC, Tambascia MA. Serum levels of retinol binding protein 4 in women with different levels of adiposity and glucose tolerance. Arq Bras Endocrinol Metab. 2014;58(7):709–14.
230. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. N Engl J Med. 2006;354:2552–63.
231. Zhou W, Ye SD, Chen C, Wang W. Involvement of RBP4 in Diabetic Atherosclerosis and the Role of Vitamin D Intervention. J Diabetes Res. 2018;7329861.
232. Jourdan M, Jaleel A, Karakelides H, Ford GC, Kahn BB, Nair KS. Impact

of type 1 diabetes and insulin treatment on plasma levels and fractional synthesis rate of retinol-binding protein 4. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(12):5125–30.

233. Tan MI, Hisana AN, Ridwan A, Fitri LL, Fajar PA. Diabetes and Retinol-Binding Protein (RBP4): The Study of Free and Exosomal RBP4 in Blood Plasma and Urine of Patients. Biomed Pharmacol J. 2020;13(2):693–9.
234. Prapunpoj P, Leelawatwattana L. Evolutionary changes to transthyretin: structure–function relationships. FEBS J. 2009;276(19):5330–5341.
235. Liz MA, Gomes CM, Saraiva MJ, Sousa MM. ApoA-I cleaved by transthyretin has reduced ability to promote cholesterol efflux and increased amyloidogenicity. J Lipid Res. 2007;48(11):2385–95.
236. Refai E, Dekki N, Yang SN, Imreh G, Cabrera O, Yu L, et al. Transthyretin constitutes a functional component in pancreatic β-cell stimulus-secretion coupling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(47):17020–5.
237. Vieira M, Saraiva MJ. Transthyretin: A multifaceted protein. Biomol Concepts. 2014;5(1):45–54.
238. Mazzeo A, Russo M, Di Bella G, Minutoli F, Stancanelli C, Gentil L, et al. Transthyretin-Related Familial Amyloid Polyneuropathy (TTR-FAP): A Single-Center Experience in Sicily, an Italian Endemic Area. J Neuromuscul Dis. 2015;2:S39–S48.
239. Kapoor M, Rossor AM, Laura M, Reilly MM. Clinical presentation, diagnosis and treatment of TTR amyloidosis. J Neuromuscul Dis. 2019;6:189–99.
240. Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, Elliott PM, Merlini G, Waddington-Cruz M, et al. Tafamidis treatment for patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. N Engl J Med. 2018;379:1007–16.
241. Bouillon R, Schuit F, Antonio L, Rastinejad F. Vitamin D Binding Protein: A Historic Overview. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;10(January):1–21.
242. de la Guía-Galipienso F, Martínez-Ferran M, Vallecillo N, Lavie CJ, Sanchis-Gomar F, Pareja-Galeano H. Vitamin D and cardiovascular health. Clin Nutr. 2021;40(5):2946–57.
243. Lisowska-Myjak B, Jóźwiak-Kisielewska A, Łukaszkiewicz J, Skarżyńska

E. Vitamin D-binding protein as a biomarker to confirm specific clinical diagnoses. Expert Rev Mol Diagn [Internet]. 2020;20(1):49–56. Available from: https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1699064

244. Jassil NK, Sharma A, Bikle D, Wang X. Vitamin D binding protein and 25-hydroxyvitamin D levels: Emerging clinical applications. Endocr Pract. 2017;23(5):605–13.

245. Nyomba BL, Bouillon R, Bidingija M, Kandjingu K, De Moor P. Vitamin D metabolites and their binding protein in adult diabetic patients. Diabetes. 1986;35(8):911–5.

246. Rocchiccioli S, G. Andreassi M, Cecchettini A, Carpeggiani C, L'Abbate A, Citti L. Correlation between vitamin D binding protein expression and angiographic-proven coronary artery disease. Coron Artery Dis. 2012;23(7):426–31.

