

Transferências Lipídicas para HDL em Diabéticos Tipo 2: Associações com Microalbuminúria, Estatina e Insulina

Lipid Transfer to HDL in Type-2 Diabetic Patients: Associations with Microalbuminuria, Statin and Insulin

Gilson Soares Feitosa-Filho, Talita de Mattos Seydell, Alina Coutinho Rodrigues Feitosa, Raul Cavalcante Maranhão, José Antônio Franchini Ramires

Instituto do Coração (InCor), Hospital do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP - Brasil

Resumo

Fundamento: O diabetes melito tipo 2 (DM2) é um fator de risco isolado para coronariopatia, principalmente quando associado à microalbuminúria (MA). Alterações estruturais e funcionais das lipoproteínas não são totalmente esclarecidas nesse contexto.

Objetivo: Avaliar a transferência de lipídios para HDL (T) em pacientes DM2 e a associação com a presença da MA e com o tratamento com estatina ou insulina.

Métodos: Estudamos 33 pacientes com DM2 e 34 controles pareados para idade. Uma nanoemulsão lipídica artificial radiomarcada com ^3H -Triglicéride (TG) e ^{14}C -colesterol livre (CL) ou ^3H -colesterol éster (CE) e ^{14}C -fosfolípide (FL) foi incubada com plasma. A nanoemulsão e as lipoproteínas foram precipitadas, exceto a HDL, que teve sua radioatividade contada.

Resultados: A TFL (%) foi maior no grupo com DM2 que no grupo-controle ($25,2 \pm 3,2$ e $19,7 \pm 3,2$ respectivamente; $p < 0,001$), assim como a TCL (%): $9,1 \pm 2,7$ e $6,3 \pm 1,5$ respectivamente; $p < 0,001$. O diagnóstico de MA não se associou a mudanças da propriedade de transferência. O uso da insulina associou-se à menor TFL (%): $23,5 \pm 2,1$ contra $26,1 \pm 3,3$; $p = 0,018$. Já o uso da estatina associou-se à queda de todas - TCE (%): $3,5 \pm 0,9$; TFL (%): $23,8 \pm 2,0$; TTG (%): $3,9 \pm 0,8$; TCL (%): $7,4 \pm 1,3$ - quando comparado ao grupo que não usava estatina (TCE (%): $5,9 \pm 2,4$; TFL (%): $26,9 \pm 3,6$; TTG (%): $6,4 \pm 2,2$; TCL (%): $11,1 \pm 2,6$).

Conclusão: O DM2 aumentou a transferência de lipídios de superfície para HDL, enquanto o uso de estatina diminuiu todas as transferências de lipídios. A presença de MA não se associou às alterações das transferências de lipídios. (Arq Bras Cardiol 2009;92(2):100-106)

Palavras-chave: Colesterol HDL, lipoproteínas, diabetes melito tipo 2, insulina, inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutase, albuminúria, nefropatias diabéticas.

Summary

Background: Type-2 diabetes mellitus (T2DM) is an isolated risk factor for coronary artery disease, especially when associated with microalbuminuria (MA). Structural and functional changes in lipoproteins have not yet been fully elucidated in this context.

Objective: To assess lipid transfer (T) to HDL in type-2 diabetic patients and its association with microalbuminuria and treatment with statins or insulin.

Methods: Thirty-three patients with type-2 diabetes mellitus and 34 age-matched control subjects were studied. A synthetic cholesterol-rich nanoemulsion radiolabeled with ^3H - triglycerides (TG) and ^{14}C -free cholesterol (FC) or ^3H - cholesterol ester (CE) and ^{14}C -phospholipids (PL) was incubated with plasma. Both the nanoemulsion and lipoproteins were precipitated, except for HDL, which was counted for radioactivity.

Results: PLT (%) was higher in the T2DM group than in the control group (25.2 ± 3.2 and 19.7 ± 3.2 respectively; $p < 0.001$), as was free cholesterol (% FC): 9.1 ± 2.7 and 6.3 ± 1.5 respectively; $p < 0.001$. The diagnosis of microalbuminuria (MA) was not associated with changes in lipid transfers. Insulin therapy was associated with lower PLT rates: 23.5 ± 2.1 versus 26.1 ± 3.3 ; $p = 0.018$. Statin therapy, in turn, was associated with a drop in all lipid transfers - CET 3.5 ± 0.9 ; PLT: 23.8 ± 2.0 ; TGT: 3.9 ± 0.8 ; FCT: 7.4 ± 1.3 - as compared to the group that was not on statin therapy (CET: 5.9 ± 2.4 ; PLT: 26.9 ± 3.6 ; TGT: 6.4 ± 2.2 ; FCT: 11.1 ± 2.6).

Conclusion: Type-2 diabetes mellitus increased lipid transfer to HDL particles, whereas statin therapy decreased all lipid transfers. The presence of MA was not associated with changes in lipid transfer. (Arq Bras Cardiol 2009;92(2):94-100)

Key words: Cholesterol, HDL; lipoproteins; diabetes mellitus, type 2; insulin; hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors; albuminuria; diabetic nephropathies.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Gilson Soares Feitosa-Filho •

Alameda dos Antúrios, 212/402 - Candéal - 40296-530 - Salvador, BA - Brasil

E-mail: gilsonfilho@cardiol.br

Artigo enviado em 16/01/08; revisado recebido em 25/02/08; aceito em 04/03/08.

Introdução

O diabetes melito tipo 2 (DM2) é importante fator de risco cardiovascular, sendo a aterosclerose sua principal causa de óbito. A dislipidemia do DM2 caracteriza-se por hipertrigliceridemia, HDL colesterol reduzido e aumento da subfração pequena e densa da LDL^{1,2}. Em pacientes com DM2, o uso de estatinas reduz bastante o risco de eventos cardiovasculares³⁻⁵. A presença de microalbuminúria aumenta o maior risco de desenvolvimento de doença arterial coronária^{6,7}.

As classes de lipoproteínas são constituídas por diferentes proporções de triglicérides e colesterol esterificado em seu núcleo hidrofóbico, e fosfolípidos e colesterol livre em sua superfície anfipática, onde se localizam as apolipoproteínas. A HDL apresenta atividade antiaterosclerótica, e o mecanismo pelo qual exerce esse papel ainda não é totalmente compreendido. O transporte reverso de colesterol é o principal mecanismo aventado. No entanto, outros mecanismos como ações antiinflamatórias, antitrombóticas e antioxidativas^{8,9} parecem ter participação na função protetora da HDL.

O transporte reverso de colesterol é o processo no qual o excesso de colesterol dos tecidos periféricos é removido para excreção pelo fígado. A lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) participa desse transporte ao catalisar a esterificação do colesterol, permitindo seu deslocamento para o núcleo hidrofóbico da partícula.

As lipoproteínas plasmáticas trocam lípidos constantemente, processo que é facilitado pelas proteínas de transferência, como a proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), que medeia a troca de ésteres de colesterol, triglicérides e fosfolípidos entre as lipoproteínas¹⁰ e a proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP), que auxilia na transferência de fosfolípidos e colesterol de outras lipoproteínas ricas para a HDL^{11,12}.

Os pacientes com DM2 parecem ter maior atividade de PLTP^{13,14} e maior transferência de ésteres de colesterol^{15,16}. Não há uma definição quanto à participação da presença de microalbuminúria na atividade das proteínas de transferência¹⁷. Por sua vez, alguns estudos mostram redução da atividade de CETP e de PLTP com o uso de estatinas¹⁸⁻²¹ e insulina²²⁻²⁶.

As transferências lipídicas também dependem de vários outros fatores. A concentração de cada subclasse de lipoproteína influencia nessas trocas, uma vez que estas dependem das colisões das partículas lipoprotéicas. As composições lipídica e protéica da partícula e as concentrações de diversas outras proteínas plasmáticas podem influenciar no processo.

A complexa relação entre transferência lipídica e aterogênese ainda não está esclarecida. No metabolismo plasmático da HDL, as transferências lipídicas têm um papel fundamental remodelando constantemente as partículas das lipoproteínas e, com isso, interferindo nos seus diversos aspectos funcionais.

O objetivo deste estudo foi avaliar em pacientes com DM2 a transferência simultânea para a HDL dos quatro principais lípidos que constituem sua estrutura, colesterol livre, éster de

colesterol, triglicérides e fosfolípidos. Além disso, verificar a influência da presença de microalbuminúria e do tratamento com estatina ou insulina sobre as transferências lipídicas.

Métodos

Trinta e três pacientes voluntários portadores de diabetes melito tipo 2 foram selecionados dos ambulatórios do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP) e do Ambulatório de Diabetes do Serviço de Diabetes da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Foram excluídos indivíduos em uso de inibidores de proteases, drogas imunossupressoras, corticóides, transplantados, cirróticos, portadores de neoplasias, tireoidopatas e portadores de creatinina sérica > 1,5 mg/dl. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento pós-informado. As coletas de sangue e de urina foram feitas no Laboratório de Metabolismo de Lípidos, no InCor. Os ensaios funcionais da HDL (transferência de lípidos) foram realizados nesse mesmo laboratório. As amostras urinárias foram analisadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas, e as amostras de sangue tiveram as determinações bioquímicas realizadas no Laboratório do InCor.

Como grupo-controle foram selecionados 34 indivíduos que fazem parte de um banco de dados do Laboratório de Metabolismo de Lípidos, pareados para idade. Esses indivíduos não apresentam comorbidades e não fazem uso de medicações. Desse grupo, foram excluídos todos os indivíduos que tivessem glicemia de jejum maior ou igual a 100 mg/dl.