247. Dimova R, Chakarova N, Kirilov G, Grozeva G, Shinkov A, Tankova T. Vitamin D binding protein is related to cardiac autonomic function and metabolic status in prediabetes. Nutr Res [Internet]. 2020;75:56–66. Available from: https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.12.008

248. Lebenthal Y, Brener A, Hershkovitz E, Shehadeh N, Shalitin S, Lewis EC, et al. A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter study evaluating the efficacy and safety of alpha-1 antitrypsin (AAT) (glassia®) in the treatment of recent-onset type 1 diabetes. Int J Mol Sci. 2019;20(23):6032.

249. Czyzyk J, Henegariu O, Preston-Hurlburt P, Baldzizhar R, Fedorchuk C, Esplugues E, et al. Enhanced Anti-Serpin Antibody Activity Inhibits Autoimmune Inflammation in Type 1 Diabetes. J Immunol. 2012;188(12):6319–27.

250. Fleixo-Lima G, Ventura H, Medini M, Bar L, Strauss P, Lewis EC. Mechanistic evidence in support of alpha1-antitrypsin as a therapeutic approach for type 1 diabetes. J Diabetes Sci Technol. 2014;8(6):1193–1203.

251. Fähndrich S, Biertz F, Karch A, Kleibrink B, Koch A, Teschler H, et al. Cardiovascular risk in patients with alpha-1-antitrypsin deficiency. Respir Res. 2017;18:171.

252. Fries E, Blom AM. Bikunin - Not just a plasma proteinase inhibitor. Int J Biochem Cell Biol. 2000;32:125–37.
253. Pugia MJ, Valdes Jr. R, Jortani SA. Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance and measurement. Adv Clin Chem. 2007;223–45.
254. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 22833874, Aprotinin. PubChem.
255. Brown JR, Toler AWJ, Kramer RS, Clive Landis R. Anti-inflammatory effect of aprotinin: A meta-analysis. J Extra Corpor Technol. 2009;41(2):79–86.
256. Fiseha T, Tamir Z. Urinary Markers of Tubular Injury in Early Diabetic Nephropathy. Int J Nephrol. 2016;2016:4647685.
257. Bourebaba L, Marycz K. Pathophysiological Implication of Fetuin-A Glycoprotein in the Development of Metabolic Disorders: A Concise Review. J Clin Med. 2019;8(12):2033.
258. Mathews ST, Rakhade S, Zhou X, Parker GC, Coscina D V., Grunberger G. Fetuin-null mice are protected against obesity and insulinresistance associated with aging. Biochem Biophys Res Commun. 2006;350:437–443.
259. Deeg MA, Bierman EL, Cheung MC. GPI-specific phospholipase D associates with an apoA-I- and apoA-IV-containing complex. J Lipid Res. 2001;42(3):442–51.
260. Schofield JN, Stephens JW, Hurel SJ, Bell KM, DeSouza JB, Rademacher TW. Insulin reduces serum glycosylphosphatidylinositol phospholipase D levels in human type I diabetic patients and streptozotocin diabetic rats. Mol Genet Metab. 2002;75(2):154–61.
261. Nishimura K, Murakami T, Sakurai T, Miyoshi M, Kurahashi K, Kishi S, et al. Circulating Apolipoprotein L1 is associated with insulin resistance-induced abnormal lipid metabolism. Sci Rep. 2019;9:14869.
262. Wan G, Zhaorigetu S, Liu Z, Kaini R, Jiang Z, Hu CAA. Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. J Biol Chem. 2008;283(31):21540–9.
263. Siemens TA, Riella MC, Moraes TP de, Riella CV. APOL1 risk variants

and kidney disease: what we know so far. J Bras Nefrol. 2018;40(4):388–402.

264. Vaisar T, Kanter JE, Wimberger J, Irwin AD, Gauthier J, Wolfson E, et al. High concentration of medium-sized HDL particles and enrichment in HDL paraoxonase 1 associate with protection from vascular complications in people with long-standing type 1 diabetes. Diabetes Care. 2020;43(1):178–86.