A avaliação dos participantes foi feita por meio de história clínica, enfatizando a busca por antecedentes patológicos e medicações em uso. A avaliação laboratorial foi feita por meio de coleta de sangue e por duas ou três coletas de amostra urinária em dias diferentes para mensuração da relação de microalbuminúria/creatininúria.

Determinações bioquímicas séricas

Foram realizadas as determinações bioquímicas dos pacientes diabéticos e indivíduos-controle - colesterol total (CT), frações (VLDL, LDL e HDL), triglicérides (TG) e glicemia de jejum - em amostras de soro obtidas após 12 horas de jejum pelo método colorimétrico-enzimático, COD-PAD (Labtest). O colesterol de LDL foi determinado pela fórmula de Friedewald²⁷: $LDLc = CT - (VLDLc + HDLc)$, em mg/dl, onde o VLDLc é obtido pela divisão da concentração dos triglicérides por 5. Para a determinação da hemoglobina glicada, foi utilizado sangue total, pelo método imunoturbidimétrico no laboratório de análises clínicas do InCor-HCFMUSP.

A determinação da microalbuminúria foi feita na primeira amostra isolada de urina da manhã, pelo método de nefelometria, no Laboratório Central do Hospital das Clínicas. Na mesma amostra, era mensurada a creatinina urinária. Assim, o valor da relação albumina/creatinina urinária era expresso em mcg/mg de creatinina. Pacientes com relação albuminúria/creatininúria inferior a 30 mcg/mg eram considerados normais, enquanto microalbuminúria foi definida como valores entre 30 e 300 mcg/mg, conforme definido pela *American Diabetes Association*²⁸. Em dias

diferentes, eram coletadas duas amostras urinárias, fora de período menstrual nas mulheres e em pacientes sem sintomas de infecção urinária. Caso os resultados das duas coletas não fossem concordantes, uma terceira coleta era solicitada.

A LDE como ferramenta de investigação

Em estudos prévios, o Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração (InCor-HCFMUSP) tem reproduzido o metabolismo da LDL por meio de uma emulsão feita artificialmente, com composição lipídica parecida com a da LDL natural (LDE)²⁹. O objetivo principal desses estudos tem sido o uso da LDE na investigação das dislipidemias. A LDE não tem proteína, mas, ao entrar em contato com as lipoproteínas naturais, adquire apo E, que pode ser reconhecida pelo receptor da LDL, sendo assim captada pela célula²⁹. A LDE foi preparada segundo a técnica descrita por Ginsburg e cols.³⁰ e modificada por Maranhão e cols.²⁹.

Transferência de colesterol livre, colesterol éster, triglicérides e fosfolípidos da LDE para a HDL

Amostras dos pacientes foram coletadas, após jejum de 12 horas, em EDTA (1,5 g/l), e o plasma foi obtido após 10 minutos de centrifugação, a 3.000 rpm, em centrífuga Sorval RT7. Incubaram-se 2 amostras de 200 µl de plasma com 50 µl da LDE cada, por 60 minutos, a 37°C, em agitador orbital Gyromax 706R, sob agitação de 40 rpm. Cada 50 µl de LDE era marcada radiativamente com ³H-colesterol éster (³H-CE) e ¹⁴C-fosfatidilcolina (¹⁴C-PL), ou ³H-triglicérides (³H-TG) e ¹⁴C-colesterol livre (¹⁴C-CL). Após incubação, foram adicionados às misturas 250 µl de reagente de precipitação de lipoproteínas contendo apo B (sulfato de dextran 0,2%/MgCl₂ 3M, v/v). As misturas foram agitadas em vortex por 30 segundos e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm. A fração HDL foi obtida após precipitação da nanoemulsão, juntamente com as lipoproteínas contendo apo B, com 250 µl dextran/MgCl₂ (0,2% Dextran e 0,3 mol/l MgCl₂). Aliquotas de 250 µl do sobrenadante, contendo a HDL, foram pipetadas em frascos de cintilação. Foram acrescentados a esses frascos 5,0 ml de solução cintiladora Ultima Gold (PerkinElmer, Boston, USA), e, finalmente, a radioatividade presente em cada amostra foi quantificada em contador beta (*Liquid Scintillation Analyzer, Packard 1600 TR, Palo Alto, CA*) com a utilização do software Plus Vers. 5.01 da *Diamond Computers*, para determinação das contagens de ¹⁴C e ³H das amostras. O branco para este experimento consiste da mistura de 200 µl de solução-tampão TRIS-HCl e 50 µl de LDE, incubada e precipitada nas mesmas condições descritas anteriormente. O valor de radioatividade total presente na amostra foi determinado pela incubação de 200 µl de plasma com 50 µl de LDE, seguida de incubação, porém sem adição de reagente de precipitação. A quantificação dos lipídeos transferidos da LDE para HDL plasmática foi expressa como porcentagem (%) em relação à radioatividade total incubada.

Análise estatística

Essa análise foi realizada com o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) for Windows, versão 13.0. As

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

Para testar a normalidade da distribuição das variáveis, aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Como as variáveis apresentavam distribuição não-normal, foram utilizados testes não-paramétricos. Para avaliar a diferença entre as variáveis categóricas, utilizou-se o teste exato de Fisher ou teste do qui-quadrado.

Foram comparados os diabéticos e seus controles, além de subgrupos entre os diabéticos, conforme a presença de microalbuminúria, o uso de estatina e a utilização de insulina. As comparações de variáveis contínuas independentes foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney. Para testar associações, utilizou-se o teste não-paramétrico de Spearman. Foram considerados como estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$, bicaudal.

Resultados

A tabela 1 descreve os dados clínicos, a composição plasmática dos lipídeos e o controle glicêmico em pacientes com DM2 e em indivíduos-controle. A média de idade foi de 55±9 anos no grupo DM2, sem diferença em relação ao grupo-controle.

Não houve diferença nas concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL-C e HDL-C entre o grupo de pacientes com DM2 e o grupo-controle, $p > 0,05$. A concentração plasmática dos triglicérides foi 38% maior ($p < 0,001$), quando comparados com os indivíduos-controle. A glicemia de jejum foi 44% maior no grupo DM2 ($p < 0,001$). Também

Tabela 1 - Dados clínicos, perfil lipídico, controle glicêmico em DM2 e controles

Variáveis	Diabéticos (n = 33)	Controles (n = 34)	p
Idade (anos)	55±9	54±9	0,327
Sexo masculino - n (%)	18 (54,5%)	16 (47,1%)	0,540
CT (mg/dl)	183±40	174±21	0,455
LDLc (mg/dl)	103±37	108±22	0,547
HDLc (mg/dl)	50±13	49±13	0,890
TG (mg/dl)	149±71	92±36	<0,001
GJ (mg/dl)	155±66	87±8	<0,001
HbA1c	7,5±1,4	-	-
IMC (kg/m ²)	31±7	25±3	<0,001
Tempo de DM (anos)	11±7	-	-
Hipertensos - n (%)	22 (66,7%)	0	<0,001
Em uso de estatina - n (%)	18 (54,5%)	0	<0,001
Em uso de insulina - n (%)	10 (30,3%)	0	<0,001
Microalbuminúria - n (%)	9 (27,3%)	-	-

CT - colesterol total; LDLc - colesterol de lipoproteína de baixa densidade; HDLc - colesterol de lipoproteína de alta densidade; TG - triglicéridos; GJ - glicemia de jejum; HbA1c - hemoglobina glicosilada; IMC - índice de massa corpórea.

o índice de massa corpórea foi 19% maior entre os pacientes DM2 ($p < 0,001$).

A tabela 2 mostra os valores em porcentagem de lípidos (éster de colesterol, fosfolípidos, triglicérides e colesterol livre) transferidos da nanoemulsão para a HDL dos pacientes diabéticos e dos indivíduos-controle.

Não houve diferença na transferência de éster de colesterol e triglicérides da nanoemulsão para a HDL nos pacientes diabéticos, quando comparados aos indivíduos-controle. Com relação à transferência de colesterol livre e fosfolípidos, estas se apresentaram aproximadamente 30% e 22% maior no grupo dos pacientes diabéticos, quando comparados com o grupo-controle, respectivamente ($p < 0,001$).

Entre os pacientes diabéticos, não foram encontradas diferenças significativas quanto à presença ou ausência de MA. No entanto, o grupo com MA tinha uma média de idade 13% maior que o grupo sem essa característica ($p = 0,008$). Idade, sexo, prevalência de hipertensão arterial, índice de massa corpórea, uso de estatina ou insulina, perfil lipídico ou glicídico não eram diferentes entre os dois grupos.

Comparando o mesmo grupo com MA com os pacientes sem MA com idade superior a 55 anos, permitiu-se uma comparação entre grupos com idades semelhantes. Mais uma vez não houve nenhuma diferença na transferência lipídica para HDL (tab. 3).

Utilizando a razão microalbuminúria/creatininúria como variável contínua, foi estabelecida a correlação de Spearman

com todas as variáveis contínuas analisadas. Desse modo, uma maior razão microalbuminúria/creatininúria se correlacionou positivamente com idade e hemoglobina glicada, e negativamente com transferência de colesterol livre (tab. 4).

Quanto ao uso ou não de insulino terapia, os grupos apresentavam idade, sexo, índice de massa corpórea, prevalência de hipertensão arterial, perfil lipídico e glicídico semelhantes. Os dois grupos apresentavam uma frequência de uso de estatinas também semelhantes. O fato de usar insulina relacionou-se a uma transferência 10% menor de fosfolípidos para HDL ($p = 0,018$) (fig. 1).

No que se refere ao uso ou não de estatina, percebeu-se que o grupo tratado com essa medicação apresentou uma transferência de todos os lípidos para HDL significativamente menor que o grupo que não usava estatina (fig. 2). Entre os pacientes com DM2 que usam estatina, a transferência de ésteres de colesterol, fosfolípidos, triglicérides e colesterol livre foi, respectivamente, 41%, 12%, 39% e 33% menor que o grupo com DM2 que não usava essa medicação.

Discussão

A contribuição das proteínas associadas à HDL ao processo de geração, maturação e transporte reverso de colesterol tem sido extensivamente estudada. A CETP modula os níveis de HDL e sua composição ao mediar a troca de lípidos neutros (colesterol esterificado e triglicérides) entre HDL e lipoproteínas ricas em triglicérides, além de auxiliar na

Tabela 2 - Transferência de lípidos da LDE para HDL em DM2 e controles

Variáveis	Diabéticos (n = 33)	Controles (n = 34)	p
TCE (%)	4,6±2,1	3,8±1,5	0,074
TFL (%)	25,2±3,2	19,7±3,2	<0,001
TTG (%)	5,1±2,1	4,5±1,5	0,314
TCL (%)	9,1±2,7	6,3±1,5	<0,001

TCE - percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para a HDL; TFL - percentual de transferência de fosfolípidos da LDE para a HDL; TTG - percentual de transferência de triglicéridos da LDE para a HDL; TCL - percentual de transferência de colesterol livre da LDE para a HDL.

Tabela 3 - Transferência de lípidos da LDE para HDL em DM2 quanto ao diagnóstico de microalbuminúria após ajuste para idade

	DM com microalbuminúria (n = 9)	DM sem microalbuminúria (n = 13)	p
TCE (%)	4,5±1,6	4,4±2,5	0,521
TFL (%)	25,2±3,3	25,8±4,1	0,887
TTG (%)	4,7±1,7	5,0±2,5	0,887
TCL (%)	8,4±2,6	9,1±2,9	0,594

TCE - percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para a HDL; TFL - percentual de transferência de fosfolípidos da LDE para a HDL; TTG - percentual de transferência de triglicéridos da LDE para a HDL; TCL - percentual de transferência de colesterol livre da LDE para a HDL.

Tabela 4 - Associações (coeficientes de correlação de Spearman) da microalbuminúria com idade, perfil lipídico, controle glicêmico, dados antropométricos e transferências de lípidos da LDE para HDL

Variáveis	R	P
Idade (anos)	0,45	0,040
CT (mg/dl)	-0,02	0,918
LDLc (mg/dl)	-0,08	0,716
HDLc (mg/dl)	-0,19	0,413
TG (mg/dl)	0,26	0,260
GJ (mg/dl)	0,20	0,388
HbA1c (%)	0,53	0,013
TCE (%)	-0,005	0,982
TFL (%)	-0,08	0,710
TTG (%)	-0,12	0,609
TCL (%)	-0,50	0,024
IMC (kg/m ²)	0,29	0,204
CA (cm)	0,15	0,582
Tempo de diabetes (anos)	0,32	0,160

CT - colesterol total; LDL - colesterol de lipoproteína de baixa densidade; HDLc - colesterol de lipoproteína de alta densidade; TG - triglicéridos; GJ - glicemia de jejum; IMC - índice de massa corpórea; HbA1c - hemoglobina glicada; TCE - percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL; TFL - percentual de transferência de fosfolípidos da LDE para HDL; TTG - percentual de transferência de triglicéridos da LDE para HDL; TCL - percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL; CA - circunferência abdominal.

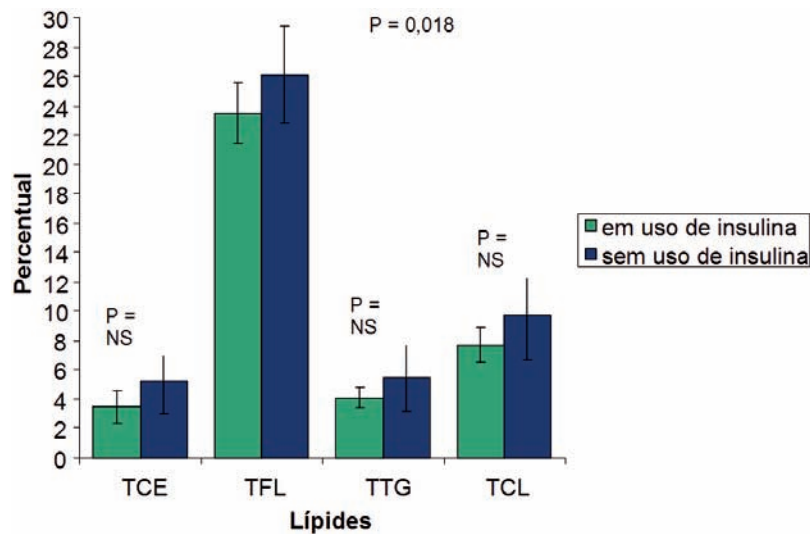


Fig. 1 - Comparação de transferências de lipídes entre diabéticos usuários e não-usuários de insulino terapia. TCE - percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL; TFL - percentual de transferência de fosfolipídios da LDE para HDL; TTG - percentual de transferência de triglicerídios da LDE para HDL; TCL - percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL; NS - não-significativo.

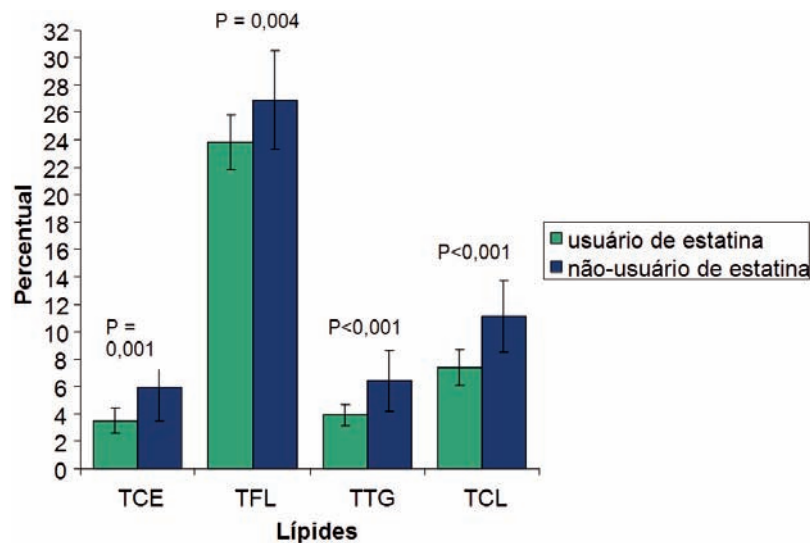


Fig. 2 - Comparação de transferências de lipídes entre diabéticos usuários e não-usuários de estatina. TCE - percentual de transferência de ésteres de colesterol da LDE para HDL; TFL - percentual de transferência de fosfolipídios da LDE para HDL; TTG - percentual de transferência de triglicerídios da LDE para HDL; TCL - percentual de transferência de colesterol livre da LDE para HDL.

transferência de fosfolípidos para a HDL. A CETP é capaz também de liberar apolipoproteínas a partir da HDL na presença de ácidos graxos^{31,32}. A própria PLTP também pode liberar apolipoproteínas da HDL³³. O colesterol éster presente na HDL pode ter duas fontes: 1) pela esterificação de colesterol livre da HDL e 2) a partir de colesterol éster de outra lipoproteína^{34,35}.

A PLTP age transferindo fosfolípidos de superfície para HDL e eventualmente deslocando apo AI das superfícies das partículas^{36,37}. Um importante produto da HDL mediado pela PLTP são as pré-B-HDL pequenas e pobres em lipídes,

que agem como aceptores iniciais de colesterol livre^{38,39}. A apo E (e não a apo AI) é capaz de converter PLTP inativa em sua forma ativa⁴⁰. Esta é uma importante característica a ser lembrada, visto que a LDE é desprovida de apo E quando em contato com o sangue.

O presente estudo traz a possibilidade de estimar, por meio de uma única metodologia, a atividade aceptora da HDL de todos os lipídes de forma simples e ágil. Com isso, foi possível demonstrar que há maior captação de fosfolípidos e colesterol livre pela HDL nos pacientes diabéticos em comparação com indivíduos-controle.

O achado de maior transferência de lípidos de superfície nos pacientes diabéticos sugere maior atividade de PLTP, o que está de acordo com alguns resultados da literatura^{13,14}. Estudos prévios mostram também aumento das taxas de transferência de colesterol éster plasmático^{15,16}.

A relação entre microalbuminúria e dislipidemia em pacientes com diabetes melito tem sido bem explorada. Neste estudo, no entanto, não foram encontradas diferenças na transferência de lípidos para HDL entre pacientes com DM2 com ou sem microalbuminúria. Na literatura, a atividade de CETP não se mostrou alterada em pacientes com microalbuminúria¹⁷.

Entre os pacientes usuários de insulina, a transferência de fosfolípidos para HDL foi menor do que entre os não-usuários, não havendo alteração na transferência dos outros três lípidos. A PLTP é a principal responsável pela transferência de fosfolípidos para a HDL e auxilia com menos intensidade a transferência de colesterol livre para esta lipoproteína. O presente estudo sugere, assim, uma possível correlação entre insulina e atividade de PLTP. Na literatura, embora não haja unanimidade, a maioria dos estudos que se propuseram a investigar a relação entre insulina e atividade de PLTP mostram uma inibição desta última²²⁻²⁶.

A estatina reduziu a captação de todos os lípidos pela HDL. A diminuição da atividade de CETP com uso de estatina tem sido observada em outros estudos. Ela pode fazer isso por três mecanismos distintos: 1) redução da massa de CETP¹⁸, 2) redução das lipoproteínas com as quais a HDL interage¹⁹ e 3) possivelmente por redução na expressão do gene CETP²⁰. Um subestudo do estudo DALI mostrou que o tratamento com estatina é capaz de reduzir a atividade de PLTP, embora aumente a massa de PLTP²¹.

Neste estudo, a atividade acceptora de lípidos da HDL foi avaliada. O outro sentido da troca de lípidos entre as lipoproteínas não está sendo mensurado: não se sabe qual percentual de lípidos da HDL está sendo doado para as outras lipoproteínas. Paradoxalmente, a atividade acceptora da HDL foi associada diretamente com fatores de risco de aterosclerose, e o uso de estatinas reduziu a transferência de todos os lípidos para HDL. Uma hipótese para justificar tal fato seria que a HDL com características de transferências mais compatíveis com bons marcadores estaria associada à menor aquisição e perda de lípidos, e, portanto, seria a HDL mais estável.

Este estudo acrescenta dados ao complexo e ainda não totalmente esclarecido mecanismo de troca de

lípidos entre lipoproteínas. Ao mesmo tempo, permite a identificação da associação do uso de insulina e estatinas com aspectos funcionais da HDL, bem como suas proteínas de transferência.

Limitações do estudo

O diabetes melito é uma patologia que pode apresentar um espectro clínico bastante amplo. Tentou-se uniformizar a população estudada, excluindo pacientes diabéticos sob tratamento exclusivamente não-farmacológico, assim como os que apresentassem evidências de insuficiência renal ou macroalbuminúria.

A despeito disso, reconhece-se como limitação ao estudo um certo grau de heterogeneidade da população dos diabéticos estudados, em que alguns apresentam doença mais avançada ou mais associada a comorbidades, que outros. Além disso, o uso de insulina, estatina ou anti-hipertensivos é observado em parte da população estudada.

Idealmente, a suspensão de medicações que interferissem no metabolismo lipídico ou na microalbuminúria deveria ter sido realizada. O fato de não serem realizadas as análises lipídicas após um período de descontinuação da estatina deveu-se ao entendimento de que ocorreria um descontrole transitório do perfil lipídico numa população com fatores de risco cardiovascular, sem que nenhum benefício pudesse advir dessa suspensão. O mesmo racional explica a não-suspensão de anti-hipertensivos ou hipoglicemiantes dos pacientes.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado por Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte da tese de doutorado de Gilson Soares Feitosa-Filho, pelo Programa de Pós-Graduação em Cardiologia do InCor-HCFMUSP.

Referências

1. Barrett-Connor E, Grundy SM, Holdbrook MJ. Plasma lipids and diabetes mellitus in an adult community. *Am J Epidemiol.* 1982; 115: 657-63.
2. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose/SBC. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 88 (supl. 1): 2-19.
3. Goldberg RB, Mellies MJ, Sacks FM, Mayé LA, Howard BV, Howard WJ, et al. Cardiovascular events and their reduction with pravastatin in diabetic and glucose-intolerant myocardial infarction survivors with average cholesterol levels: subgroup analyses in the cholesterol and recurrent events (CARE) trial. *The Care Investigators. Circulation.* 1998; 98: 2513-9.
4. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2003; 361: 2005-16.
5. Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2004; 364:685-96.

6. Mattock MB, Morrish NJ, Viberti G, Keen H, Fitzgerald AP, Jackson G. Prospective study of microalbuminuria as predictor of mortality in NIDDM. *Diabetes*. 1992; 41: 736-41.
7. Mattock MB, Barnes DJ, Viberti G, Keen H, Burt D, Hughes JM, et al. Microalbuminuria and coronary heart disease in NIDDM: an incidence study. *Diabetes*. 1998; 47: 1786-92.
8. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004; 95: 764-72.
9. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*. 2006; 98: 1352-64.
10. Lagrost L, Athias A, Gambert P, Lallemand C. Comparative study of phospholipid transfer activities mediated by cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein. *J Lipid Res*. 1994; 35: 825-35.
11. Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*. 2001; 155: 269-81.
12. O'Brien KD, Vuletic S, McDonald TO, Wolfbauer G, Lewis K, Tu AY, et al. Cell-associated and extracellular phospholipid transfer protein in human coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2003; 108: 270-4.
13. Desrumaux C, Athias A, Bessède G, Vergès B, Farnier M, Perségol L, et al. Mass concentration of plasma phospholipid transfer protein in normolipidemic, type IIa hyperlipidemic, type IIb hyperlipidemic, and non-insulin-dependent diabetic subjects as measured by a specific ELISA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 266-75.
14. Riemens S, van Tol A, Sluiter W, Dullaart R. Elevated plasma cholesteryl ester transfer in NIDDM: relationships with apolipoprotein B-containing lipoproteins and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis*. 1998; 140: 71-9.
15. Bagdade JD, Lane JT, Subbaiah PV, Otto ME, Ritter MC. Accelerated cholesteryl ester transfer in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1993; 104: 69-77.
16. Elchebly M, Porokhov B, Pulcini T, Berthezene F, Ponsin G. Alterations in composition and concentration of lipoproteins and elevated cholesteryl ester transfer in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Atherosclerosis*. 1996; 123: 93-101.
17. Kahri J, Groop PH, Elliott T, Viberti G, Taskinen MR. Plasma cholesteryl ester transfer protein and its relationship to plasma lipoproteins and apolipoprotein A-I-containing lipoproteins in IDDM patients with microalbuminuria and clinical nephropathy. *Diabetes Care*. 1994; 17: 412-9.
18. Ahnadi CE, Berthezene F, Ponsin G. Simvastatin-induced decrease in the transfer of cholesterol esters from high density lipoproteins to very low and low density lipoproteins in normolipidemic subjects. *Atherosclerosis*. 1993; 99: 219-28.
19. Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, Farnier M, Chapman MJ. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 189-97.
20. Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall A. Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice: dependence on natural flanking sequences. *J Clin Invest*. 1992; 90: 1290-5.
21. Dallinga-Thie GM, van Tol A, Hattori H, Rensen PC, Sijbrands EJ. Plasma phospholipid transfer protein activity is decreased in type 2 diabetes during treatment with atorvastatin: a role for apolipoprotein E? *Diabetes*. 2006; 55: 1491-6.
22. Kaser S, Foger B, Ebenbichler CF, Kirchmair R, Gander R, Ritsch A, et al. Influence of leptin and insulin on lipid transfer proteins in human hepatoma cell line, HepG2. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001; 25: 1633-9.
23. Arai K, Suehiro T, Yamamoto M, Ito H, Hashimoto K. Suppression of plasma cholesteryl ester transfer protein activity in acute hyperinsulinemia and effect of plasma nonesterified fatty acid. *Metabolism*. 1997; 46: 1166-70.
24. Sutherland WH, Walker RJ, Lewis-Barned NJ, Pratt H, Tillmann HC, Tillman HC. The effect of acute hyperinsulinemia on plasma cholesteryl ester transfer protein activity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and healthy subjects. *Metabolism*. 1994; 43: 1362-6.
25. Riemens SC, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP. Plasma phospholipid transfer protein activity is lowered by 24-h insulin and acipimox administration: blunted response to insulin in type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 1999; 48: 1631-7.
26. Riemens SC, van Tol A, Sluiter WJ, Dullaart RP. Plasma phospholipid transfer protein activity is related to insulin resistance: impaired acute lowering by insulin in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia*. 1998; 41: 929-34.
27. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18: 499-502.
28. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes -- 2008. *Diabetes Care*. 2008; 31 (Suppl. 1): S12-54.
29. Maranhão RC, Cesar TB, Pedrosa-Mariani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids*. 1993; 28: 691-6.
30. Ginsburg GS, Small DM, Atkinson D. Microemulsions of phospholipids and cholesterol esters: protein-free models of low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1982; 257: 8216-27.
31. Liang HQ, Rye KA, Barter PJ. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1994; 35: 1187-99.
32. Clay MA, Newnham HH, Forte TM, Barter PJ. Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apo A-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1124: 52-8.
33. Pussinen P, Jauhiainen M, Metso J, Tyynela J, Ehnholm C. Pig plasma phospholipid transfer protein facilitates HDL interconversion. *J Lipid Res*. 1995; 36: 975-85.
34. Barter PJ, Lally JL. In vitro exchanges of esterified cholesterol between serum lipoprotein fractions: studies of humans and rabbits. *Metabolism*. 1979; 28: 230-6.
35. Barter PJ, Jones ME. Kinetic studies of the transfer of esterified cholesterol between human plasma low and high density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1980; 21: 238-49.
36. Albers JJ, Wolfbauer G, Cheung MC, Day JR, Ching AF, Lok S, et al. Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1258: 27-34.
37. Lusa S, Jauhiainen M, Metso J, Somerharju P, Ehnholm C. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem J*. 1996; 313 (Pt 1): 275-82.
38. von Eckardstein A, Jauhiainen M, Huang Y, Metso J, Langer C, Pussinen P, et al. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1301: 255-62.
39. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry*. 1988; 27: 25-9.
40. Janis MT, Metso J, Lankinen H, Strandin T, Olkkonen VM, Rye KA, et al. Apolipoprotein E activates the low-activity form of human phospholipid transfer protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331: 333-40.